



Maturation morpho-fonctionnelle de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 dans l'hippocampe

Frederic Lanore

► To cite this version:

Frederic Lanore. Maturation morpho-fonctionnelle de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 dans l'hippocampe. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2010. Français. NNT : . tel-03367965

HAL Id: tel-03367965

<https://hal.science/tel-03367965>

Submitted on 6 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse N°

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement

Le 26 Octobre 2010

Par **Frédéric LANORE**

Né le 1 Août 1982 à Montluçon

**Maturation morpho-fonctionnelle de la synapse fibre
mossue/cellule pyramidale de CA3 dans l'hippocampe**

Membres du jury :

Stéphane Olié
Valérie Crépel
Dominique Muller
Xavier Leinekugel
Jean Christophe Poncer
Christophe Mulle

Directeur de recherche CNRS
Directeur de recherche INSERM
Professeur Université de Genève
Chargé de recherche INSERM
Directeur de recherche INSERM
Directeur de recherche CNRS

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail et m'honorent de leur présence : le Dr Stéphane Oliet, le Dr Valérie Crépel, le Pr. Dominique Muller, le Dr Xavier Leinekugel et le Dr Jean-Christophe Poncer.

Je remercie Christophe Mulle pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son équipe, pour m'avoir encadré, confié ce projet, pour avoir été à mon écoute et permis de partager mes données dans de nombreux congrès. Et tout ça depuis mon Master 2,... et oui, cinq ans que tu me supportes !

Merci au consortium européen SYNSCAFF, au conseil régional d'Aquitaine et la Fondation pour la Recherche Médicale pour leur soutien financier.

Un énorme merci à Eli avec qui toute cette histoire a commencé. Merci de m'avoir accompagné jusqu'au bout, de m'avoir appris autant de choses (purement scientifiques bien sûr...). Merci d'avoir mis autant d'animation dans les journées de travail. Merci pour tes cartes postales, tes magnifiques cadeaux, pour ces interminables discussions scientifiques à l'animalerie qui resteront dans le cadre du secret scientifique !

Merci à Virginie pour tes magnifiques immuno et pour ton aide, et surtout bon courage pour la suite du projet.

Merci à mes camarades d'électrophysiology : Nelson, Mario, Christophe B, Sri et Jo (la seule fille, quel courage !). Merci de m'avoir appris autant de choses, merci pour toutes ces discussions sur tout et n'importe quoi. Merci Christophe (le roi des macros !) pour l'analyse. Merci pour faire de cette pièce d'électrophysiology un lieu si convivial où on ne fait que travailler mais aussi se marrer !

Un grand merci à la « team animalerie », Eli (la chef !), Noëlle et Audrey, sans qui nous n'aurions pas de souris !

Merci aux footballeurs du labo avec qui on aurait fait mieux que l'équipe de France à Knysna ! On aurait eu au moins un terrain de football rien que pour nous !

Merci aux membres de l'équipe de Daniel Choquet et à la plateforme d'imagerie (BIC) pour leurs conseils en termes d'imagerie.

Merci à toutes les autres personnes du groupe, du laboratoire, à celles qui l'ont quitté mais également aux personnes extérieures : Shank, Déb, Magali (sans e !), Ronan (El parasito), Alice, David, Françoise, Thierry, Julien (Pepino, le meilleur imitateur de klaxon), Damien (thésard le jour, corbeau la nuit), Silvia, Zsolt, Axel, Joana, Lenka, Pato, Fernando, Gaskon, Arnaud, Béa (qui ne gagne jamais un match de tennis), Pierrot, Laurent, Greg, Olivier, Eric, JB, Yann,... et j'en ai sûrement oublié...

Petite dédicace aux ITA (je ne vais pas dire les plus vieilles mais les premières du labo !) : merci de m'avoir appris à mettre une blouse, à choisir la bonne couleur de gants mais également la bonne couleur de poubelle, la bonne couleur de blouse. Tout a un code couleur, c'est plus simple... Merci Eli (elle est partout !), merci Delphine (qui en 5 ans ne m'a dit qu'une seule phrase : « tu penseras à descendre le recyclage ») et merci Christelle (élue miss Hygiène et Sécurité 2006, 2007, 2008, 2009, 2010 et je pense encore pour de nombreuses années !).

Merci à ma famille et à la belle-famille, et à mes parents surtout (ça y est j'ai fini mes études !).

Et pour finir merci à ma Lucie, ma chérie, pour avoir tout partagé les bons comme les mauvais moments. Heureusement que tu es là...

RESUME

Les synapses se forment selon plusieurs étapes comprenant la stabilisation des contacts nouvellement formés et leur maturation. Ces différentes étapes dépendent d'une mise en place coordonnée entre la terminaison pré- et postsynaptique. Les protéines composant la présynapse et les récepteurs ionotropiques du glutamate ont des rôles clés dans ces processus. Lors de ma thèse, je me suis intéressé à l'implication de la protéine présynaptique Bassoon lors de la maturation des synapses glutamatergiques entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3 dans l'hippocampe. Cette synapse constitue un modèle attractif pour l'étude de la maturation synaptique car elle suit des étapes de maturation morphologique et fonctionnelle bien définies. Bassoon est une des premières protéines se mettant en place au niveau des contacts synaptiques nouvellement formés. Par des approches électrophysiologiques, nous avons montré que la protéine Bassoon était importante pour l'organisation du site de libération de neurotransmetteur durant les deux premières semaines de vie post-natale chez la souris.

Les récepteurs kaïnate jouent un rôle important dans la régulation de l'activité de réseau au cours du développement post-natal. Cependant l'impact de l'activation de ces récepteurs sur la maturation synaptique est peu connu. J'ai pu mettre en évidence un délai dans la maturation fonctionnelle de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 chez les souris déficientes pour la sous-unité GluK2 des récepteurs kaïnate ($\text{GluK2}^{-/-}$). Afin de comprendre si ce délai de maturation fonctionnelle est corrélé à un retard dans la maturation morphologique de cette synapse, nous avons mis en place des infections de lentivirus codant pour une protéine membranaire fluorescente (YFP) chez le souriceau nouveau-né (P1-P2). A l'aide de microscopie confocale et de reconstruction en 3D, nous avons ainsi pu décrire la maturation morphologique de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3. Cela m'a également permis de corréler la maturation fonctionnelle à la maturation morphologique et mes résultats montrent également un retard dans la mise en place des synapses chez les souris $\text{GluK2}^{-/-}$. L'ensemble de cette étude révèle l'importance de l'activité synaptique et de la coordination entre mise en place de la pré- et de la postsynapse au cours de la maturation synaptique.

MOTS CLES : Bassoon, récepteurs kaïnate, synapse, maturation, fibre moussue

Laboratoire : Physiologie Cellulaire de la Synapse, UMR5091, CNRS-Université Bordeaux 2

ABSTRACT

The formation of synapses follows different steps including synaptogenesis and maturation. These different steps depend on coordinated pre- and post-synaptic assembly. Pre-synaptic proteins and ionotropic glutamate receptors play a central role in these processes. During my thesis, I have been interested in the implication of the presynaptic protein Bassoon in the maturation of the hippocampal mossy fiber to CA3 pyramidal cell glutamatergic synapses. This synapse constitutes an attractive model for the study of synaptic maturation because it follows several steps of defined morphological and functional maturation. Bassoon is one of the first proteins present at newly formed synaptic contacts. By electrophysiological approaches, we showed that Bassoon is important for the organization of the active zone during the first two postnatal weeks.

Kainate receptors play an important role in the regulation of network activity during postnatal development. However, the impact of kainate receptors activation on synaptic maturation is less known. I showed a delay in functional maturation of mossy fiber synapses in mice deficient for the GluK2 subunit of kainate receptors (GluK2^{-/-}). To know if this delay is correlated to morphological alterations of this synapse, we setup *in vivo* lentiviral infections of membrane fluorescent protein (YFP) in mouse pups (P1-P2). Using confocal microscopy and 3D reconstruction, we described the morphological maturation of mossy fiber synapses. We were able to correlate functional and morphological maturation and our results also showed an impairment in the formation of mossy fiber synapses in GluK2^{-/-}. Together, these data reveal the importance of synaptic activity and of the coordination of pre- and post-synaptic assembly during synaptic maturation.

KEYWORDS: Bassoon, kainate receptors, synapse, maturation, mossy fiber

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Lanore F., Labrousse V.F., Normand E., Blanchet C. and Mulle C. *Concerted morphological and functional maturation during a critical phase of hippocampal mossy fiber synapse development* (In preparation)

Pinheiro P., Lanore F., Veran J., Blanchet B., Perrais D. and Mulle C. *Role of postsynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses*. (Submitted)

Lanore F.*, Blanchet C.*, Fejtova A., Pinheiro P., Richter K., Balschun D., Gundelfinger E. and Mulle C. *Impaired development of hippocampal mossy fiber synapses in mouse deficient for the presynaptic scaffold protein Bassoon*. J Physiol 588.12: 2133-2145 (2010). *equal 1st author

Segestråle S., Juuri J., Lanore F., Piepponen P., Lauri S. E., Mulle C. and Taira T. *High firing rate of neonatal interneurons is due to attenuation of afterhyperpolarizing potassium currents by tonically active kainate receptors*. J Neurosci 30(19): 6507-14 (2010).

Lanore, F., Rebola, N. and Carta M. *Spike-timing-dependent plasticity induces presynaptic changes at immature hippocampal mossy fiber synapses*. Journal Club J Neurosci 29(26): 8299-301 (2009).

POSTERS

Carta M., Lanore F., Rebola N. and Mulle C. *Retrograde signaling at hippocampal mossy fiber synapses*. 7th FENS forum of European Neuroscience, Amsterdam, The Netherlands, July 2010.

Lanore F., Labrousse V., Normand E., Szabo Z. and Mulle C. *Role of GluK2 in morphofunctional maturation of hippocampal mossy fiber synapses*. Second European Synapse Meeting, Göttingen, Germany, November 2009.

Carta M., Lanore F., Rebola N. and Mulle C. *Retrograde signaling at hippocampal mossy fiber synapses*. Second European Synapse Meeting, Göttingen, Germany, November 2009.

Lanore F., Labrousse V., Normand E., Szabo Z. and Mulle C. *Role of GluK2 in morphofunctional maturation of hippocampal mossy fiber synapses*. Neuroscience meeting, Chicago, USA, October 2009.

Mulle C., Veran J., Blanchet C., Lanore F., Perrais D., Pinheiro P.S. *Postsynaptic kainate receptors are not involved in presynaptic facilitation at hippocampal mossy fiber synapses*. Neuroscience meeting, Chicago, USA, October 2009.

Carta M., Lanore F., Rebola N. and Mulle C. *Retrograde signaling at hippocampal mossy fiber synapses*. Gordon Conference Excitatory Synapses and Brain Function, Les Diablerets, Switzerland, September 2009.

Lanore F., Labrousse V., Normand E., Szabo Z. and Mulle C. *Morphofunctional maturation of hippocampal mossy fiber synapses*. 9th French Neuroscience Society meeting, Bordeaux, France, May 2009.

Blanchet C., Lanore F., Fejtova A., Pinheiro P., Vimeney A., Gundelfinger E.D., Mulle C. *Postnatal development of hippocampal mossy fiber synapses is impaired in mice deficient for the presynaptic protein bassoon*. 9th French Neuroscience Society meeting, Bordeaux, France, May 2009.

Lanore F., Normand E, and Mulle C. *Kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses during postnatal development*. Synaptic basis of disease, Geneva, Switzerland, July 2008.

Lanore F., Normand E, and Mulle C. *Kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses during postnatal development*. 6th FENS forum of European Neuroscience, Geneva, Switzerland, July 2008.

Lanore F., Blanchet C., Pinheiro P., Vimeney A., Fejtova A., Gundelfinger E.D. and Mulle C. *Functional implication of bassoon in postnatal development of hippocampal mossy fiber synapses*. First European Synapse Meeting, Bordeaux, France, March 2008.

Lanore F., Blanchet C., Pinheiro P., Vimeney A., Fejtova A., Gundelfinger E.D. and Mulle C. *Functional implication of bassoon in postnatal development of hippocampal mossy fiber synapses*. Scientific Meeting of Neuroscience Institute of Bordeaux, Bordeaux, France, March 2008.

COMMUNICATIONS ORALES

Club Développement des Réseaux Neuronaux, *Morphofunctional maturation of hippocampal mossy fiber synapses*, Bordeaux, France, May 2009.

EU Synscaff consortium meeting, *Bassoon in postnatal development of hippocampal mossy fiber synapse*, Magdeburg, Germany, December 2007.

AVANT-PROPOS

La synapse est une zone de contact entre deux neurones ou un neurone et une cellule effectrice (cellule musculaire par exemple). Les synapses chimiques sont constituées de trois éléments, les compartiments pré- et postsynaptiques séparés par une fente synaptique. Ces unités fonctionnelles permettent la transmission de l'influx nerveux. Comprendre les mécanismes qui régissent leur formation et leur régulation est donc fondamental pour une meilleure compréhension du fonctionnement des circuits neuronaux et des troubles neurologiques.

La formation des synapses se réalise suivant de nombreuses étapes. Afin de former des réseaux neuronaux fonctionnels, les cellules neuronales émettent des prolongements qui, après extension, formeront l'axone et les dendrites. La croissance de ces prolongements se fait par la migration du cône de croissance qui, guidé par les signaux émis par son environnement, dirige l'axone jusqu'à sa cellule cible. L'établissement du contact adhésif est effectué par formation d'adhésions spécifiques entre les compartiments pré- et postsynaptiques. Ensuite, interviennent des étapes de différenciation (i) présynaptique, avec le recrutement de protéines essentielles à la libération de neurotransmetteur, et (ii) postsynaptique, avec formation de la densité postsynaptique et l'accumulation des récepteurs. Une fois les contacts formés, des processus de maturation activité-dépendants comprennent des modifications du nombre et du type de récepteurs ainsi que des réarrangements des circuits avec l'élimination de certains contacts et la stabilisation des autres. Enfin, des processus de plasticité synaptique qui peuvent modifier les propriétés pré- ou postsynaptiques modulent la transmission synaptique et seraient importants dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation.

Mon modèle d'étude est la synapse entre fibre moussue et cellule pyramidale de CA3 dans l'hippocampe. Les fibres moussues sont les axones des cellules granulaires contenues dans le gyrus dentelé. Ces axones contactent les cellules pyramidales de CA3 au niveau de leur dendrite proximale. Cette synapse est un modèle attractif pour l'étude de la maturation synaptique car elle se met en place suivant plusieurs étapes de maturation morphologique et fonctionnelle bien définies. La première partie de mes travaux s'est intéressée au rôle de la protéine présynaptique Bassoon au cours de la maturation synaptique. Bassoon est une protéine d'échafaudage de la zone de libération de neurotransmetteur. De plus, cette protéine est une des premières protéines recrutées au niveau des contacts synaptiques nouvellement formés suggérant un rôle dans la mise en place de la terminaison présynaptique. Nous avons étudié son rôle au cours de la maturation synaptique de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3.

Durant ma thèse, je me suis également intéressé à la maturation morphologique et fonctionnelle de cette synapse. Pour cela nous avons mis en place des infections *in vivo* de lentivirus codant pour une protéine membranaire fluorescente. A l'aide d'imagerie confocale et de reconstruction 3D, nous avons pu décrire la mise en place des éléments pré- et postsynaptiques au cours du développement post-natal et ainsi mettre en parallèle les données fonctionnelles obtenues par des techniques d'électrophysiologie. Nous avons étudié le rôle des récepteurs kaïnate lors du développement post-natal de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 d'un point de vue fonctionnel et morphologique. En effet, l'activation de ces récepteurs, lors des stades précoces de mise en place des synapses, contrôle l'activité de réseau. Cependant, l'impact de ces récepteurs sur la maturation est très peu étudié. De plus, chez l'homme, des mutations dans le gène *GR/K2* codant pour la sous-unité GluK2 des récepteurs kaïnate, entraînant une perte de fonction de la protéine, ont été impliquées dans l'autisme et les retards mentaux.

Outre ces deux projets principaux, j'ai également participé à différents projets collaboratifs. Le premier concerne la régulation du courant potassique activé par le Ca^{2+} par les récepteurs kaïnate composés de la sous-unité GluK1 au niveau des interneurons contenus dans le *stratum lucidum* chez le souriceau (P2-5) (**Annexe 1**). Le deuxième projet a permis la caractérisation d'un antagoniste spécifique des récepteurs kaïnate contenant les sous-unités GluK2/GluK5 : l'UBP310 (**Annexe 2**). Sa spécificité a été validée grâce à des expériences sur des systèmes recombinants mais également à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3.

Je me suis également intéressé à la plasticité à long terme à la fibre moussue et à la controverse concernant le rôle de la postsynapse dans l'induction de la LTP présynaptique à la fibre moussue. Je travaille sur ce projet avec deux postdoctorants du laboratoire et nous avons mis en évidence une nouvelle forme de plasticité présynaptique à court terme qui peut moduler l'induction de la LTP présynaptique à cette synapse. Cette plasticité est induite postsynaptiquement et exprimée de façon présynaptique via un messenger rétrograde restant à identifier. Dans le cadre de ce projet, nous avons publié un journal club dans the Journal of Neuroscience (**Annexe 3**).

Dans ce manuscrit, je me suis focalisé sur mes deux projets principaux concernant le rôle de la protéine Bassoon et des récepteurs kaïnate dans la maturation de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3. Ce manuscrit décrit les différentes étapes de mise en place des contacts synaptiques à partir de la stabilisation des contacts nouvellement formés, de la mise en place de la pré- et de la postsynapse jusqu'à l'obtention d'une synapse mature.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	- 13 -
INTRODUCTION	- 14 -
I. La synapse excitatrice glutamatergique.....	- 14 -
II. La formation des synapses.....	- 16 -
A. Stabilisation des contacts précoces.....	- 18 -
B. Différenciation des compartiments pré et postsynaptiques.....	- 18 -
1) Mise en place de la présynapse.....	- 20 -
a) Une vue d'ensemble de la présynapse	- 20 -
b) Les STV	- 21 -
c) Les PTV	- 22 -
d) Les orphans	- 22 -
2) Bassoon	- 23 -
a) Structure	- 23 -
b) Adressage et localisation	- 24 -
c) Protéines d'interaction	- 26 -
d) Rôle de Bassoon dans la formation des synapses et la transmission synaptique.....	- 27 -
3) Mise en place de la postsynapse	- 29 -
III. Maturation synaptique.....	- 30 -
A. Maturation morphologique et implication de l'activité neuronale.....	- 31 -
B. Maturation fonctionnelle.....	- 33 -
1) Changement de sous-unités des récepteurs de type NMDA synaptique	- 33 -
2) Les synapses silencieuses.....	- 35 -
C. Pathologies liées à la maturation synaptique : retards mentaux et autisme.-	- 38 -
IV. Récepteurs kaïnate et maturation synaptique	- 41 -
A. Généralités : les récepteurs du glutamate	- 41 -
1) Les récepteurs métabotropiques.....	- 41 -
2) Les récepteurs ionotropiques	- 42 -
a) Les récepteurs de type AMPA	- 42 -
b) Les récepteurs de type NMDA	- 43 -
B. Les récepteurs kaïnate	- 43 -
1) Clonage et structure	- 43 -

2) Trafic des récepteurs kaïnate : régulation par les protéines d'interaction et phosphorylation	- 45 -
3) Pharmacologie des récepteurs kaïnate	- 48 -
a) Les agonistes	- 49 -
b) Les antagonistes	- 49 -
c) Les modulateurs allostériques	- 50 -
4) Rôle des récepteurs kaïnate dans la transmission synaptique à un stade mature	- 51 -
a) Les récepteurs kaïnate postsynaptiques	- 51 -
b) Les récepteurs kaïnate présynaptiques	- 53 -
✓ Les autorécepteurs	- 54 -
✓ Les hétérorécepteurs	- 56 -
5) Les récepteurs kaïnate au cours du développement post-natal	- 57 -
a) Expression	- 57 -
b) Rôle des récepteurs kaïnate au cours de la maturation	- 58 -
✓ Au niveau du colliculus supérieur	- 58 -
✓ Au niveau des synapses thalamocorticales	- 58 -
✓ Dans l'hippocampe	- 59 -
V. La synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3	- 62 -
A. Vue d'ensemble de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3	- 63 -
B. Mécanismes moléculaires de la ségrégation des fibres moussues	- 64 -
C. Morphologie de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3	- 64 -
1) Chez l'adulte	- 64 -
2) Au cours de la maturation	- 66 -
D. Synaptogenèse des fibres moussues en condition normale et pathologique chez l'adulte	- 66 -
E. Plasticité structurale	- 67 -
F. Transmission et plasticité synaptique	- 68 -
1) Transmission synaptique	- 68 -
2) Plasticité à court-terme	- 70 -
3) Plasticité à long-terme	- 71 -
a) Potentialisation à long terme	- 71 -
b) Dépression à long terme	- 72 -
c) Au cours de la maturation	- 73 -
G. Rôle fonctionnel de la fibre moussue	- 74 -

RESULTATS-DISCUSSION.....	- 76 -
I. Article 1 : “Impaired development of hippocampal mossy fibre synapses in mouse mutants for the presynaptic scaffold protein Bassoon”	- 76 -
A. Problématique.....	- 76 -
B. Résultats.....	- 77 -
C. Discussion.....	- 95 -
II. Article 2 : “Concerted morphological and functional maturation during a critical phase of hippocampal mossy fiber development”	- 98 -
A. Problématique.....	- 98 -
B. Résultats.....	- 98 -
C. Discussion et perspectives	- 139 -
CONCLUSION.....	- 142 -
BIBLIOGRAPHIE	- 143 -
ANNEXE 1.....	- 160 -
ANNEXE 2.....	- 171 -
ANNEXE 3.....	- 194 -

ABREVIATIONS

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
CaMKII	Ca^{2+} /Calmodulin Kinase II
CAZ	Cytomatrix at the active zone
CTD	C-terminal domain
EPSC	Excitatory postsynaptic current
FGF	Fibroblast growth factor
GABA	Gamma aminobutyric acid
GDP	Giant depolarizing potential
IPSC	Inhibitory postsynaptic current
LTD	Long term depression
LTP	Long term potentiation
MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NTD	N-terminal domain
PDZ	PSD-95, Discs-large, Zona occludens-1
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PSD	Postsynaptic density
PSD-95	Postsynaptic density 95
PTP	Post-tetanic potentiation
PTV	Piccolo/Bassoon Transport Vesicles
RRP	Readily releasable pool
SAP102	Synapse associated protein 102
STV	Synaptic vesicle protein Transport Vesicles
SynCAM	Synaptic cell adhesion molecule

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. La synapse excitatrice glutamatergique

Dans le système nerveux central (SNC), l'information est codée par l'activité de réseaux neuronaux. Au sein de ces réseaux les neurones communiquent entre eux par l'intermédiaire de structures spécialisées : les synapses. Il existe deux types de synapses : électriques et chimiques. La communication entre neurones se fait majoritairement par des synapses chimiques excitatrices ou inhibitrices. Le principal neurotransmetteur exciteur est le glutamate. Les synapses excitatrices glutamatergiques sont des structures asymétriques composées d'un compartiment présynaptique contenant les vésicules synaptiques et d'un compartiment postsynaptique contenant la densité postsynaptique (PSD). Ces deux éléments sont séparés par la fente synaptique (**Figure 1**).

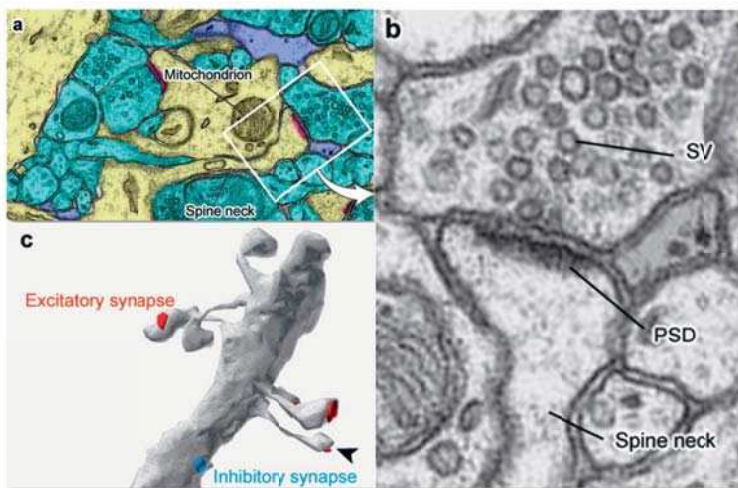


Figure 1: La synapse glutamatergique.

(a) Coupe fine de la région CA1 de l'hippocampe visualisée en microscopie électronique montrant la PSD (rouge), les dendrites (jaune), les axones (bleu) et les astrocytes (violet). (b) Une synapse excitatrice glutamatergique visualisée en microscopie électronique. SV: vésicules synaptiques (c) Reconstruction en 3 dimensions de coupes en microscopie électronique d'une dendrite de cellule pyramidale de CA1. En rouge sont indiquées les synapses excitatrices et en bleu une synapse inhibitrice. D'après (Sheng and Hoogenraad, 2007)

L'élément présynaptique contient toute la machinerie nécessaire à l'exocytose du neurotransmetteur mais également des protéines d'échafaudage et de signalisation qui maintiennent la structure et permettent une modulation de la libération du glutamate. La terminaison présynaptique est divisée en compartiments structurellement et fonctionnellement distincts. Le premier est la zone active où a lieu la libération du neurotransmetteur. Le deuxième compartiment comprend un important réservoir de vésicules synaptiques pouvant être lui-même divisé en trois domaines : la réserve de vésicules située à plus de 200 nm de la zone active, le pool de vésicules prêtes à l'exocytose (RRP) et un pool de vésicules intermédiaires appelé pool de recyclage (Garner et al., 2000; Rizzoli and Betz, 2005) (**Figure 2A, B**).

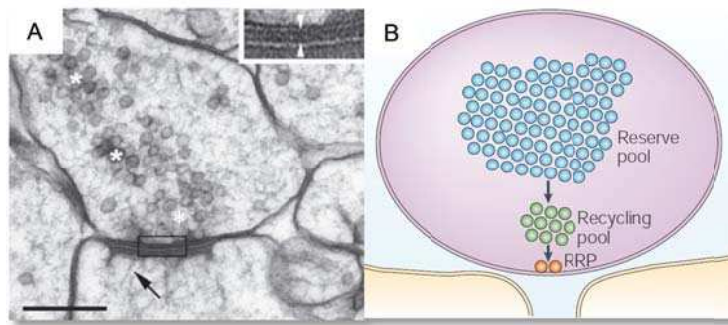


Figure 2: Organisation des vésicules présynaptiques.

(A) Synapse asymétrique du *stratum radiatum* dans l'hippocampe visualisée en microscopie électronique. Les vésicules synaptiques sont organisées en trois zones indiquées par un astérisque. L'agrandissement représente la PSD. La flèche noire montre des structures filamenteuses dans la PSD. Echelle 200 μ M D'après (Rostaing et al., 2006) (B) Modèle représentant le schéma classique d'organisation des vésicules synaptiques dans la présynapse. RRP: Readily Releasable Pool. D'après (Rizzoli and Betz, 2005)

Une étude récente a mis en évidence un « super pool » de vésicules pouvant être échangé entre synapses voisines et mobilisable lors d'une stimulation synaptique (Fernandez-Alfonso and Ryan, 2008; Staras et al.). Ultrastructurellement, la zone active est caractérisée par un matériel dense en forme de filaments s'étendant de la membrane plasmique à la zone active (Landis et al., 1988; Dresbach et al., 2001; Siksou et al., 2007). L'arrivée d'un potentiel d'action dépolarise la terminaison présynaptique permettant l'activation de canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée de calcium dans la terminaison entraîne la fusion des vésicules contenues dans le RRP avec la membrane plasmique (Sudhof, 2004; Lisman et al., 2007). Le glutamate libéré diffuse dans la fente synaptique et agit sur des récepteurs du glutamate situés au niveau pré- et/ou postsynaptique.

Les récepteurs du glutamate postsynaptiques sont localisés au niveau d'une région appelée densité postsynaptique (PSD) (**Figure 1b**). Cette structure a été originellement caractérisée en microscopie électronique comme étant une région dense aux électrons (Kennedy, 2000; Hering and Sheng, 2001). La PSD est constituée d'une multitude de protéines qui peuvent être des molécules d'adhésion, des protéines du cytosquelette, des protéines d'échafaudage, des protéines G ou des protéines de signalisation (Boeckers, 2006). Les synapses glutamatergiques sont préférentiellement formées entre la terminaison axonale et l'épine dendritique postsynaptique formant un contact axo-dendritique (**Figure 1c**).

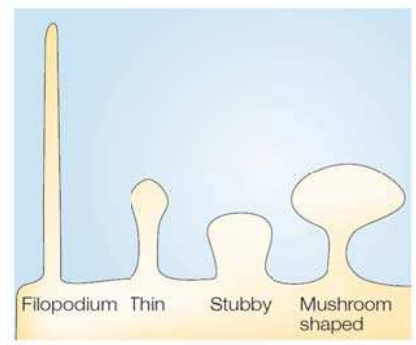


Figure 3 : Classification des épines dendritiques. D'après (Hering and Sheng, 2001)

Durant la synaptogenèse, des filopodes dendritiques émergent et contactent les axones. Ces filopodes sont les précurseurs des synapses. Les synapses sont très hétérogènes en termes de taille et de formes. Les épines ont été classées en fonction de leur forme : fine (« thin »), trapue (« stubby ») et en forme de champignon (« mushroom ») (Hering and Sheng, 2001; Bourne and Harris, 2008) (**Figure 3**). Cette classification ne tient pas compte d'épines dendritiques beaucoup plus complexes comme les fibres moussues de l'hippocampe et du cervelet. Une fois formées, les synapses sont des structures extrêmement dynamiques qui peuvent être éliminées, stabilisées puis remodelées aussi bien au cours de la maturation que pendant la vie adulte (Hering and Sheng, 2001). Dans ce manuscrit, je vais plus particulièrement discuter de la mise en place des synapses au cours du développement post-natal juste après la naissance. Quelles sont les protéines impliquées dans la stabilisation des contacts ? Comment les synapses sont-elles stabilisées et quel est le rôle de l'activité dans ces processus ?

II. La formation des synapses

L'assemblage des synapses est un processus initié au niveau des contacts axo-somatique, axo-axonique ou axo-dendritique. Lors de leur migration, les cônes de croissance forment des contacts avec le neurone cible. Ces contacts peuvent être également induits par des cônes de croissance dendritiques ou bien des filopodes axonaux ou dendritiques (Wong and Wong, 2000; Chang and De Camilli, 2001; Marrs et al., 2001; Okabe et al., 2001a; Garner et al., 2002).

La formation des synapses se divise en plusieurs étapes impliquant, à chacune d'elle, des protéines spécifiques. La première étape est la mise en place initiale des contacts synaptiques et leur stabilisation, notamment grâce à des protéines d'adhésion telles que les protéines de la famille des cadhérines (**Figure 4a**). La deuxième consiste en la différenciation des compartiments pré- et postsynaptiques. Cette étape est caractérisée par le recrutement des protéines spécifiques des deux compartiments. La dernière étape est la maturation de ces contacts pour aboutir à des synapses fonctionnelles matures (Ziv and Garner, 2001; Garner et al., 2002) (**Figure 4b, c et d**). Il est couramment admis que la différenciation de cette structure d'interface entre deux neurones est le fruit d'une interaction dynamique entre des signaux pré- et postsynaptiques.

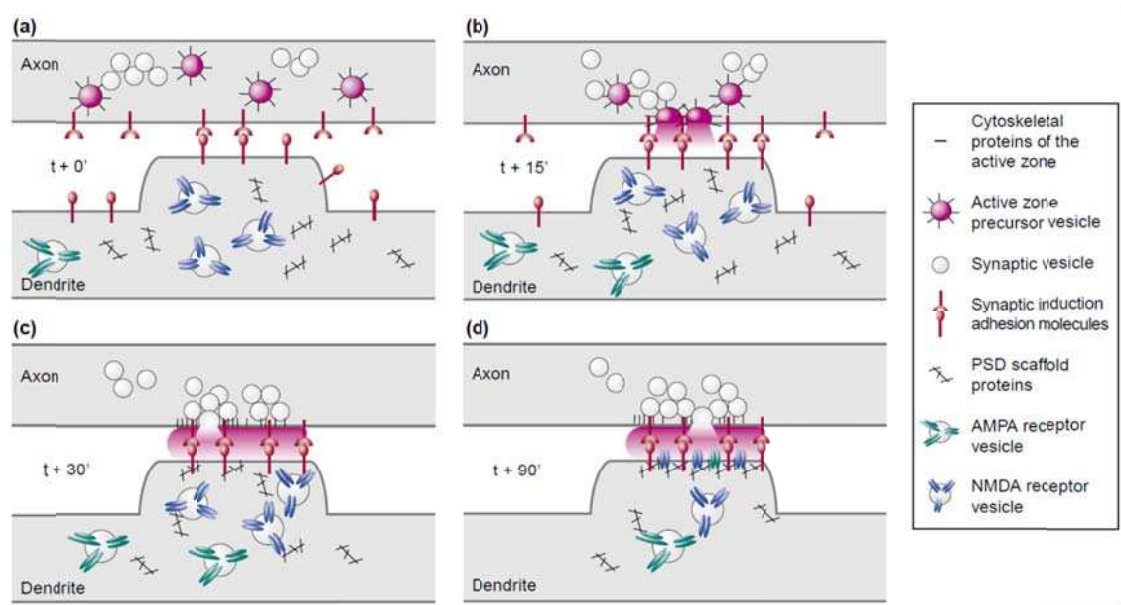


Figure 4 : Schéma représentant la synaptogenèse des synapses glutamatergiques dans le SNC.

(a) La première étape implique la stabilisation des éléments pré- et postsynaptique par des molécules d'adhésion comme la N-cadhérine. (b) Suit une mise en place des composants de la zone de libération de neurotransmetteur transportés dans des vésicules de précurseurs. (c) L'étape suivante consiste en la différenciation de l'élément postsynaptique et (d) de la mise en place des récepteurs du glutamate. $t+$ représente le temps auquel chaque étape a lieu après le contact axo-dendritique. D'après (Garner et al., 2002)

A. Stabilisation des contacts précoces

Les protéines impliquées dans cette étape précoce de mise en place des contacts synaptiques sont les cadhérines. Les cadhérines sont des molécules d'adhésion (CAMs : Cell Adhesion Molecules) permettant la formation de contacts intercellulaires. Les cadhérines sont notamment impliquées dans la migration neuronale, la fasciculation, la croissance axonale mais également durant la synaptogenèse et la plasticité synaptique (Ranscht, 2000). La N-cadhérine forme des contacts homophiliques entre l'élément pré- et postsynaptique et est uniquement localisée à la périphérie des zones actives (Uchida et al., 1996). La N-cadhérine est une des premières protéines apparaissant au niveau des contacts nouvellement formés (Benson and Tanaka, 1998; Bozdagi et al., 2000). Les cadhérines ne présentent pas de rôle synaptogène en tant que tel, car elles n'induisent pas la formation des compartiments pré- ou postsynaptiques (Sara, 2005) mais permettraient plutôt la stabilisation des contacts axo-dendritiques précoces.

B. Différenciation des compartiments pré et postsynaptiques

La différenciation des éléments pré- et postsynaptiques dépend de protéines d'adhésion et de molécules sécrétées (Dalva et al., 2007). Le complexe neurexine/neuroligine est un des acteurs majeurs de cette étape. Les neuroligines font partie de la famille des CAMs. La neuroligine est une protéine postsynaptique qui se lie à son récepteur présynaptique, la β -neurexine (Dalva et al., 2007). L'interaction neurexine/neuroligine contrôle la formation des synapses excitatrices et inhibitrices. La surexpression et la délétion de la neuroligine induisent, respectivement, une augmentation et une diminution du nombre de synapses (Graf et al., 2004; Chih et al., 2005). De plus, l'expression de neuroligine dans des cellules non neuronales en co-culture avec des neurones induit une différenciation présynaptique au niveau des contacts axonaux alors que l'expression de neurexine dans des cellules non neuronales en co-culture avec des neurones provoque l'agrégation de protéines postsynaptiques au niveau des dendrites (Scheiffele et al., 2000; Graf et al., 2004; Nam and Chen, 2005; Choquet et al., 2008; Heine et al., 2008; Wittenmayer et al., 2009). Ces études *in vitro* semblent indiquer que le complexe neurexine/neuroligine est important pour induire la synaptogenèse. Cependant, une étude *in vivo* chez des souris déficientes à la fois pour les neuroligines 1, 2 et 3 a montré que l'absence de neuroligine ne perturbait pas la formation des contacts synaptiques mais plutôt leur maturation (Varoqueaux et al., 2006).

Outre ce complexe, d'autres molécules d'adhésion ont été impliquées dans la différenciation pré- et postsynaptique telles que SynCAM1 (Synaptic Cell Adhesion Molecule 1) (Biederer et al., 2002), les SALMs (Synaptic Adhesion-Like Molecules) (Ko et al., 2006; Wang et al., 2006), les nétrines-G (Kim et al., 2006; Dalva et al., 2007) ou le complexe éphrine/récepteur Eph (Henkemeyer et al., 2003; Martinez et al., 2005). Il existe également des facteurs sécrétés jouant un rôle dans la formation des synapses excitatrices glutamatergiques, notamment les protéines Wnt (Hall et al., 2000; Krylova et al., 2002) et les FGF (Fibroblast Growth Factors) (Umemori et al., 2004; Terauchi et al.).

Les cellules gliales jouent également un rôle dans la formation des synapses excitatrices glutamatergiques (Ullian et al., 2001; Ullian et al., 2004). La stabilisation des contacts dans le SNC coïncide avec l'apparition des astrocytes. Des cultures de cellules ganglionnaires de la rétine présentent une augmentation du nombre de synapses lorsqu'elles sont co-cultivées avec des cellules gliales (Ullian et al., 2001). Les cellules gliales libèrent des facteurs permettant l'induction de la synaptogenèse comme l'apolipoprotéine E (Mauch et al., 2001). De plus, l'interaction entre l'EphA4 au niveau des cellules pyramidales de CA1 et l'éphrine A3 localisée dans des astrocytes entraîne une rétraction des épines (Murai et al., 2003).

En plus des molécules synaptogènes, il existe également des molécules limitant la formation des synapses glutamatergiques. Dans des neurones d'hippocampe en culture, la délétion de MEF2A et MEF2D (MEF : Myocyte Enhancer Factor 2) augmente le nombre de synapses alors que leur surexpression le diminue (Flavell et al., 2006).

Au vu de la littérature, il est difficile de savoir quelle protéine est essentielle pour la formation des synapses excitatrices glutamatergiques. En effet, toutes les études se basant sur des souris déficientes pour une de ces protéines montrent qu'elles participent mais ne sont pas entièrement nécessaires à la synaptogenèse. Il semblerait qu'il y ait plusieurs voies de signalisation amenant à la formation des synapses. Cette idée est renforcée par le fait que toutes ces protéines sont présentes au sein d'une même épine et qu'elles se lient aux mêmes protéines composant la pré- ou la postsynapse (Scheiffele, 2003). Une coopération entre molécules, par exemple entre TrkB et éphrine A (Marler et al., 2008) ou entre la N-cadhérine et la neuroligine (Stan et al., 2010) dans la synaptogenèse a également été mise en évidence.

Suite à la formation et à la stabilisation du contact entre la membrane de l'axone et de la dendrite, l'ensemble moléculaire nécessaire à la libération de glutamate et à la réponse synaptique est recruté. Comment ces deux compartiments se mettent-ils en place ? Les protéines pré- et postsynaptiques sont synthétisées puis transportées au niveau du contact synaptique. Ces protéines sont présentes dans les

neurones avant que les contacts ne soient formés et localisées dans de petites vésicules mobiles dans l'axone et les dendrites. Ces vésicules de transport sont ensuite recrutées au niveau des contacts synaptiques.

1) Mise en place de la présynapse

a) Une vue d'ensemble de la présynapse

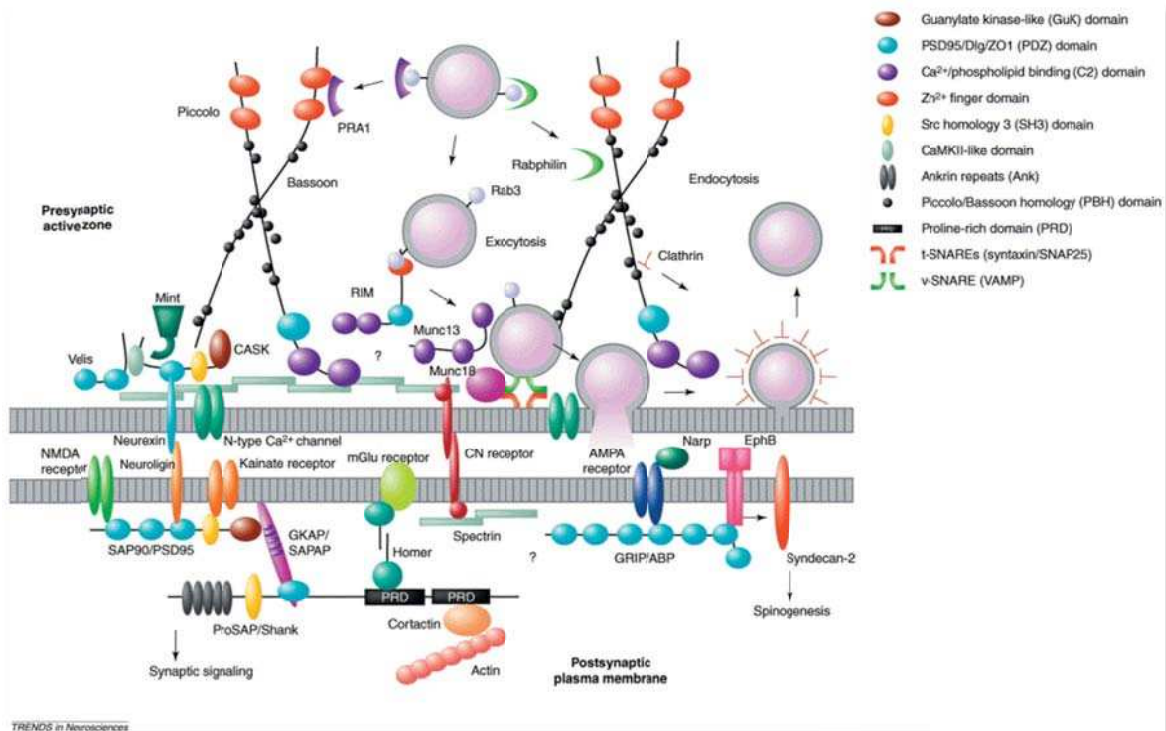


Figure 5: Organisation de la présynapse.

Schéma indiquant les composants de la synapse glutamatergique au niveau pré-, trans- et postsynaptique. D'après (Garner et al., 2002)

La présynapse est composée d'une multitude de protéines dont font partie les canaux calciques, sodiques et potassiques voltage-dépendants (Lisman et al., 2007), les senseurs calciques (synaptotagmine, DOC2b (Double C2b), complexines) (Sudhof and Rothman, 2009), les SNAREs (le nom est dérivé des protéines SNAP (Soluble NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor) Attachment Protein) Receptors) et les protéines SM (Sec1/Munc18-like) (Sudhof and Rothman, 2009) et enfin les protéines constituant la zone active ou CAZ (Cytomatrix at the Active Zone) (Schoch and Gundelfinger,

2006). Les SNAREs (syntaxine-1, SNAP-25 et synaptobrevine) et les protéines SM (Munc-18-1) régulent l'exocytose des vésicules de glutamate. Ce sont des protéines spécialisées dans la fusion membranaire.

Elles sont présentes au niveau de la membrane des vésicules (v-SNAREs) et de la zone de libération de neurotransmetteur (t-SNAREs). Les protéines appartenant à la famille des CAZ (Bassoon, Piccolo/Aczonin, RIM1 (Rab3 Interacting Molecule 1), Munc13-1, ELKS/CAST (Cytomatrix at the active zone-Associated Structural protein)), quant à elles, définissent la zone active c'est-à-dire l'endroit où les vésicules de glutamate sont concentrées et où la libération de glutamate doit avoir lieu (Sabo et al., 2006; Schoch and Gundelfinger, 2006; Hida and Ohtsuka, 2010) (**Figure 5**). Comment se mettent en place ces protéines au niveau des contacts synaptiques nouvellement formés ? Leur recrutement est-il progressif ? Sous quelle forme sont-elles acheminées au niveau des synapses ?

Les protéines présynaptiques sont transportées dans des complexes multivésiculaires avant et durant la synaptogenèse (Ziv and Garner, 2004). Deux types de vésicules de transport, biochimiquement et morphologiquement distincts, ont été mis en évidence dans les neurones en développement : les vésicules de transport contenant piccolo/bassoon (PTV : Piccolo/Bassoon Transport Vesicles) et les vésicules de transport des protéines composant et contenues dans les vésicules synaptiques (STV : Synaptic vesicle protein Transport Vesicles).

b) Les STV

Les STV transportent les protéines associées aux vésicules synaptiques et impliquées dans l'exo- et l'endocytose de ces mêmes vésicules (Ahmari et al., 2000; Zhai et al., 2001). Elles forment des vésicules claires en microscopie électronique (Ahmari et al., 2000; Tao-Cheng, 2007). Les STV sont extrêmement mobiles et leur mouvement est saltatoire (Ahmari et al., 2000). Ces vésicules sont présentes au niveau des filopodes des cônes de croissance et s'accumulent rapidement au niveau des contacts nouvellement formés (Sabo and McAllister, 2003; Sabo et al., 2006). Elles montrent une capacité à l'exocytose suite à une stimulation (Ahmari et al., 2000; Sabo and McAllister, 2003; Sabo et al., 2006). Elles sont composées de VAMP2 (Vesicle Associated Membrane Proteins)/synaptobrevine II (Ahmari et al., 2000), de canaux calciques voltage-dépendants, de SV2 (Synaptic Vesicle protein 2), de synapsine I, d'amphiphysine et de vGlut1 (Vesicular Glutamate transporter 1) (Ziv and Garner, 2004; Sabo et al., 2006; Tao-Cheng, 2007).

c) Les PTV

Les PTV sont des vésicules de 80 nm de diamètre, caractérisées en microscopie électronique comme étant denses aux électrons (Zhai et al., 2001; Tao-Cheng, 2007) et sont détectées plus tôt que les STV. Ces vésicules sont considérées comme étant les précurseurs de la zone active car elles contiennent spécifiquement les protéines la composant : Bassoon, Piccolo, RIM, Munc-13, Munc-18, syntaxines, SNAP25, les canaux calciques de type N, l' α -liprine, les protéines ERC (ELKS Rab-6 interacting protein 2)/CAST (Ziv and Garner, 2004). Comme les STV, ces vésicules sont mobiles dans l'axone, présentes au niveau des cônes de croissance et s'accumulent au niveau des nouveaux contacts synaptiques (Friedman et al., 2000; Zhai et al., 2001; Shapira et al., 2003; Fejtova et al., 2009). Les PTV sont des organelles issues de l'appareil de Golgi (Dresbach et al., 2006) et sont transportées au sein des axones où elles participent à l'assemblage des synapses. Elles sont transportées de manière antérograde via le complexe KIF5B (Kinesine heavy chain) et rétrograde via les chaînes légères de dynéine (DLC1 et DLC2 : Dynein Light Chain) (Fejtova et al., 2009). Une analyse quantitative a montré que le contenu d'une PTV en protéine Bassoon, Piccolo et RIM constituait, en moyenne, la moitié des protéines d'un bouton présynaptique (Shapira et al., 2003). D'autres études ont confirmé ces données et montrent qu'il faut incorporer environ deux à cinq PTV pour aboutir à la formation d'un site de libération (Shapira et al., 2003; Bresler et al., 2004).

d) Les orphanes

Il existe une troisième famille de précurseurs des sites de libération présynaptiques : les orphanes (Krueger et al., 2003). Les orphanes sont associées à Bassoon, forment des agrégats mobiles, qui ne sont pas juxtaposés face à des structures postsynaptiques et sont capables de libérer des vésicules synaptiques avec des caractéristiques similaires aux synapses matures (Krueger et al., 2003). Les orphanes peuvent donner lieu à de nouveaux sites de libération au niveau des contacts axo-dendritiques. Cependant, l'origine de ces structures reste inconnue.

Il semblerait que les deux familles de vésicules de transport (SVT et PTV) ne soient pas adressées au niveau des contacts nouvellement formés de façon séparée. Une étude en microscopie électronique montre que les SVT et les PTV sont transportées dans des agrégats de vésicules de transport permettant ainsi la mise en place rapide des sites de libération présynaptiques (Tao-Cheng, 2007).

Une multitude de protéines composent les précurseurs des sites de libération et sont des composantes essentielles de la terminaison présynaptique. Quelle est la conséquence fonctionnelle de la délétion d'une de ces protéines sur la mise en place de la présynapse ? Par exemple, les souris déficientes pour la protéine Munc-13-1 (Augustin et al., 1999; Varoqueaux et al., 2002), RIM1 α (Schoch et al., 2002) ou SNAP-25 (Washbourne et al., 2002) présentent une structure présynaptique normale alors que la libération de neurotransmetteur, spontanée et évoquée, est nulle chez les souris Munc-13-1 KO (Augustin et al., 1999; Varoqueaux et al., 2002). Alors que la perte de la protéine Munc-18 entraîne le même phénotype fonctionnel, la formation des synapses se fait correctement mais leur maintenance est perturbée (Verhage et al., 2000; Bouwman et al., 2004) suggérant un rôle du glutamate dans la stabilisation des contacts synaptiques.

De nombreuses études ont utilisé des approches de délétion de gènes chez les souris pour étudier le rôle des protéines présynaptiques. La majorité d'entre elles se sont intéressées à la fonction de ces protéines à des synapses matures et très peu d'études se sont intéressées aux étapes de synaptogenèse et de maturation synaptique. Bassoon est une des premières protéines présente au niveau des contacts synaptiques nouvellement formés suggérant un rôle important de cette protéine dans l'organisation et la mise en place de la terminaison présynaptique (Friedman et al., 2000). Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au rôle de cette protéine au cours de la maturation synaptique.

2) Bassoon

a) Structure

La protéine Bassoon fait partie des protéines composant la zone active. Bassoon a été identifiée à partir d'un criblage issu de protéines de la jonction synaptique dans le cerveau de rat (Langnaese et al., 1996). Cette protéine, de taille importante (420 kDa), possède deux domaines en doigts de zinc impliqués dans les interactions protéiques au niveau N-terminal, trois régions « coiled-coil » et une suite de onze résidus glutamine (répétition de CAG) dans sa partie C-terminale (Tom Dieck et al., 1998; Dresbach et al., 2001) (**Figure 6A**). La portion centrale de cette protéine est nécessaire à sa stabilisation dans la zone active (Dresbach, 2003). La répétition anormale des résidus glutamine a été impliquée dans certaines maladies génétiques humaines comme la maladie d'Huntington (Reddy and Housman, 1997).

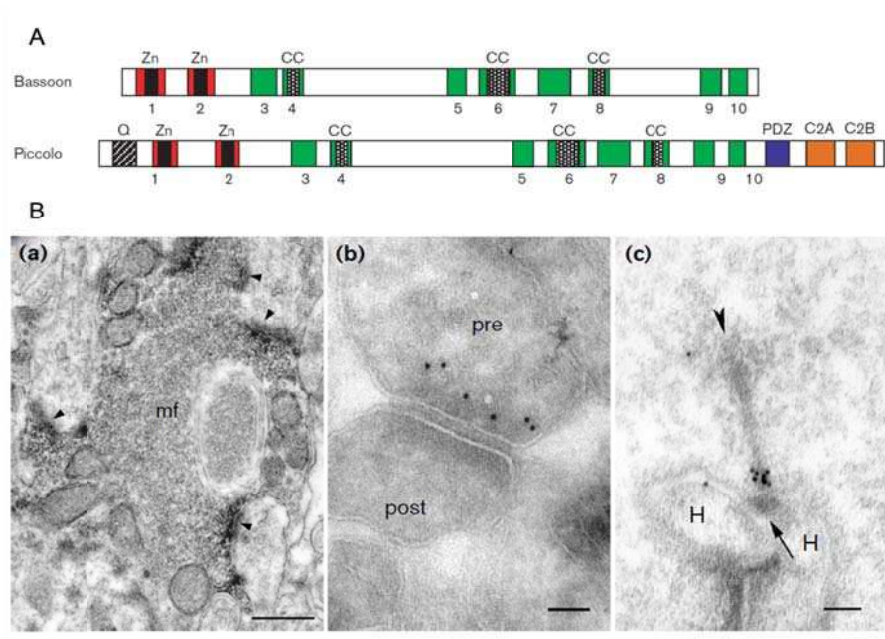


Figure 6: Structure et localisation synaptique de Bassoon.

(A) Domaines composant les protéines Bassoon et Piccolo. Les domaines homologues sont numérotés de 1 à 10. Zn: domaine en doigt de zinc; CC: domaine « coiled-coil ». Piccolo possède, en C-terminal, un domaine PDZ, et deux domaines C2. (B) Localisation de Bassoon en microscopie électronique dans différentes synapses du SNC. (a) A la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3, Bassoon est concentrée au niveau de la zone active (flèches). Echelle 500 nm (b) Marquage de Bassoon grâce à des billes d'or dans une synapse de la région CA1 de l'hippocampe et (c) au niveau d'une synapse en ruban dans la rétine. H: postsynapse des cellules horizontales; tête de flèche: haut de la synapse en ruban; flèche: densité postsynaptique à la base de la synapse en ruban. Echelle 100 nm D'après (Garner et al., 2000)

Bassoon présente de nombreuses similarités en terme de structure avec la protéine Piccolo (ou Aczonin) (Fenster et al., 2000) qui est également une protéine de la zone active. Au total Bassoon et Piccolo possèdent dix régions présentant une homologie importante. Piccolo possède également les deux domaines en doigts de zinc au niveau N-terminal. Trois régions « coiled-coil » sont identiques. En revanche Piccolo contient deux domaines PDZ et C2 (domaine liant le Ca^{2+}) mais ne possède pas de résidu glutamine (Cases-Langhoff et al., 1996; Dresbach et al., 2001) (**Figure 6A**).

b) Adressage et localisation

Bassoon est transportée au sein de PTV contenant également d'autres protéines composant la zone active (Zhai et al., 2001; Shapira et al., 2003). Une fois présente au niveau de la zone active, Bassoon est une protéine très stable comme l'ont montré des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery

After Photobleaching) (Tsuriet al., 2009). Son taux d'échange est estimé à plus de 8h. Pour comparaison, le taux d'échange de Munc-13-1 est, quant à lui, estimé à 80 minutes (Kalla et al., 2006). Cela montre que Bassoon est une protéine fixe et qu'elle constitue un échafaudage stable pour la zone active.

Bassoon est présente aussi bien au niveau des terminaisons présynaptiques inhibitrices qu'excitatrices (Richter et al., 1999; Zhai et al., 2000) au sein du système nerveux central mais également au niveau de la rétine (Brandstätter et al., 1999) (**Figure 6B**). Cette protéine est fortement associée à la zone active, cependant une certaine proportion de Bassoon est associée aux vésicules synaptiques (Tom Dieck et al., 1998; Sanmarti-Vila et al., 2000). Il a été montré par des approches biochimiques que Bassoon était présente dans les synaptosomes issus de cerveaux de rat. La localisation de Bassoon a ensuite été montrée par immunocytochimie au niveau de neurones d'hippocampe en culture (Tom Dieck et al., 1998). Bassoon présente une distribution en puncta et est co-localisée avec synaptophysine (marqueurs des vésicules synaptiques) et Piccolo. La distribution de Bassoon a été également déterminée dans des tranches de cerveau de rat par immunohistochimie et microscopie électronique (Tom Dieck et al., 1998). Bassoon est co-localisée avec synapsine I (Tom Dieck et al., 1998) et par microscopie électronique, cette protéine a été montrée comme étant concentrée au niveau des contacts synaptiques. Sa localisation est restreinte au site de libération comme par exemple au niveau des terminaisons présynaptiques des fibres moussues dans la région CA3 (*stratum lucidum*) de l'hippocampe (Tom Dieck et al., 1998; Zhang et al., 2000) (**Figure 6B**).

Dans la rétine, Bassoon présente une distribution différente suivant les différents types de synapses. Elle est située au niveau des synapses en ruban de tous les photorécepteurs, des terminaisons présynaptiques des cellules amacrines mais seule Piccolo est retrouvée au sein des synapses en ruban des cellules bipolaires (Brandstätter et al., 1999; Dick et al., 2001). Ces études montrent que des synapses d'une même structure disposent d'une composition différente en protéines de la zone active. Une étude récente a montré, qu'au sein d'une même synapse possédant plusieurs sites de libération, le calyx de Held, 60 % des sites de libération possèdent à la fois les protéines Bassoon et Piccolo alors que les sites restant ne possèdent que Bassoon ou Piccolo (Dondzillo et al., 2010).

Malgré la présence de Bassoon dans les PTV au cours de la synaptogenèse, il semble que cette protéine ne soit pas présente au niveau de toutes les synapses, voire, au sein d'une même synapse, au niveau de tous les sites de libération. Cela suggère un adressage différentiel ou une élimination de cette protéine au cours de la maturation synaptique. Quelle est la conséquence au niveau fonctionnel de cet adressage différentiel ?

c) Protéines d'interaction

Bassoon interagit grâce à ses trois domaines « coiled-coil » avec les membres de la famille des protéines CAST/ELKS (Takao-Rikitsu, 2004) et aux deux membres de la famille des protéines CtBP (C-terminal binding protein connected to Bassoon and Piccolo) : CtBP1 et CtBP2 (Zhen and Jin, 2004; Tom Dieck, 2005; Schoch and Gundelfinger, 2006).

Bassoon se lie directement à la région centrale de CAST/ELKS mais n'est pas la seule protéine interagissant avec cette dernière. Munc-13-1 se lie à RIM1 qui interagit directement avec CAST/ELKS formant ainsi un complexe ternaire. Piccolo se lie également à cette protéine (Takao-Rikitsu, 2004). L'injection d'un peptide à l'aide d'une pipette de patch-clamp dans des neurones de ganglions cervicaux supérieurs, mimant l'interaction de RIM1 ou Bassoon avec la protéine CAST/ELKS, diminue la transmission synaptique.

Au niveau de la rétine, la zone active des synapses du SNC, est représenté par les synapses en ruban. Il existe deux compartiments au sein de ces synapses. Le premier contient les protéines Piccolo, RIBEYE/CtBP2, CtBP1, RIM et KIF3A alors que le deuxième contient les protéines Bassoon, RIM2, Munc13-1, la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques et CAST1 (Tom Dieck, 2005). Il a été montré qu'il existait une interaction directe entre Bassoon et la protéine RIBEYE permettant la liaison entre les deux compartiments.

Bassoon et Piccolo sont des protéines présentant des régions homologues comme les deux domaines en doigts de zinc (Fenster et al., 2000). Il a été montré au niveau de Piccolo que ces deux domaines interagissaient avec la protéine PRA1. PRA1 est une protéine associée aux vésicules synaptiques. PRA1 est le récepteur des protéines Rab3A et synaptobrevine/VAMP2 (Martincic et al., 1997). Bassoon pourrait donc interagir avec ce récepteur permettant ainsi sa liaison avec les vésicules synaptiques.

Récemment, des approches biochimiques ont mis en évidence de nouvelles interactions (Wang et al., 2009). La partie C-terminale et le troisième domaine « coiled-coil » de Bassoon interagissent avec la région N-terminale de Munc-13. De plus, le deuxième domaine « coiled-coil » de Piccolo permettrait une interaction avec Bassoon. Cette étude montre que les différentes protéines composant la zone active : Piccolo, Bassoon, CAST/ELKS, Munc13 et RIM sont interconnectées entre elles directement et indirectement mais également que la région N-terminale de Munc-13-1 agit comme un centre d'interaction protéique de la zone active.

d) Rôle de Bassoon dans la formation des synapses et la transmission synaptique

Pour étudier le rôle de la protéine Bassoon, une souris exprimant une protéine Bassoon tronquée dans sa partie centrale, ne permettant pas l'ancrage à la zone active, a été générée (Altrock et al., 2003). L'impact de la délétion de cette protéine sur le fonctionnement synaptique a été étudié dans différentes régions cérébrales (Altrock et al., 2003; Dick et al., 2003; Khimich et al., 2005).

Ces souris mutantes ($Bsn^{-/-}$) sont viables et la moitié d'entre elles présentent des crises d'épilepsie à un stade adulte (Altrock et al., 2003). L'impact de ces crises épileptiques a été étudié au niveau du striatum (Ghiglieri et al., 2009). Les souris $Bsn^{-/-}$ présentent une diminution de la potentialisation à long terme (LTP) au niveau des neurones épineux du striatum, associée à une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2A des récepteurs NMDA et à une diminution de l'expression de la sous-unité GluN2B observée en western blot. Le nombre de dendrites et d'épines immatures est également augmenté chez les souris $Bsn^{-/-}$. Un traitement anti-épileptique permet de retrouver un niveau de LTP comparable aux souris contrôles. Cependant, les différences morphologiques persistent malgré le traitement, montrant que ce phénotype n'est pas une conséquence indirecte des crises épileptiques mais un effet direct de la délétion de la protéine Bassoon.

Des analyses électrophysiologiques au niveau d'autopses et de tranches d'hippocampe montrent qu'une fraction de synapses glutamatergiques est inactive chez les souris $Bsn^{-/-}$ (Altrock et al., 2003) et que les synapses actives ont une probabilité de libération identique au contrôle. La transmission synaptique est donc diminuée ainsi que le RRP chez les souris $Bsn^{-/-}$ au niveau des synapses des cellules pyramidales de CA1 et des autopses. Au niveau structural, en microscopie électronique, les synapses inactives ne peuvent être distinguées de celles étant actives. Ces souris présentent un volume de cerveau plus important du à un cortex et un hippocampe plus volumineux (Angenstein et al., 2007; Angenstein et al., 2008) alors que la densité de neurones est moins importante dans le cortex (Angenstein et al., 2008).

Dans la rétine, Bassoon est importante pour la formation et la fonction des synapses des photorécepteurs (Dick et al., 2003). Les précurseurs des synapses à la rétine ne sont pas des PTV mais des sphères composées de synapses en ruban pré assemblées (Regus-Leidig et al., 2009). Chez les souris $Bsn^{-/-}$, ces précurseurs sont moins nombreux et la quantité de protéines RIBEYE et Piccolo au niveau de la rétine est diminuée (Regus-Leidig et al.). Les souris $Bsn^{-/-}$ présentent une diminution du nombre de synapses en ruban et les synapses restantes ont des synapses en ruban non ancrées à la zone active et flottent dans le cytoplasme (Dick et al., 2003). Cela entraîne une perte de la transmission

synaptique au niveau des photorécepteurs, un défaut d'arborisation dendritique des neurones postsynaptiques aux photorécepteurs et une formation ectopique de synapses.

Les synapses en ruban sont également présentes au niveau des cellules ciliées de la cochlée. Ces synapses chez les souris *Bsn^{-/-}* présentent le même phénotype que les synapses en ruban de la rétine (Khimich et al., 2005). Le RRP est réduit entraînant une diminution de la libération de neurotransmetteur (Buran et al., 2010).

Ces études suggèrent que Bassoon joue un rôle important dans l'assemblage et le fonctionnement de divers types de synapses. Quelques études ont porté sur la protéine Piccolo qui contient des régions similaires à Bassoon. La première étude a utilisée des shRNA contre la protéine Piccolo dans des neurones d'hippocampe en culture (Leal-Ortiz et al., 2008). La délétion de la protéine Piccolo n'affecte pas la morphologie des synapses. Cependant, par mesure de perte de fluorescence du marqueur FM4-64, cette étude montre que Piccolo régule négativement la libération des vésicules via la protéine synapsine Ia (Leal-Ortiz et al., 2008). Cette fonction n'est pas portée par la protéine Bassoon car la même approche expérimentale utilisant un shRNA contre Bassoon n'a aucun effet. L'injection *in vivo* d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre les ARNm de Piccolo dans les ventricules, montre que cette protéine est importante pour l'apprentissage spatial et la plasticité à long terme (LTP) dans CA1 (Ibi et al., 2010). En 2010, une souris KO pour Piccolo (*Pic^{-/-}*) a été générée par le groupe du Dr Südhof (Mukherjee et al., 2010). Cette souris est viable mais présente une augmentation de la mortalité post-natale. Les souris *Pic^{-/-}* ne présentent aucun phénotype morphologique ou fonctionnel par rapport aux souris contrôles contrairement aux études utilisant des approches de délétion aigue de protéines (Leal-Ortiz et al., 2008; Ibi et al., 2010). En revanche, si l'expression de la protéine Bassoon est supprimée par shRNA dans les cultures de neurones d'hippocampe de souris *Pic^{-/-}*, la transmission synaptique, excitatrice et inhibitrice n'est pas affectée alors qu'il y a une réduction de l'agrégation des vésicules synaptiques accompagnée d'une augmentation de la taille de la densité postsynaptique (Mukherjee et al., 2010).

Cette dernière étude montre bien à quel point il est difficile d'étudier le rôle de la protéine Bassoon à un stade adulte de développement, aussi bien en utilisant des approches de délétion totale (souris KO) ou aigue (shRNA). Il est donc important d'étudier le rôle de Bassoon à des étapes précoces de développement synaptique étant donné que cette protéine est la première recrutée aux contacts nouvellement formés.

3) Mise en place de la postsynapse

Plusieurs types de molécules sont adressés au niveau de la postsynapse. La densité postsynaptique (PSD) est composée, entre autres, de protéines d'échafaudage, d'adhésion, de signalisation, de kinases, de phosphatases et de récepteurs du glutamate (Sheng and Hoogenraad, 2007) (**Figure 7**).

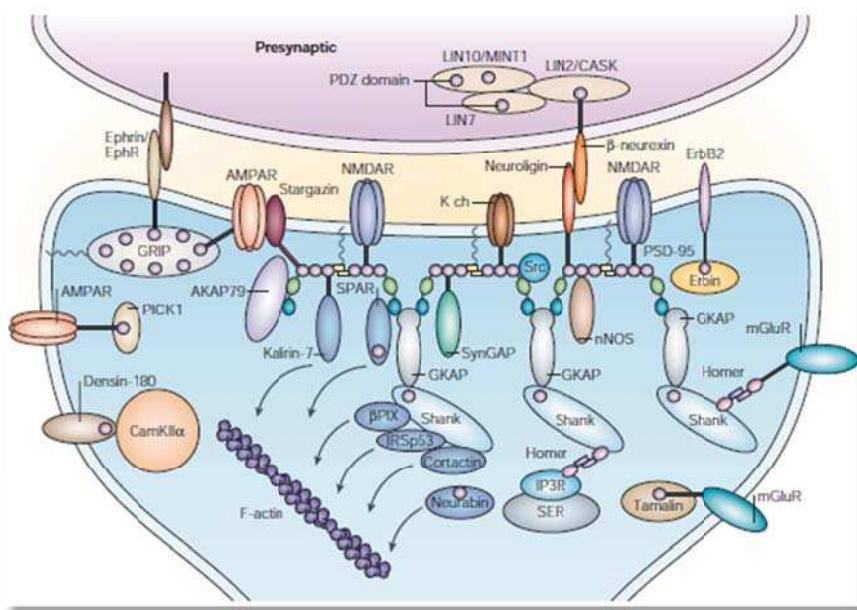


Figure 7: Organisation de la postsynapse.

Schéma indiquant les composants de la postsynapse. Des molécules d'adhésion maintiennent la structure synaptique. La transmission synaptique est assurée par les récepteurs du glutamate, ancrés dans la membrane postsynaptique via l'interaction avec des complexes protéiques très denses de la PSD. D'après (Kim and Sheng, 2004)

La différenciation présynaptique a lieu avant le développement de la postsynapse et la mise en place des protéines postsynaptiques se réalise de façon graduelle (Bresler et al., 2004). Une seule étude montre que des terminaisons présynaptiques peuvent se former au niveau de complexes de protéines d'échafaudage stables au niveau postsynaptique (Gerrow et al., 2006). Un des premiers événements dans la différenciation postsynaptique est le recrutement des protéines d'échafaudage de la famille des MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase). Cette famille est codée par quatre gènes : PSD-95/SAP90, PSD-93/chapsyn-110, SAP102 et SAP97. Ces molécules sont présentes au niveau des synapses d'hippocampe de rat deux jours après la naissance (Sans et al., 2000) et détectables 20 minutes après un contact axo-dendritique en culture de neurones (Friedman et al., 2000; Bresler et al., 2001; Bresler et al., 2004).

Après le recrutement des protéines d'échafaudage vient le recrutement des récepteurs du glutamate de type NMDA et AMPA. Il a été montré que les récepteurs NMDA étaient transportés sous forme d'agrégats (Washbourne et al., 2002) au cours de la synaptogenèse. Cependant d'autres études ont observé une accumulation graduelle au niveau des contacts synaptiques naissants (Friedman et al., 2000; Bresler et al., 2004). Pour les récepteurs AMPA, il existe une insertion locale de vésicules

contenant les récepteurs proches de la synapse au niveau péri-synaptique suivie d'une étape de diffusion latérale et d'un ancrage à la PSD (Passafaro et al., 2001; Borgdorff and Choquet, 2002; Heine et al., 2008). Les récepteurs AMPA sont incorporés après les récepteurs NMDA et le mécanisme diffère selon la sous-unité. La sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA est insérée plus directement à la synapse contrairement à la sous-unité GluA1 qui est insérée initialement au niveau extra-synaptique (Passafaro et al., 2001). De plus, GluA1 serait insérée au niveau des contacts nouvellement formés avant GluA2 (Heine et al., 2008).

D'autres protéines composant la PSD ont été étudiées comme CaMKII ou bien encore les protéines d'échafaudage Homer1c et Shank2/3 (Okabe et al., 2001b; Bresler et al., 2004) et suivent le même schéma d'insertion.

Un dénominateur commun au recrutement de ces protéines est le complexe neurexine/neuroligine. En effet, la neurexine permet l'induction d'une postsynapse et notamment l'accumulation de PSD-95 et des récepteurs NMDA (Graf et al., 2004). Une étude a montré que, suite à un contact axo-dendritique, neuroligine-1 était rapidement accumulée avec les récepteurs NMDA (Barrow et al., 2009). Les auteurs suggèrent que ces récepteurs sont co-transportés avec neuroligine-1 car une accumulation de PSD-95 a lieu immédiatement après leur recrutement.

III. Maturation synaptique

Le développement synaptique est caractérisé par une phase de maturation importante. Durant cette phase, les contacts synaptiques précoces sont stabilisés ou éliminés. Ce processus est sous la dépendance de nombreux facteurs comme les neurotrophines. Le BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) peut être sécrété par la pré- ou la postsynapse (Poo, 2001). Il joue un rôle dans la plasticité synaptique mais également lors de la formation des synapses excitatrices glutamatergiques (Gomes et al., 2006; Yoshii and Constantine-Paton, 2010). Le traitement au BDNF ou au NT3 (ligand des récepteurs TrkC) de culture de neurones hippocampiques entraîne une augmentation du nombre de synapses (Vicario-Abejon et al., 1998; Elmariah et al., 2004; Yoshii and Constantine-Paton, 2007). Inversement, *in vivo*, la délétion du récepteurs TrkB et TrkC (récepteurs du BDNF) induit une diminution du nombre de synapses excitatrices (Martinez et al., 1998; Otal et al., 2005). La neuréguline 1 (NRG1) a été impliquée dans la migration neuronale, le guidage axonal et la formation des synapses (Mei and Xiong, 2008). La perte de fonction *in vitro* ou *in vivo* du récepteur ErbB4 (récepteurs de la

NRG1) entraîne une diminution du nombre de synapses excitatrices glutamatergiques et inhibitrices mais également de l'agrégation des récepteurs postsynaptiques (Li et al., 2007; Barros et al., 2009; Fazzari et al., 2010).

Alors que la formation des contacts synaptiques peut avoir lieu sans activité synaptique (Verhage et al., 2000), l'établissement des réseaux de neurones requiert une activité neuronale précise et corrélée (Katz and Shatz, 1996).

A. Maturation morphologique et implication de l'activité neuronale

Les synapses excitatrices dans le SNC forment des épines dendritiques contrairement aux synapses inhibitrices. Les synapses glutamatergiques se forment essentiellement à partir de filopodes (Dailey and Smith, 1996; Ziv and Smith, 1996; Fiala et al., 1998; Okabe et al., 2001a) (**Figure 8**). Les filopodes dendritiques sont des structures longues, fines et le plus souvent dépourvus de PSD (Maletic-Savatic et al., 1999). Ils sont extrêmement motiles, avec une durée de vie de l'ordre de la minute voire de l'heure (Dailey and Smith, 1996; De Roo et al., 2008b). Les filopodes forment des contacts de façon transitoire et seule une fraction de ces contacts est stabilisée (Ziv and Smith, 1996; Lohmann and Bonhoeffer, 2008). De plus, les filopodes sont capables de reconnaître leur partenaire potentiel (Lohmann and Bonhoeffer, 2008).

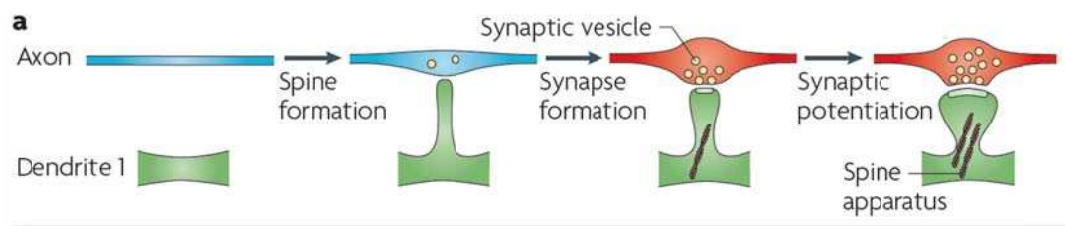


Figure 8 : Modèle illustrant la formation des synapses.

Un filopode dendritique (vert) vient contacter un axone (bleu), puis il y a accumulation de protéines présynaptiques et formation d'une épine et d'une terminaison présynaptique mature (rouge). D'après (Holtmaat et al., 2006)

La motilité des filopodes est régulée par l'activité neuronale. En effet, une privation sensorielle au niveau des vibrisses de rat réduit la motilité des filopodes à des stades critiques de maturation entraînant une organisation incorrecte du réseau (Lendvai et al., 2000). La délétion des récepteurs EphB diminue la motilité des filopodes entraînant une diminution de la synaptogenèse (Kayser et al.,

2008). Cette étude montre que la motilité des filopodes est importante durant les étapes précoces de formation des synapses car la réexpression de EphB2 ne permet le retour à la condition contrôle que si elle a lieu à des stades précoces.

Quelles sont les molécules permettant la formation de ces filopodes ? Deux types ont été mis en évidence : les molécules accélérant et les molécules freinant leur formation (Yoshihara et al., 2009). Parmi les molécules accélératrices, on retrouve la CaMKII (Jourdain et al., 2003), le syndecan-2 (Ethell and Yamaguchi, 1999; Lin et al., 2007) et la paralemnine-1 (Arstikaitis et al., 2008). Les molécules modératrices sont constituées de SNK (serum-inducible kinase) (Pak and Sheng, 2003), SynGAP (Vazquez et al., 2004), la voie Ras-PI3K-Akt-mTOR et Ras-MAPK (Kumar et al., 2005) et la telencephaline (Matsuno et al., 2006).

Si le contact est stabilisé, les filopodes évoluent en synapses de type mature (Maletic-Savatic et al., 1999; Marrs et al., 2001; Trachtenberg et al., 2002; De Roo et al., 2008a) (**Figure 8**). Alors que la formation des filopodes ne requiert pas d'activité synaptique, la stabilisation des synapses est, quant à elle, régulée par l'activité neuronale (Ehrlich et al., 2007; De Roo et al., 2008a). La stabilisation des épines est caractérisée par un élargissement de la tête de l'épine et l'accumulation de PSD-95 dans cette dernière (De Roo et al., 2008a). La délétion de PSD-95 (Ehrlich et al., 2007) ou l'inhibition des récepteurs AMPA et NMDA (De Roo et al., 2008b) entraîne une diminution de la stabilité des synapses. En effet, il existe une corrélation entre activité neuronale et changements morphologiques des épines dendritiques notamment suite à des protocoles de LTP (Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Toni et al., 1999; De Roo et al., 2008b; De Roo et al., 2008a). Ces changements peuvent être observés également *in vivo* suite à des stimulations sensorielles (Trachtenberg et al., 2002; Holtmaat et al., 2006). Des protocoles de dépression à long terme (LTD) produisent l'effet inverse c'est-à-dire la perte de contacts synaptiques (Nagerl et al., 2004). La dynamique des épines suite à ces protocoles de plasticité semble se réduire au cours du développement. Immédiatement après leur formation, les synapses sont très dynamiques. Les épines sont perpétuellement renouvelées à ce stade. Ce phénomène est particulièrement important dans les cultures de tranches d'hippocampe jeunes en culture. Il affecte 20 % des épines et diminue au cours du développement (De Roo et al., 2008b). Quels sont les mécanismes moléculaires permettant la stabilité des synapses ? Ces mécanismes sont très peu connus mais impliquent la N-cadhérine (Mendez et al., 2010).

Cette dynamique des filopodes et ces processus de création/élimination ne se produisent pas exclusivement au niveau postsynaptique (Goda and Davis, 2003). Les axones peuvent également participer à la formation des synapses en régulant la motilité de leur filopodes comme il a été montré au

niveau des axones des fibres moussues dans l'hippocampe (Tashiro et al., 2003). La motilité de ces filopodes diminue au cours du développement et les filopodes en contact avec leur cible deviennent des contacts synaptiques stables. Cette motilité des filopodes axonaux est, comme la motilité des filopodes dendritiques, régulée par l'activité neuronale. En effet, des stimulations synaptiques ou l'activation des récepteurs du glutamate de type kaïnate ou AMPA augmente cette motilité (De Paola et al., 2003; Tashiro et al., 2003). L'élimination des boutons présynaptiques est également régulée par l'activité. Des protocoles de LTD, au niveau des cellules pyramidales de CA1 dans des tranches en culture d'hippocampe, induisent la perte des terminaisons présynaptiques (Becker et al., 2008). Cette élimination peut se faire à l'échelle du réseau. Dans le cervelet, les cellules de Purkinje sont innervées par plusieurs fibres grimpantes (« climbing fibers ») à des stades précoces de développement mais lorsque le réseau est mature, une seule afférence innerve une cellule de Purkinje (Hashimoto and Kano, 2003). La non élimination de ces afférences au cours du développement peut entraîner notamment des ataxies motrices (Crepel et al., 1980).

B. Maturation fonctionnelle

En plus des changements morphologiques, les propriétés des synapses changent au cours du développement. Au niveau présynaptique, la probabilité de libération diminue (Bolshakov and Siegelbaum, 1995; Chavis and Westbrook, 2001; Feldmeyer and Radnikow, 2009) et la réserve de vésicules synaptiques augmente (Mozhayeva et al., 2002). Une étape importante de la différenciation postsynaptique est l'insertion des récepteurs du glutamate au sein de la PSD. Les synapses nouvellement formées présentent des récepteurs NMDA et AMPA synaptiques (Friedman et al., 2000; Okabe et al., 2001a; Bresler et al., 2004) avec un quantum similaire à celui observé à des synapses matures (Zito et al., 2009). Dans l'hippocampe, l'expression de la sous-unité GluA4 prédomine à des stades précoces (Zhu et al., 2000; Ritter et al., 2002). L'activité spontanée est suffisante pour permettre l'insertion de ces récepteurs au niveau de la PSD (Zhu et al., 2000). Au cours de la maturation, ces récepteurs sont remplacés par des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA2 (Zhu et al., 2000).

1) Changement de sous-unités des récepteurs de type NMDA synaptique

Dans de nombreuses structures cérébrales, la cinétique des réponses synaptiques NMDA change dû à un changement de leur composition en sous-unités. Globalement, les sous-unités GluN2B et GluN2D

sont exprimées précocement alors que les sous-unités GluN2A et GluN2C sont exprimées plus tardivement (Monyer et al., 1994; Sheng et al., 1994; Wenzel et al., 1997; Ritter et al., 2002). Ce changement de sous-unité a été largement étudié pour les sous-unités GluN2B et GluN2A dans de nombreuses régions cérébrales. Par des approches électrophysiologiques, la sous-unité GluN2B a été identifiée comme la sous-unité majoritaire au niveau des synapses tôt dans le développement. En effet, à des stades précoces dans l'hippocampe, le cortex visuel et somatosensoriel, la sensibilité des courants NMDA aux antagonistes spécifiques de la sous-unité GluN2B (Ifenprodil ou CP101, 606) est très importante (Kirson and Yaari, 1996; Flint et al., 1997; Kew et al., 1998; Stocca and Vicini, 1998; Tovar and Westbrook, 1999). Plus tard dans le développement, on observe une accélération des cinétiques de désactivation corrélée à une diminution de la sensibilité aux antagonistes GluN2B-spécifiques et à une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2A (Shi et al., 1997). Ces données ont été confirmées par des études ultrastructurales montrant l'incorporation de la sous-unité GluN2A au sein de la synapse au cours de la maturation dans le thalamus, le cortex et l'hippocampe ainsi que dans des cultures cellulaires de neurones corticaux (Li et al., 1998; Erisir and Harris, 2003; Liu et al., 2004; Petralia et al., 2005).

Le changement de sous-unité des récepteurs NMDA synaptiques peut être régulé, notamment par l'expérience sensorielle. Dans le cortex visuel, les courants NMDA enregistrés chez des animaux élevés dans l'obscurité présentent une sensibilité à l'ifenprodil et des cinétiques de désactivation supérieures à ceux enregistrés chez des animaux élevés à la lumière, suggérant un contenu en sous-unité GluN2B plus important (Carmignoto and Vicini, 1992; Quinlan et al., 1999b; Philpot et al., 2001). Cet effet peut être inversé de façon bidirectionnelle. Ainsi, si on soumet des animaux élevés à l'obscurité à une exposition lumineuse pendant 2 heures, on observe une augmentation du rapport GluN2A/GluN2B et une diminution de la sensibilité des courants NMDA à l'ifenprodil. De même, le maintien à l'obscurité pendant 72h d'animaux élevés à la lumière entraîne une diminution du rapport synaptique GluN2A/GluN2B et une augmentation de la sensibilité à l'ifenprodil (Quinlan et al., 1999a; Quinlan et al., 1999b; Philpot et al., 2001). Ces redistributions ont également été observées en microscopie électronique par immunomarquage à l'aide de billes d'or dans le cortex visuel (Corson et al., 2009). Ces données suggèrent que l'expérience visuelle est nécessaire pour que le changement de la composition synaptique en sous-unité GluN2 ait lieu. De façon similaire, il a été observé que l'apprentissage de discrimination olfactive entraînait une augmentation du rapport GluN2A/GluN2B et une diminution des cinétiques de désactivation des courants NMDA dans le cortex piriforme (Quinlan et al., 2004). D'autre part, l'activité synaptique et l'activation des récepteurs NMDA semblent également jouer un rôle dans ce changement de sous-unité. En effet, l'application conjointe de DNQX (antagoniste

des récepteurs AMPA) et d'AP5 (antagoniste des récepteurs NMDA) bloque la diminution de la sensibilité des courants NMDA à l'ifenprodil observée au cours du développement dans des neurones corticaux en culture (Hoffmann et al., 2000). L'application *in vivo* d'AP5 dans le colliculus supérieur pendant 12 à 20 jours (Shi et al., 2001; Colonnese et al., 2003a) ou l'injection intracorticale quotidienne de TTX pendant 10 jours (Carmignoto and Vicini, 1992), cause un ralentissement des cinétiques de désactivation des courants NMDA. Enfin, dans des cultures ou des tranches d'hippocampe, la reeline, une protéine de la matrice extracellulaire, facilite le changement développemental en sous-unité des récepteur NMDA (Groc et al., 2007; Qiu and Weeber, 2007). Cet effet passerait par les intégrines (Chavis and Westbrook, 2001; Groc et al., 2007).

Au cours du développement, il existe une fenêtre temporelle appelée « période critique » pendant laquelle des manipulations externes telles que des privations sensorielles entraînent des réarrangements des connexions dans le cortex visuel et le cortex somatosensoriel. Il a été suggéré que le changement de la composition en sous-unité des récepteurs NMDA synaptiques était corrélé à la fin de cette période critique. Dans des tranches thalamocorticales aigues, un protocole consistant à coupler une stimulation du thalamus (présynaptique) et une dépolarisation de la cellule postsynaptique correspondante dans la couche 4 du cortex somatosensoriel induit une LTP entre P3 et P7. Ce même protocole est incapable d'induire une LTP entre P8 et P14 suggérant que P8 correspond au stade de la fin de la période critique. Or, c'est à cet âge qu'a lieu la diminution de la cinétique de désactivation des courants NMDA (Crair and Malenka, 1995). De plus, des marquages immunohistochimiques semblent indiquer que la fin de la période critique est corrélée à l'augmentation du rapport GluN2A/GluN2B dans la couche 4 du cortex visuel (Erisir and Harris, 2003). Cependant, Barth et Malenka (Barth and Malenka, 2001) ont montré que la fin de la période critique dans le cortex somatosensoriel n'était pas corrélée à l'accélération des cinétiques de désactivation des courants NMDA puisque celle-ci intervient plus tard. Néanmoins, dans cette même étude, la diminution de la sensibilité des courants NMDA à l'ifenprodil est associée à la fin de la période critique. Cependant, le changement de sous-unité et la période critique pourraient être deux processus indépendants puisque la période critique intervient également chez des souris GluN2A^{-/-} (Lu et al., 2001).

2) Les synapses silencieuses

Tôt dans le développement, pendant la première semaine de vie post-natale, les synapses contiennent majoritairement des récepteurs NMDA (Petralia and Wenthold, 1999). Ces synapses sont dites « silencieuses » étant donnée l'absence de récepteurs AMPA et que l'activation des récepteurs NMDA

nécessite une dépolarisation membranaire afin de les libérer du blocage par le Mg^{2+} extracellulaire. Il existe deux modèles pour décrire les synapses silencieuses. Le premier d'entre eux est basé sur une absence de récepteurs AMPA synaptiques dans les synapses immatures. D'après ce modèle, la maturation synaptique se traduit par une augmentation du rapport synaptique AMPA/NMDA (Durand et al., 1996; Wu et al., 1996; Barria and Malinow, 2002) due à l'insertion de récepteurs AMPA à la synapse. L'incorporation/stabilisation des récepteurs AMPA est un processus dépendant de l'activité. Un protocole couplant des stimulations synaptiques à une dépolarisation de la cellule postsynaptique est capable de convertir des synapses silencieuses en synapses fonctionnelles dans les cellules pyramidales de CA1 (Durand et al., 1996), les cellules granulaires du gyrus dentelé (Poncer and Malinow, 2001) ainsi que dans les synapses thalamocorticales du cortex somatosensoriel (Isaac et al., 1997). Ce mécanisme dépend également de l'activation des récepteurs NMDA car la conversion en synapse fonctionnelle est bloquée en présence d'antagonistes NMDA dans l'hippocampe et le cortex visuel (Rumpel et al., 1998; Zhu et al., 2000). Donc l'activité par les récepteurs NMDA tôt dans le développement est un mécanisme critique pour la maturation fonctionnelle des synapses.

Le deuxième modèle indique quant à lui qu'à des stades précoces de développement les récepteurs AMPA sont présents au sein des synapses. En effet, dans les cellules pyramidales de CA1 dans l'hippocampe, l'activité synaptique spontanée induite par les récepteurs AMPA ou NMDA est similaire en termes de fréquence et d'amplitude au cours de la première semaine post-natale. Ceci suggère donc que les récepteurs AMPA sont présents dans les synapses immatures. La différence entre ces deux modèles pourrait venir du type des courants mesurés, évoqués ou spontanés (Groc et al., 2006). A des stades précoces, l'amplitude des courants AMPA évoqués diminue progressivement lors d'un train de stimulation à faible fréquence alors que les courants NMDA restent stables. Cette diminution est due à une extinction de la signalisation AMPA (Xiao et al., 2004). Ce deuxième modèle semble donc indiquer que l'état « silencieux » des synapses pourrait en fait venir de l'histoire de la synapse. La signalisation AMPA étant très labile à des stades précoces, des synapses ayant auparavant reçu des stimulations pourraient ainsi apparaître silencieuses de par l'extinction de leurs courants AMPA (Groc et al., 2006). Cette effet est réversible suite à l'induction de LTP (Xiao et al., 2004; Lauri et al., 2006; Abrahamsson et al., 2007, 2008). Par ailleurs, certaines études montrent que la signalisation NMDA n'est pas nécessaire à l'expression des récepteurs AMPA dans les synapses immatures. Ainsi, des courants AMPA peuvent être enregistrés dans des tranches d'hippocampe et des autapses issues de souris déficientes pour la sous-unité GluN2B à P2-P3 (Kutsuwada et al., 1996; Tovar et al., 2000). De même, un blocage chronique des récepteurs NMDA depuis la naissance ne modifie pas les courants induits par les récepteurs AMPA (Colonnese et al., 2003b). Une augmentation du contenu en

récepteurs AMPA est observée dans des cultures corticales issues de souris déficientes pour les sous-unités GluN2B et GluN1, démontrée par une augmentation de l'amplitude des courants miniatures et spontanés AMPA (Hall et al., 2007; Ultanir et al., 2007). Ces résultats suggèrent donc que la signalisation NMDA n'est pas nécessaire à l'incorporation initiale des récepteurs AMPA dans les synapses mais elle serait plutôt impliquée dans la maturation des circuits en limitant le contenu synaptique en récepteurs AMPA. L'activité des récepteurs NMDA de façon précoce dans le développement est donc un processus critique à la maturation fonctionnelle des synapses.

Une synapse silencieuse est donc une synapse n'induisant pas de réponse synaptique, au potentiel de repos suite à une stimulation. Comme nous l'avons vu, l'origine de ce phénomène peut être postsynaptique. Cependant ces synapses peuvent être silencieuses s'il n'y a pas de libération de glutamate de la terminaison présynaptique et elles sont donc dites présynaptiquement silencieuses (Malenka and Nicoll, 1997; Gasparini et al., 2000; Renger et al., 2001; Voronin and Cherubini, 2004). La probabilité de libération de neurotransmetteur à ces synapses est faible ou bien la concentration de glutamate libérée n'est pas suffisante pour activer les récepteurs AMPA qui ont une affinité inférieure pour le glutamate par rapport aux récepteurs NMDA. Ce type de synapse silencieuse a été décrit au niveau des collatérales de Schaffer et de la fibre moussue dans l'hippocampe (Gasparini et al., 2000). Des synapses répondant aux stimulations synaptiques à potentiel positif et non au potentiel de repos de la cellule, définies comme postsynaptiquement silencieuses, répondent occasionnellement à une seconde stimulation donnée 50 ms après la première à ce même potentiel de repos (Gasparini et al., 2000). Cette facilitation en paire est un phénomène dépendant essentiellement de la probabilité de libération (Zucker and Regehr, 2002). Des protocoles de LTP appliqués à ces synapses permettent l'enregistrement de réponses AMPA au potentiel de repos de la cellule, non par une insertion de récepteurs au niveau postsynaptique, mais par une augmentation de la probabilité de libération (Sivakumaran et al., 2009). Il a été également montré, lors de la première semaine de vie post-natale chez le rongeur dans l'hippocampe, que le glutamate endogène pouvait diminuer de façon tonique la probabilité de libération. Ce glutamate ambiant active des récepteurs de type kaïnate présents au niveau des terminaisons présynaptiques (Lauri et al., 2006; Caiati et al., 2010b).

Les synapses silencieuses sont observées dans de très nombreuses structures dans le SNC lors des stades de développement post-natal. Cet état synaptique détermine quelle synapse sera éliminée ou bien stabilisée mettant ainsi en avant le lien étroit en maturation morphologique et maturation fonctionnelle. Pour être totalement fonctionnelles et stabilisées, les synapses doivent être

potentialisées par l'activité synaptique. Durant la période néo-natale, il y a une forte activité de réseau impliquant l'activité glutamatergique et GABAergique dépolarisante constituée de bouffées d'activité à haute fréquence (Ben-Ari et al., 1989). Cette activité entraîne une potentialisation et participe à la stabilisation à long-terme des synapses (Kasyanov et al., 2004).

C. Pathologies liées à la maturation synaptique : retards mentaux et autisme

Une formation et un fonctionnement incorrects des synapses amènent à des troubles neurodéveloppementaux, incluant les retards mentaux et l'autisme. Les retards mentaux et l'autisme sont dus majoritairement à des mutations génétiques. L'identification des gènes mutés montrent qu'ils codent principalement pour des protéines synaptiques, telles que des protéines d'échafaudage ou de signalisation. L'utilisation de souris transgéniques, mutées pour ces gènes, montre que ces mutations entraînent une altération de la morphologie des synapses mais également de leur fonctionnement (Humeau et al., 2009; Boda et al., 2010). A l'heure actuelle, deux grandes familles de protéines synaptiques semblent être impliquées dans ce type de pathologie : les protéines associées à la voie de signalisation des GTPases et les protéines appartenant à la famille des neurexines/neuroligines et shank3.

Les GTPases sont des protéines pouvant lier et hydrolyser le GTP. De nombreuses mutations de protéines régulant ou régulées par les GTPases ont été identifiées (Boda et al., 2010). Le syndrome du X fragile est la pathologie la mieux étudiée. Elle est caractérisée par une perte de fonction de la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein). L'analyse des souris déficientes pour la protéine FMRP1 (*Fmr1*^{-/-}) montre une augmentation du nombre d'épines, notamment celles ayant une forme immature (filopodes et épines fines) suggérant un déficit d'élimination des synapses au cours de la maturation synaptique (Pfeiffer et al., 2010). D'autre part, ces souris présentent une perte de la LTP et une augmentation de la LTD dépendante de l'activation des mGluRs dans de nombreuses structures cérébrales comme le cortex ou l'hippocampe (Humeau et al., 2009). La LTP, chez les souris *Fmr1*^{-/-}, peut être récupérée par activation de la voie de signalisation impliquant les GTPases Ras/PI3K permettant l'insertion des récepteurs AMPA à la synapse dans les cellules pyramidales de CA1 dans l'hippocampe (Hu et al., 2008). La voie de signalisation de la GTPase RhoA a été également impliquée dans les retards mentaux grâce à l'identification de mutations au niveau de la Rho-GAP (Rho-GTPase Activating Protein) Oligophrenin1 (Boda et al., 2010). L'activation des récepteurs NMDA permet

l'adressage d'Oligophrenin1 dans les épines dendritiques où elle forme un complexe avec les récepteurs AMPA. Cette protéine stabilise ces récepteurs et en conséquence les épines. La délétion d'Oligophrenin1 entraîne un déficit de maturation synaptique sur le plan morphologique, avec une perte d'épine, et fonctionnelle, avec une diminution de la transmission synaptique induite par les récepteurs AMPA et NMDA et de la LTP dans les cellules pyramidales de CA1 dans l'hippocampe (Nadif Kasri et al., 2009). Des mutations dans le gène codant pour PAK3 (p21-activated kinase 3) sont associées aux retards mentaux. Cette protéine est activée par liaison aux GTPases Rac et Cdc42 (Cell Division Cycle 42). Ces deux GTPases contrôlent la dynamique du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques. La délétion de la protéine PAK3 dans des tranches d'hippocampe en culture entraîne une augmentation du nombre d'épines immatures (filopodes et épines fines). De plus, on observe une diminution de l'activité spontanée, du nombre de récepteurs AMPA synaptiques ainsi que de la LTP dans les cellules pyramidales de CA1 (Boda et al., 2004). Une souris exprimant un dominant négatif de PAK3 ne présente aucune altération des épines dendritiques et de la LTP dans l'hippocampe alors que dans le cortex préfrontal les épines sont plus volumineuses et la LTP est augmentée (Hayashi et al., 2004). La différence entre ces deux études est sans doute due aux approches utilisées. La première étude utilise une délétion aigue de la protéine PAK3 alors que la deuxième utilise une souris transgénique exprimant un dominant négatif de PAK3 mais qui peut également perturber la fonction d'autres protéines PAK. Les études citées précédemment ne sont que quelques exemples de protéines, régulant ou régulées par les GTPases, connues pour être impliquées dans les retards mentaux.

Des mutations dans le gène codant pour les neuroligines ont été identifiées chez des patients atteints de retards mentaux (Jamain et al., 2003). Au niveau fonctionnel, cette mutation affecte la propriété synaptogène de la neuroligine au niveau de culture de neurones (Chih et al., 2004). De plus, les neurones dans lesquels les neuroligines 1, 2 et 3 ont été délétées présentent une réduction des synapses excitatrices et inhibitrices avec une réduction importante de l'inhibition (Chih et al., 2005). Des souris, portant une mutation retrouvée chez l'homme pour la neuroligine 3 (mutation R451C), montrent une augmentation de la transmission synaptique inhibitrice (Tabuchi et al., 2007). Ces études suggèrent donc qu'un dérèglement de la balance excitation/inhibition est un processus important dans les retards mentaux. De même, chez les souris modèles pour le syndrome du X fragile (Fmr1 KO) (O'Donnell and Warren, 2002) l'excitabilité du réseau cortical est augmentée entraînant une diminution des oscillations gamma qui sont importantes pour les processus sensoriels (Gibson et al., 2008). Par ailleurs, le rôle joué par la balance excitation/inhibition synaptique dans ces pathologies est renforcée

par le fait que 10-30 % des patients diagnostiqués avec un retard mental sont atteints d'épilepsie (Canitano, 2007).

Chez l'homme, les symptômes associés aux retards mentaux sont essentiellement comportementaux. Ils se caractérisent par trois critères : interactions sociales anormales, problèmes de communication et stéréotypies (Silverman et al., 2010). Des tests comportementaux chez la souris ont donc été mis au point. Les souris déficientes pour Oligophrenin présentent un déficit de mémoire spatiale et d'interaction sociale (Khelfaoui et al., 2007). On observe chez la souris déficiente pour la neurologine 4 une diminution de l'interaction sociale et des vocalisations à un stade adulte (Jamain et al., 2008). La souris portant la mutation R451C dans la neurologine 3 présente une interaction sociale normale (Chadman et al., 2008) ou diminuée (Tabuchi et al., 2007) au stade adulte mais une augmentation des vocalisations à P8 (Chadman et al., 2008). Cependant, les souris mutantes neurologine 4^{-/-} et portant la mutation R451C pour neurologine 3 ont un d'apprentissage facilité par rapport aux souris contrôles (Tabuchi et al., 2007; Jamain et al., 2008). Il en va de même pour la souris déficiente pour Shank1 (Hung et al., 2008).

Des mutations dans d'autres gènes codant pour des protéines synaptiques ont été découvertes notamment SHANK3 (Durand et al., 2007), NRXN 1 (codant pour la neurexine 1) (Kim et al., 2008) et CNTNAP2 (Contactin Associated Protein-Like 2) (Bakkaloglu et al., 2008; Bourgeron, 2009). Plusieurs études montrent également que des mutations dans le gène codant pour la sous-unité GluK2 des récepteurs kaïnate, *GRIK2*, sont associées à des retards mentaux (Jamain et al., 2002; Dutta et al., 2007; Kim et al., 2007; Motazacker et al., 2007). **Cependant, la plupart de ces études rapportent les effets de ces mutations à des stades matures alors que la majorité des protéines synaptiques impliquées dans les retards mentaux régulent la synaptogenèse et la maturation synaptique. Il est donc intéressant de s'intéresser au rôle de ces protéines à des stades précoces de développement. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au rôle de GluK2 sur la maturation synaptique et le chapitre suivant aura donc pour but de décrire en détails ces récepteurs.**

IV. Récepteurs kaïnate et maturation synaptique

A. Généralités : les récepteurs du glutamate

Les récepteurs de type kaïnate font partie de la famille des récepteurs du glutamate. Ces récepteurs sont classés, suivant leur mode de transduction du signal, en deux classes : les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques (**Figure 9**). Dans ces deux classes, il existe une multitude de sous-unités qui sont capables de s'assembler les unes aux autres pour former plusieurs familles de récepteurs.

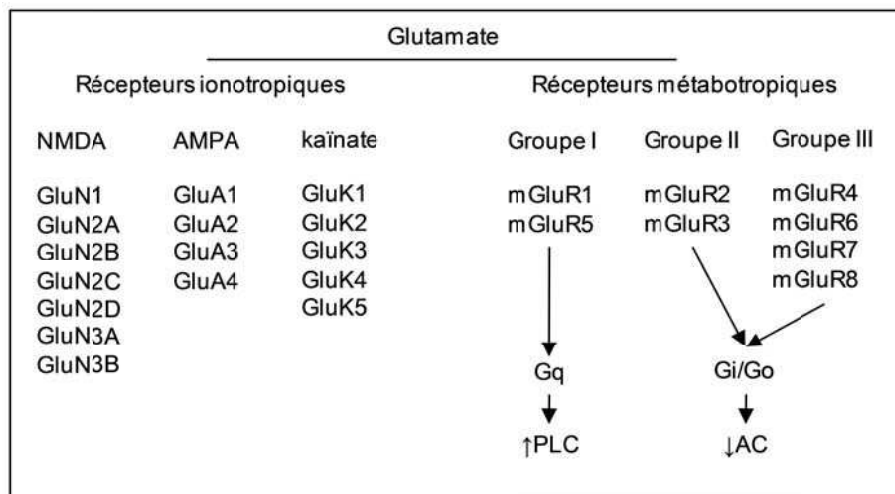


Figure 9: La famille des récepteurs du glutamate

1) Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques (mGluR) sont des récepteurs couplés à des protéines G. Les mGluRs possèdent une région extracellulaire N-terminale, sept hélices α transmembranaires et un domaine C-terminal intracellulaire. Les récepteurs de la famille des mGluRs sont classés suivant les homologies dans la séquence protéique, leur pharmacologie et le type de protéine G couplée à leur signal de transduction. Le groupe 1 comprend mGluR1 et mGluR5, tous deux couplés positivement à la phospholipase C (PLC) via la protéine G de type Gq. Le groupe 2 est composé de mGluR2 et mGluR3 et le groupe 3, de mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Les groupes 2 et 3 sont couplés négativement à l'adénylate cyclase (AC) via les protéines G de type Gi/o (**Figure 9**).

2) Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques forment des canaux ioniques. Ils sont classés en trois groupes selon l'agoniste qui les active : les récepteurs de type AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique), NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) et kaïnate (Dingledine et al., 1999) (**Figure 9**).

Ce sont des récepteurs tétramériques transmembranaires, composés d'une combinaison de sous-unités et partagent une même structure. Chaque sous-unité comporte un domaine N-terminal extracellulaire, le domaine de liaison de l'agoniste (S1), un premier domaine transmembranaire (M1), une boucle réentrante formant le pore (M2) suivie de deux domaines transmembranaires (M3 et M4) liés ensemble par une boucle extracellulaire formant le domaine de liaison de l'agoniste (S2). Le troisième domaine intracellulaire forme le domaine C-terminal (Dingledine et al., 1999) (**Figure 10**).

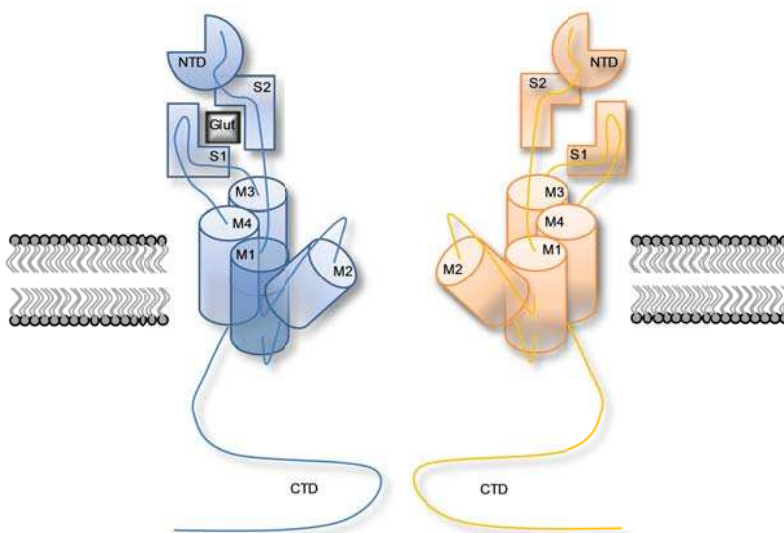


Figure 10 : Structure des récepteurs ionotropiques du glutamate.

Deux sous-unités sont représentées avec les différents domaines. NTD : Domaine N-Terminal ; CTD : Domaine C-Terminal ; Glut : Glutamate

a) Les récepteurs de type AMPA

Les récepteurs AMPA sont responsables de la transmission synaptique rapide. La famille est composée de quatre sous-unités : GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4 (Dingledine et al., 1999) (**Figure 9**). La perméabilité calcique des récepteurs AMPA est déterminée par la présence de la sous-unité GluA2. Les récepteurs qui ne la possèdent pas sont perméables au Ca^{2+} et présentent une forte rectification entrante. Cette rectification est voltage-dépendante et est due au blocage intracellulaire du récepteurs par des polyamines (Bowie and Mayer, 1995). La rectification est linéaire ou sortante en présence de

GluA2 et le récepteur est alors imperméable au Ca^{2+} . Cette propriété est due à la présence d'une arginine au lieu d'une glutamine dans le domaine M2 (Hume et al., 1991). Les quatre sous-unités peuvent exister sous deux formes « flip » et « flop » après épissage alternatif dans un domaine situé avant le domaine M4. La forme « flip » désensibilise plus lentement que la forme « flop » (Sommer et al., 1990). De plus, les sous-unités GluA2-4 subissent un épissage alternatif dans la partie C-terminale, donnant lieu à des versions longues ou courtes des sous-unités (Dingledine et al., 1999) et également entre les domaines M3 et M4 où l'édition module la cinétique de désensibilisation (Lomeli et al., 1994).

b) Les récepteurs de type NMDA

La famille des récepteurs NMDA est composée de sept sous-unités : GluN1, GluN2A à D et GluN3A-B (Dingledine et al., 1999) (**Figure 9**). La sous-unité GluN1 est la sous-unité obligatoire pour le fonctionnement du récepteur car sans cette sous-unité le récepteur n'est pas adressé à la membrane (McIlhinney et al., 1996). Les récepteurs NMDA possèdent des propriétés uniques qui les différencient des autres récepteurs ionotropiques. En effet, leur activation nécessite la liaison simultanée du glutamate et d'un co-agoniste (glycine ou D-sérine) (Kleckner and Dingledine, 1988), leur pore est bloqué par le Mg^{2+} extracellulaire de manière voltage-dépendante (Ascher and Nowak, 1988) et ils présentent une grande perméabilité au Ca^{2+} . Il existe trois sites indépendants d'épissage alternatif pour la sous-unité GluN1 (Zukin and Bennett, 1995) générant ainsi huit sous-unités GluN1.

B. Les récepteurs kaïnate

1) *Clonage et structure*

La famille des récepteurs kaïnate est codée par cinq gènes, donnant lieu aux sous-unités GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 et GluK5, anciennement GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2 respectivement (Collingridge et al., 2009) (**Figure 11**). Elles ont été clonées dans les années 1990 grâce à des sondes d'hybridation de faible affinité pour les récepteurs AMPA (Bettler et al., 1990; Egebjerg et al., 1991; Lomeli et al., 1992; Sommer et al., 1992). Les sous-unités GluK1-3 peuvent former des récepteurs homomériques fonctionnels lorsqu'elles sont exprimées dans des systèmes hétérologues, avec une affinité pour le kaïnate de l'ordre de 50-100 nM (Egebjerg et al., 1991; Sommer et al., 1992; Schiffer et al., 1997). De plus, GluK1, GluK2 et GluK3 peuvent être co-assemblées *in vitro* (Paternain et al., 2000;

Christensen, 2004; Perrais et al., 2009b), et GluK1 et GluK2 *in vivo* (Mulle et al., 2000; Christensen, 2004).

En terme de structure, les sous-unités GluK1-3 présentent 75-80 % d'homologie entre elles et GluK4-5 68 %, alors que l'homologie entre GluK1-3 et GluK4-5 n'est que de 45 % (Pinheiro and Mulle, 2006). Les sous-unités GluK4 et GluK5 présentent une forte affinité pour le kaïnate [^3H] avec une constante de dissociation de l'ordre de 5-15 nM (Werner et al., 1991; Herb et al., 1992). Cependant, ces sous-unités ne peuvent former des récepteurs homomériques. Elles doivent s'assembler avec les sous-unités GluK1, GluK2 ou GluK3 pour former des récepteurs fonctionnels ayant des propriétés pharmacologiques et biophysiques modifiées (Werner et al., 1991; Herb et al., 1992; Sakimura et al., 1992; Schiffer et al., 1997; Cui and Mayer, 1999; Barberis et al., 2008). Il a été suggéré qu'en l'absence des sous-unités GluK1-3, la sous-unité GluK5 était retenue dans le réticulum endoplasmique empêchant ainsi son expression de surface (Gallyas et al., 2003; Hayes et al., 2003; Ren et al., 2003). Des mutations dans le motif RXR (motif de rétention dans le réticulum endoplasmique) au niveau de la boucle ré-entrante (domaine M2) et du domaine C-terminal, en plus de la mutation LL C-terminale, augmente l'expression de surface des récepteurs GluK5 homomériques, qui restent cependant non fonctionnels (Nasu-Nishimura et al., 2006).

Les modifications post-traductionnelles d'édition et d'épissage alternatif des ARNm codant pour les récepteurs kaïnate donnent lieu à de multiples variants d'épissage (Bettler and Mulle, 1995; Dingledine et al., 1999; Lerma et al., 2001) (**Figure 11**). Tous ces variants, à l'exception d'un exon alternatif de 15 acides aminés dans le domaine N-terminal de GluK1, diffèrent par leur domaine C-terminal. La sous-unité GluK1 possède trois variants d'épissage principaux dans le domaine C-terminal, GluK1a, GluK1b et GluK1c (Sommer et al., 1992), et un variant d'épissage supplémentaire GluK1d, seulement présent chez l'homme (Gregor et al., 1993). Deux principaux variants d'épissage ont été décrits dans le domaine C-terminal de GluK2, GluK2a et GluK2b (Gregor et al., 1993). Un troisième variant, GluK2c, contient une insertion de l'exon C-terminal 15 et a été décrit uniquement chez l'homme (Barbon et al., 2001). Pour GluK3, deux variants d'épissage, GluK3a et GluK3b, ont été identifiés (Schiffer et al., 1997) (**Figure 11**).

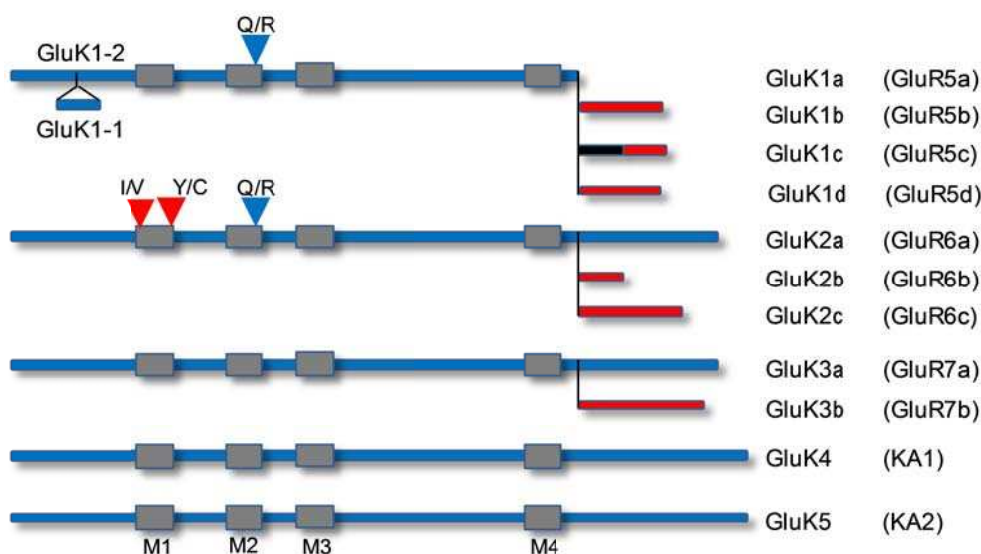


Figure 11 : Sous-unités et variants d'épissage des sous-unités des récepteurs kaïnate.
(entre parenthèses : ancienne nomenclature)

Comme la sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA, GluK1 et GluK2 peuvent être éditées au site Q/R au niveau du domaine M2. Le remplacement de la glutamine (Q) par l'arginine (R) conduit à des récepteurs ayant une perméabilité au calcium plus faible (Burnashev et al., 1995). Concernant GluK2, la perméabilité au calcium dépend également de l'état édité de deux autres codons dans le domaine M1 : les sites I/V (isoleucine/valine) et Y/C (tyrosine/cystéine) (Kohler et al., 1993). Les sous-unités GluK2 totalement éditées aux sites M1 et M2 sont essentiellement imperméables au calcium. Les récepteurs complètement non édités montrent une conductance unitaire plus importante que les récepteurs avec une ou plusieurs sous-unités éditées (Howe, 1996; Swanson et al., 1996). Récemment, il a été montré que la sous-unité GluK3 était aussi perméable au Ca^{2+} que la sous-unité GluK2 non-éditée (Perrais et al., 2009a).

2) Trafic des récepteurs kaïnate : régulation par les protéines d'interaction et phosphorylation

La localisation subcellulaire et l'adressage à la membrane diffèrent selon les variants d'épissage des différentes sous-unités (Jaskolski et al., 2004). La sous-unité GluK2a est la sous-unité la plus exprimée à la membrane plasmique et permet une augmentation de l'adressage des autres sous-unités lorsqu'elle est présente dans un récepteur hétéromérique. La sous-unité GluK3a permet également une facilitation de l'adressage des récepteurs kaïnate à la membrane. Cependant, la régulation positive de

l'adressage des récepteurs à la membrane est limitée suivant la composition en sous-unités des récepteurs.

Alors que les propriétés fonctionnelles (activation, perméation) des récepteurs kaïnate ne semblent pas être affectées par l'épissage alternatif du domaine C-terminal (Schiffer et al., 1997; Jaskolski et al., 2004; Coussen et al., 2005), le trafic intracellulaire, les processus régulateurs de ces récepteurs et partenaires d'interaction sont fortement influencés par ces modifications (Jaskolski et al., 2004; Coussen et al., 2005; Jaskolski et al., 2005). Les protéines contenant un domaine PDZ comme PSD-95, SAP102, SAP97 (Garcia et al., 1998), CASK (Calcium/calmodulin-dependent Serine protein Kinase) (Coussen et al., 2002), GRIP (Glutamate Receptor Interacting Protein), PICK1 (Protein Interacting with C kinase 1) et syntenine (Hirbec et al., 2003) interagissent avec GluK2a *in vitro* et *in vivo* en se liant aux quatre derniers acides aminés du domaine C-terminal. GluK1b et GluK1c interagissent également, *in vitro*, avec des protéines à domaine PDZ (Hirbec et al., 2003). Alors que tronquer le domaine interagissant avec les protéines à domaine PDZ n'affecte pas le trafic des récepteurs kaïnate entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique (Coussen et al., 2002; Ren, 2003; Ren et al., 2003), inhiber cette interaction dans les cellules pyramidales de CA3, à l'aide de peptides, entraîne une diminution de l'amplitude des courants induits par les récepteurs kaïnate (Hirbec et al., 2003). Cette étude montre que les protéines à domaine PDZ régulent l'adressage des récepteurs kaïnate au niveau de la PSD. De plus, la phosphorylation par la PKC (Protein Kinase C) du domaine C-terminal de GluK1 et GluK2 stabilise la liaison avec GRIP, permettant l'ancrage des récepteurs à la synapse (Hirbec et al., 2003).

Les récepteurs kaïnate contenant la sous-unité GluK2a interagissent *in vivo* et *in vitro* avec le complexe cadhérine/caténine (Coussen et al., 2002). Dans des cellules hétérologues, l'interaction entre les cadhérines et les récepteurs kaïnate de surface induit un recrutement des récepteurs dans les régions riches en cadhérines. Comme les cadhérines sont présentes au niveau des synapses, cette interaction pourrait être importante dans la localisation des récepteurs kaïnate à la synapse.

KRIP6 (Kainate Receptor Interacting Protein for GluR6) interagit directement et spécifiquement avec GluK2a (Laezza et al., 2007). L'expression de KRIP6, dans des cultures de neurones d'hippocampe, ne change pas l'expression de surface de GluK2 mais module les propriétés biophysiques des récepteurs kaïnate contenant la sous-unité GluK2a.

GluK2a et GluK2b interagissent avec différents partenaires protéiques caractérisés par analyse protéomique (Coussen et al., 2005). Spectrine, F3-contactine, dynamine1, 14-3-3δ et calmoduline interagissent avec GluK2a et NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor), VILIP-1 (Visinin-Like Protein 1),

neurocalcinine- δ , calcineurine, calmoduline et profiline-2 avec GluK2b. GluK2a and GluK2b peuvent s'assembler dans un même récepteur *in vivo*, permettant une interaction avec différents partenaires au niveau du domaine C-terminal des deux sous-unités (Coussen et al., 2005). Le rôle de ces différentes interactions n'a cependant pas été mis en évidence.

L'activation de la calcineurine par l'activation des récepteurs NMDA à la fibre moussue dans l'hippocampe conduit à une déphosphorylation de la sous-unité GluK2b, réduisant l'amplitude des courants synaptiques induits par les récepteurs kaïnate (Rebola et al., 2007). Dans les couches 2/3 du cortex perirhinal, l'activation des récepteurs kaïnate et la libération de Ca^{2+} des réserves calciques intracellulaires induit une LTD des réponses synaptiques kaïnate (Park et al., 2006). Cette LTD implique les récepteurs mGluR5, la PKC et PICK1. Dans les cellules ganglionnaires de la racine dorsale de la moelle épinière, GluK1 et GluK5 sont les seules sous-unités exprimées. L'activation de la PKC, dans ces neurones, phosphoryle les récepteurs kaïnate et induit une internalisation de ces récepteurs (Rivera et al., 2007). Cet effet est spécifique pour la sous-unité GluK1b. Il a été également montré que la phosphorylation de GluK1 par la PKC, activée par un agoniste des récepteurs métabotropiques mGluR1, augmente la perméabilité calcique des récepteurs kaïnate composés de cette sous-unité (Cho et al., 2003). La phosphorylation de la sous-unité GluK2 a un rôle important dans la régulation du trafic des récepteurs kaïnate (Nasu-Nishimura et al., 2010; Martin and Henley, 2004). Dans des neurones d'hippocampe en culture, l'expression de surface de la sous-unité GluK2a est régulée dynamiquement. L'application de kaïnate produit une internalisation PKC-dépendante alors que l'application de NMDA induit une endocytose PKA (Protein Kinase A) et PKC-dépendante (Martin and Henley, 2004). De plus, après l'endocytose initiale des récepteurs kaïnate suite à une application courte de kaïnate, une augmentation du nombre de récepteurs kaïnate à la surface membranaire est observée (Martin et al., 2008). De plus, la phosphorylation par la PKC peut être modulée par palmitoylation de la sous-unité GluK2a (Pickering et al., 1995). Récemment, il a été montré que l'interaction entre GluK5 et SNAP-25 (Synaptosomal-associated protein 25) régule l'expression de surface des récepteurs kaïnate à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 (Selak et al., 2009). SNAP-25 interagit avec GluK5 et PICK1, réduisant la stabilité de GluK5 à la membrane d'une manière activité-dépendante.

Une analyse par protéomique a mis en évidence, récemment, une nouvelle protéine pouvant interagir avec les récepteurs kaïnate : Neto2 (Zhang et al., 2009). Neto2 est une protéine auxiliaire des récepteurs kaïnate comme les protéines TARP (Transmembrane AMPA receptor Regulatory Protein) pour les récepteurs AMPA (Rouach et al., 2005) et Neto1 pour les récepteurs NMDA (Ng et al., 2009). Neto2 module les propriétés biophysiques des récepteurs kaïnate natifs et recombinants mais n'affecte

pas l'adressage des récepteurs kaïnate à la membrane. Cependant, les récepteurs kaïnate régulent l'expression et l'adressage de Neto2 à la membrane car chez les souris $\text{GluK2}^{-/-}$ ces deux paramètres sont diminués (Zhang et al., 2009).

3) Pharmacologie des récepteurs kaïnate

Les sous-unités des récepteurs kaïnate ont une structure similaire à celle des autres récepteurs ionotropiques du glutamate (Bennett and Dingledine, 1995). Les récepteurs AMPA et kaïnate ont une affinité similaire pour le glutamate ($\text{EC}_{50} \sim 300 \mu\text{M}$) (Paternain et al., 1996). Les récepteurs kaïnate natifs et recombinants peuvent également être activés par des agonistes exogènes tels que l'AMPA, le kaïnate et le domoate, qui activent également les récepteurs AMPA, rendant difficile une sélectivité pour les récepteurs kaïnate (Bleakman and Lodge, 1998). La synthèse et la caractérisation de nouveaux composés ont conduit à l'identification de différents agonistes et antagonistes spécifiques (**Tableau 1**).

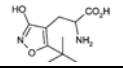
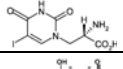
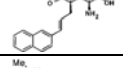
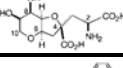
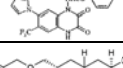
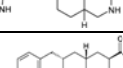
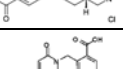
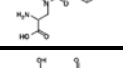
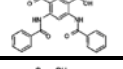
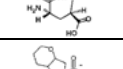
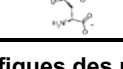
Composé	Activité	Sélectivité	Structure	Références
ATPA	agoniste	GluK1 et agoniste partiel de GluK2/GluK5		(Clarke et al., 1997)
(S)-5-iodowillardiine	agoniste	GluK1 et agoniste partiel de GluK2/GluK6		(Swanson et al., 1998)
LY339434	agoniste	GluK1		(Small et al., 1998)
Dysiherbaine	agoniste	GluK1		(Swanson et al., 2002)
LU97175	antagoniste compétitif	GluK3>GluK1>GluK2		(Loscher et al., 1999)
LY377770	antagoniste compétitif	GluK1		(O'Neill et al., 1998)
LY382884	antagoniste compétitif	GluK1		(O'Neill et al., 1998)
UBP296	antagoniste compétitif	GluK1, GluK1/GluK2, GluK1/GluK5		(More, 2004)
NS3763	antagoniste non-compétitif	GluK1		(Christensen, 2004)
SYM2081	antagoniste	GluK1, GluK2		(Zhou et al., 1997)
MSVIII-19	antagoniste	GluK1		(Sanders et al., 2005)

Tableau 1 : Agonistes et antagonistes spécifiques des récepteurs kaïnate.

a) Les agonistes

L'acide 5-*tert*-butyl-4-isoxazolepropionique (ATPA) et la (S)-5-iodowillardiine sont des agonistes puissants et sélectifs de GluK1, avec une faible affinité pour les récepteurs AMPA et les récepteurs contenant les sous-unités GluK2 et GluK3 (Clarke et al., 1997; Swanson and Heinemann, 1998; Alt et al., 2004; Clarke and Collingridge, 2004). GluK1 peut aussi être activée par l'AMPA et les récepteurs hétéromériques contenant les sous-unités GluK2 et GluK5 par l'ATPA et l'AMPA (Paternain et al., 2000). L'acide (2S,4R)-4-méthyl glutamique (SYM2081) et l'acide (2S,4R,6E)-2-amino-4-carboxy-7-(2-naphtyl)hept-6-énoïque (LY339434) sont plus sélectifs pour les récepteurs kaïnate que pour les récepteurs AMPA. Le premier affiche une sélectivité pour les récepteurs kaïnate contenant les sous-unités GluK1 et GluK2 et le dernier apparaît comme étant plus sélectif pour GluK1 que pour GluK2 et GluK3 (Small et al., 1998; Pedregal et al., 2000; Alt et al., 2004). Le SYM2081 peut induire des courants en activant les récepteurs kaïnate par un processus de désensibilisation rapide induite par l'agoniste ce qui fait de cette drogue un antagoniste (Li et al., 1999). La toxine marine, la dysiherbaine, est un agoniste des récepteurs kaïnate (Swanson et al., 2002). Il a été montré, grâce à cette substance, que l'activation de la sous-unité GluK1 dans un récepteur hétéromérique GluK1/GluK5 était suffisante pour permettre l'ouverture du canal (Swanson et al., 2002).

b) Les antagonistes

Peu de composés, à ce jour, ont été décrits comme étant des antagonistes sélectifs des récepteurs kaïnate, la plupart d'entre eux étant sélectifs pour la sous-unité GluK1. Les composés de la famille des quinoxalinediones, incluant le 6-cyano-7-nitroquinoxaline (CNQX) et le 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(F)quinoxaline (NBQX), agissent comme des antagonistes compétitifs sur les récepteurs kaïnate natifs et recombinants. Le NBQX est plus de 100 fois plus sélectif pour les récepteurs AMPA que pour les récepteurs kaïnate à faible concentration (Mayer, 2006) et peut être utilisé comme antagoniste sélectif des récepteurs AMPA pour l'étude des récepteurs kaïnate natifs (Bureau et al., 1999). Des dérivés du pyrrolil-quinoxalinedione, comme le LU97175, ont une plus forte affinité pour les récepteurs kaïnate que pour les récepteurs AMPA, spécialement pour les sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3 (Loscher et al., 1999). Des nouveaux composés affichant une meilleure sélectivité pour les récepteurs kaïnate ont été synthétisés. Ils agissent comme des antagonistes efficaces sur certaines sous-unités. Un exemple pourrait être le (3S,4aR,6S,8aR)-6-(4-carboxyphényl)méthyl-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-décahydroxyisoquinoline-3-carboxilate (LY382884), composé dérivé de l'antagoniste non compétitif des récepteurs AMPA, le (3S,4aR,6R,8aR)-6-(2-

(tatrazol-5-yl)éthyl)décahydroisoquinoline-3-carboxilate (LY293558), qui présente une sélectivité contre la sous-unité GluK1 (Bortolotto et al., 1999a; Smolders et al., 2002; Alt, 2004) mais aussi le LY377770 (O'Neill et al., 1998). L'UBP296 et 302, des dérivés de la willardiine, ont été montrés comme étant des antagonistes sélectifs des récepteurs kaïnate contenant la sous-unité GluK1 (More, 2004). L'UBP310 a été montré comme étant un antagoniste sélectif de ces mêmes récepteurs dans des systèmes recombinants (Dolman et al., 2005). L'UBP302, 310 et 316 bloquent les récepteurs recombinants homomériques GluK3. Cependant ces composés sont inefficaces sur les récepteurs homomériques GluK2 ou hétéromériques GluK2/GluK3 (Perrais et al., 2009b). De plus, le GYKI53655, un antagoniste non-compétitif spécifique des récepteurs AMPA, bloque à forte concentration (50 μ M) les récepteurs contenant la sous-unité GluK3 (Perrais et al., 2009b). Récemment, l'UBP310 a été montré comme étant un antagoniste spécifique des récepteurs homomériques GluK2/GluK5 (**Pinheiro, Lanore et al., soumis ; Annexe 2**). Le NS3763 et l'ACET est aussi spécifique pour la sous-unité GluK1 (Christensen, 2004; Dargan et al., 2009). Le MSVIII-19, un analogue synthétique de la dysiherbaine, est également un antagoniste des récepteurs homomériques GluK1 (Sanders et al., 2005). La fonction des récepteurs kaïnate peut être bloquée par les lanthanides, en particulier par le lanthanum et le gadolinium (Huettner et al., 1998) avec une meilleure efficacité par rapport aux récepteurs AMPA. Le zinc est également capable d'exercer une action inhibitrice sur les récepteurs kaïnate natifs et recombinants (Mott et al.; Huettner et al., 1998; Fukushima et al., 2003).

c) Les modulateurs allostériques

Outre les agonistes et les antagonistes, la fonction des récepteurs kaïnate peut être modifiée par des modulateurs allostériques. Les lectines issues des plantes comme la concanavaline A, l'agglutinine du soja et l'agglutinine des germes de blé ont été proposés comme bloqueurs de la désensibilisation des récepteurs kaïnate, étant plus efficaces sur les complexes homomériques de récepteurs (Partin et al., 1993; Wong and Mayer, 1993; Yue et al., 1995). Le blocage de la désensibilisation par la concanavaline A diffère entre agoniste complet et partiel (Fay and Bowie, 2006). Ces composés agissent en se liant à la chaîne carbohydrate latérale des récepteurs kaïnate, une N-glycosylation des récepteurs étant essentielle pour la modulation de l'activité du canal (Everts et al., 1997). Certains acides gras *cis*-insaturés, tels que l'acide arachidonique et l'acide docosahexanoïque, constituants majeurs des phospholipides membranaires dans le cerveau, peuvent agir comme bloqueurs des récepteurs kaïnate natifs (Wilding et al., 1998). Les acides gras membranaires bloquent la sous-unité GluK2(R) et les hétéromères GluK2(R)/GluK1(R) mais induisent une plus faible inhibition des

homomères GluK1 et des récepteurs kaïnate non-édités (Wilding, 2005) pour des raisons encore inconnues.

L'activation des récepteurs kaïnate nécessite la présence des ions Na^+ et Cl^- dans le milieu extracellulaire (Bowie, 2002; Paternain et al., 2003). La sous-unité GluK2 est sensible aux cations et anions monovalents (Bowie, 2002). Récemment, deux études ont montré, par cristallographie, que la sous-unité GluK2 possédait un site de liaison aux anions et aux cations, indépendants l'un de l'autre, que le Cl^- et le Na^+ lient respectivement (Plested and Mayer, 2007; Plested et al., 2008). La plupart des récepteurs kaïnate natifs et recombinants, à l'exception des hétéromères GluK2/GluK4, peuvent être inhibés par les protons d'une façon voltage-dépendante (Mott et al., 2003).

4) Rôle des récepteurs kaïnate dans la transmission synaptique à un stade mature

Les récepteurs kaïnate jouent de multiples rôles notamment dans l'intégration des réponses synaptiques, la plasticité synaptique, la régulation de la libération de neurotransmetteur et le contrôle de l'excitabilité neuronale.

a) Les récepteurs kaïnate postsynaptiques

La contribution des récepteurs kaïnate aux courants postsynaptiques excitateurs (EPSC) a été montrée pour la première fois au niveau de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 dans l'hippocampe (Castillo et al., 1997a; Vignes and Collingridge, 1997), grâce à l'utilisation du GYKI53655, un antagoniste non-compétitif des récepteurs AMPA et d'antagonistes des récepteurs NMDA. Les récepteurs kaïnate synaptiques peuvent être activés par une stimulation simple des fibres moussues, donnant lieu à des EPSC de faible amplitude (Castillo et al., 1997a) (**Figure 12B**).

Ces récepteurs sont composés des sous-unités GluK2, GluK5 et GluK4 (Mulle et al., 1998; Contractor et al., 2003; Fernandes et al., 2009). A la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3, les récepteurs kaïnate opèrent selon deux modes : ionotropique via la sous-unité GluK2 et métabotrope via la sous-unité GluK5 (**Figure 12A, B**). Cette dernière est indirectement couplée à une protéine G et son activation inhibe le courant potassique activé par le Ca^{2+} : I_{SAHP} , augmentant ainsi l'excitabilité des cellules pyramidales de CA3 (Fisahn et al., 2005; Ruiz et al., 2005). Il est intéressant de noter qu'en l'absence de la sous-unité GluK4, l'amplitude des EPSC portés par les récepteurs kaïnate à la fibre

moëuse est réduite et qu'en l'absence, à la fois de GluK4 et GluK5, elle est nulle (Fernandes et al., 2009). Ce résultat est surprenant car la sous-unité GluK2 est capable de former des récepteurs homomériques fonctionnels. La localisation de la sous-unité GluK2, en microscopie électronique, montre une réduction importante du nombre de récepteurs à la membrane plasmique accompagnée d'une forte réduction du ratio récepteurs membranaire/récepteurs cytosoliques chez les souris GluK4/GluK5^{-/-} (Fernandes et al., 2009). Cette étude suggère un rôle des sous-unités GluK4 et GluK5 dans l'incorporation de la sous-unité GluK2 à la membrane synaptique.

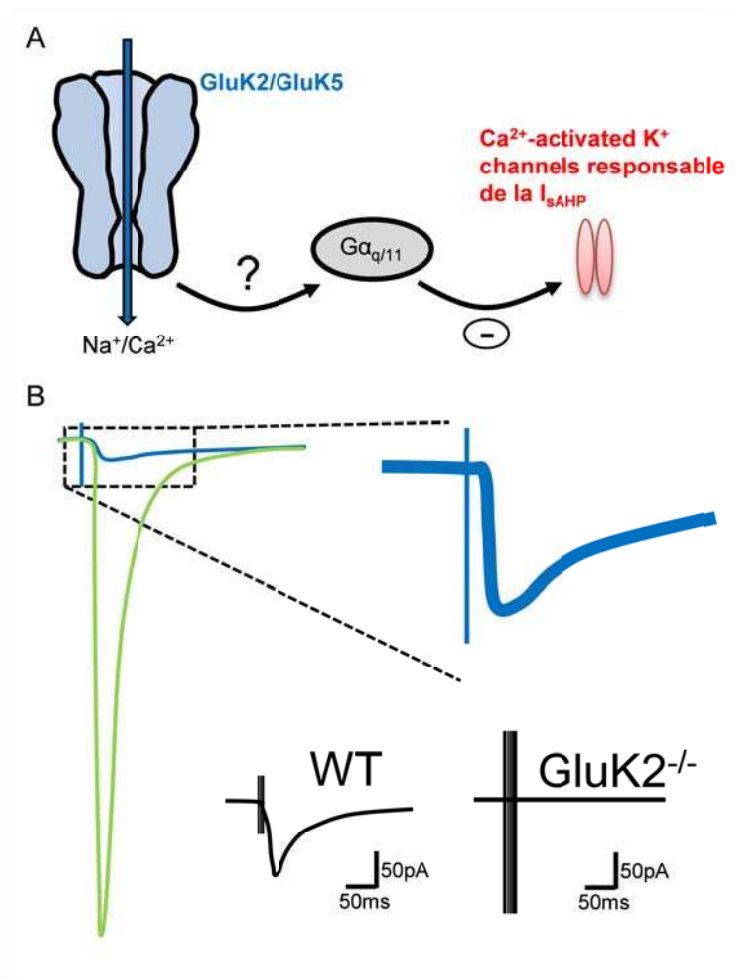


Figure 12 : Mode d'action ionotrope et métabotrope des récepteurs kaïnate à la synapse fibre moëuse dans l'hippocampe.

L'activation des récepteurs kaïnate postsynaptique induit une inhibition des canaux potassiques responsables de la I_{SAHP} (A). La sous-unité GluK5 est responsable de l'effet métabotrope car sa présence est nécessaire pour que la protéine $\text{G}\alpha_{q/11}$ se lie aux récepteurs kaïnate et module la I_{SAHP} . De plus, l'activation de ces récepteurs génère un courant postsynaptique excitateur (bleue) de faible amplitude en comparaison au courant induit par les récepteurs AMPA (vert) (B). La cinétique des réponses kaïnate est lente (agrandissement en haut à droite). Cette composante est absente chez les souris $\text{GluK2}^{-/-}$. D'après (Pinheiro and Mülle, 2006)

Les EPSC portés par les récepteurs kaïnate sont de faible amplitude, avec un temps de montée et une cinétique de désactivation lents suggérant que ces récepteurs pourraient être localisés au niveau extra-synaptique. Cependant, l'inhibition de la recapture de glutamate à la fibre moëuse, au niveau des synapses thalamocorticales ou des cellules de Golgi dans le cervelet n'augmente pas l'amplitude des

EPSC induits pas les récepteurs ni ne change leur cinétique (Castillo et al., 1997a; Vignes and Collingridge, 1997; Bureau et al., 2000; Kidd and Isaac, 2001).

La présence des récepteurs kaïnate au sein de la synapse est renforcée par le fait qu'ils sont détectables suite à la libération d'un quantum de glutamate à la synapse fibre moussue mais également au niveau des interneurons de CA1 (Cossart et al., 2002) et des synapses récurrentes entre fibre moussue et cellule granulaire (Epsztein et al., 2005). A cette dernière, les récepteurs kaïnate postsynaptiques permettent l'activation d'un courant sodique persistant (I_{NaP}), diminuant la précision temporelle des potentiels d'action au niveau des cellules granulaires (Epsztein et al., 2010). Les neurones GABAergiques de la région CA1 possèdent des récepteurs kaïnate composés de la sous-unité GluK1 (Cossart et al., 1998; Frerking, 1998; Christensen, 2004; Wondolowski and Frerking, 2009). L'activation synaptique de ces récepteurs, suite à un train de stimulations, entraîne une dépolarisation importante et prolongée des interneurons de CA1 (Frerking and Ohliger-Frerking, 2002), conduisant à une augmentation de la décharge des interneurons et à une inhibition tonique des cellules pyramidales de CA1 (Cossart et al., 1998). Les interneurons du *stratum oriens-lacunosum* exprimant la somatostatine, dans la région CA1 de l'hippocampe, sont les seuls interneurons possédant des récepteurs kaïnate postsynaptiques leur permettant ainsi de pouvoir décharger efficacement suite à la stimulation à la fréquence theta (6 – 10 Hz) des fibres glutamatergiques afférentes, contrairement aux autres types d'interneurons ne possédant pas ces récepteurs kaïnate postsynaptiques (Goldin et al., 2007).

De multiples régions cérébrales possèdent des récepteurs kaïnate synaptiques notamment les cellules de Golgi (Bureau et al., 2000) et les cellules de Purkinje dans le cervelet (Huang et al., 2004), les neurones pyramidaux et les interneurons du néocortex (Kidd and Isaac, 1999; Ali, 2003; Eder et al., 2003; Wu et al., 2005), la corne dorsale de la moelle épinière (Li et al., 1999), les cellules bipolaires « off » de la rétine (DeVries and Schwartz, 1999) et l'amygdale basolatérale (Li and Rogawski, 1998).

b) Les récepteurs kaïnate présynaptiques

La régulation de la libération de neurotransmetteur par les récepteurs kaïnate a été largement étudiée par application exogène d'agonistes pour ces récepteurs (Lerma, 2003). Selon le type de synapse et la concentration employée, ces agonistes peuvent soit faciliter, soit inhiber la libération de neurotransmetteur. Les mécanismes par lesquels ces agonistes agissent sont peu clairs, car l'application en bain des agonistes peut toucher la transmission synaptique de façon directe ou

indirecte. Au contraire, relativement peu d'études ont décrit le rôle des récepteurs kaïnate présynaptiques activés par le glutamate endogène.

✓ Les autorécepteurs

Les récepteurs kaïnate peuvent fonctionner comme des autorécepteurs présynaptiques c'est-à-dire étant activés par le glutamate libéré par la synapse qui les porte. Leur rôle a été beaucoup étudié à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 qui est une synapse présentant une forme caractéristique de plasticité à court-terme en condition de stimulations répétées. Cette synapse montre une facilitation robuste des EPSC en réponse à des stimulations en paire, ou bien lorsque la fréquence de stimulations est augmentée (0,1 à 3 Hz par exemple) (Salin et al., 1996). Il a été proposé que les récepteurs kaïnate jouent un rôle facilitateur lors de leur activation par le glutamate libéré par la fibre moussue (Schmitz et al., 2001). L'activation de ces récepteurs est rapide (10 ms). En présence de CNQX, un inhibiteur des récepteurs AMPA/kaïnate, la facilitation en fréquence, mesurée grâce aux EPSC induits par les récepteurs NMDA, est diminuée. La même diminution est observée lors de l'application de LY382884, un inhibiteur des récepteurs kaïnate contenant la sous-unité GluK1 (Lauri et al., 2001). Ces études suggèrent donc que la libération de glutamate synaptique peut activer des autorécepteurs présynaptiques facilitateurs.

La composition en sous-unité et le rôle des récepteurs kaïnate comme autorécepteurs facilitateurs ont été confirmés grâce à l'utilisation de souris déficientes pour les différentes sous-unités. La facilitation en paire et la facilitation en fréquence sont réduites chez les souris GluK2^{-/-} ou GluK3^{-/-} et non chez les souris GluK5^{-/-} ou GluK1^{-/-} (Contractor et al., 2001; Contractor et al., 2003; Pinheiro et al., 2007; Sachidhanandam et al., 2009). Suite à ces études, le rôle des récepteurs contenant la sous-unité GluK1 comme autorécepteurs présynaptiques a été remis en cause (Breustedt and Schmitz, 2004). De plus, l'ARNm de la sous-unité GluK1 n'est pas détecté dans les cellules granulaires du gyrus denté alors que les sous-unités GluK2 et GluK3 le sont fortement (Wisden and Seeburg, 1993; Bureau et al., 2000). Les récepteurs kaïnate présynaptiques, composés des sous-unités GluK2 et GluK3 (Pinheiro et al., 2007), facilitent la décharge des cellules pyramidales de CA3 lorsque les cellules granulaires déchargent à une fréquence de 1 à 50 Hz (Sachidhanandam et al., 2009). De plus, ces récepteurs facilitent la transmission d'information en réponse à des patrons de stimulation mimant l'activité *in vivo* des cellules granulaires. Ils facilitent également l'induction de la LTP associative au niveau des cellules pyramidales de CA3. Les récepteurs kaïnate ont été également impliqués dans la plasticité à long terme (LTP) de la synapse fibre moussue, qui est exprimée présynaptiquement (Bortolotto et al.,

1999b). Chez les souris GluK2^{-/-} ou GluK3^{-/-}, la LTP est présente mais diminuée (Contractor et al., 2001; Pinheiro et al., 2007). Les récepteurs ne sont donc pas essentiels pour la LTP des fibres moussues mais facilitent son induction car celle-ci nécessite des protocoles de stimulation plus importants, chez les souris GluK2^{-/-} et GluK3^{-/-}, pour induire un niveau de LTP comparable aux souris contrôles (Schmitz et al., 2003; Pinheiro et al., 2007).

Il a été proposé que les récepteurs kaïnate présynaptiques accomplissent leur rôle en dépolarisant la terminaison axonale et en facilitant l'entrée de Ca²⁺ (Kamiya et al., 2002; Pinheiro et al., 2007; Scott et al., 2008) permettant la libération de Ca²⁺ des réserves intracellulaires (Lauri et al., 2003; Scott and Rusakov, 2006; Scott et al., 2008). En effet, la phyllanthotoxine, un bloqueur des récepteurs perméables au Ca²⁺, diminue la facilitation présynaptique à court-terme chez les souris contrôles mais pas chez les souris déficientes pour la sous-unité GluK3 (Pinheiro et al., 2007). Cependant, aucune imagerie calcique n'a été réalisée chez les différentes souris déficientes pour les sous-unités des récepteurs kaïnate. Il serait intéressant de réaliser cette expérience chez les souris GluK2^{-/-} ou GluK3^{-/-}.

Les souris déficientes pour les sous-unités GluK4 et GluK5 présentent une facilitation en fréquence identique aux souris contrôles alors que la facilitation en paire est réduite chez ces souris (Fernandes et al., 2009). En revanche, la différence de facilitation est plus subtile que chez les souris GluK2^{-/-} ou GluK3^{-/-}. La localisation, en microscopie électronique, des sous-unités GluK2/GluK3 au niveau des terminaisons présynaptiques des fibres moussues montre une perte quasiment complète des récepteurs au niveau des zones actives et une diminution au niveau péri-synaptique chez les souris GluK4/GluK5^{-/-} par rapport aux souris contrôles. L'absence de récepteurs présynaptiques et de différence de facilitation en fréquence laisse penser que les récepteurs kaïnate ne participent pas à cette forme de plasticité. Cependant, la facilitation en fréquence est toujours diminuée chez les souris GluK4/GluK5^{-/-} et contrôles en présence de CNQX confirmant l'implication des récepteurs kaïnate présynaptiques. Il semblerait que les sous-unités GluK4 et GluK5 soient importantes pour la localisation des récepteurs kaïnate au niveau présynaptique, permettant ainsi leur activation lors de la libération de glutamate. La diminution de facilitation en paire chez les doubles KO suggère l'existence de populations différentes de récepteurs kaïnate présynaptiques activées par des concentrations de glutamate différentes.

Une étude a remis en cause le rôle des récepteurs kaïnate présynaptiques et leur participation à la facilitation à court terme à la fibre moussue (Kwon and Castillo, 2008b). Selon cette étude, l'effet facilitateur des récepteurs kaïnate serait dû à l'activité polysynaptique induite par les récepteurs kaïnate postsynaptiques. L'étude de Fernandes et al (2009) va à l'encontre de cette hypothèse. En effet, la

facilitation en fréquence est identique entre les souris contrôles et GluK4/GluK5^{-/-} alors que les souris KO ne présentent pas d'EPSC induits par les récepteurs kaïnate. De plus, une étude au laboratoire, à laquelle j'ai participé, montre que l'inhibition des EPSC induit par les récepteurs kaïnate à l'aide d'UBP310 (5 μ M) ne diminue pas la facilitation en fréquence, ni la facilitation en paire (**Pinheiro, Lanore et al., soumis ; Annexe 2**).

Le contrôle de la transmission synaptique par les récepteurs kaïnate a été observé dans d'autres structures que l'hippocampe. Dans le cervelet, la stimulation à faible fréquence (5 stimuli à 10 Hz) des fibres parallèles facilite la transmission glutamatergique par l'activation des récepteurs kaïnate présynaptiques, alors qu'une stimulation à haute fréquence (5 stimuli à 100 Hz) inhibe la transmission synaptique (Delaney and Jahr, 2002). La situation est différente au niveau des synapses entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje où la facilitation est observée à toutes les fréquences. Dans ce cas, l'effet des récepteurs kaïnate activés par le glutamate est également ionotropique. La différence entre les deux types de synapses faites par les fibres parallèles pourrait être due à une différence de composition en sous-unités des récepteurs kaïnate présynaptiques.

✓ Les hétérorécepteurs

Les récepteurs kaïnate présynaptiques sont aussi capables de fonctionner comme des hétérorécepteurs c'est-à-dire en étant activés par le glutamate libéré par la synapse voisine. Au niveau de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3, l'activation hétérosynaptique des récepteurs kaïnate en réponse à des trains de stimulations des fibres associatives/commissurales peut être inhibitrice suite à un train de stimulations à haute fréquence (10 stimuli à 200 Hz) ou facilitatrice suite à un train de stimulation plus court (3 stimuli à 200 Hz) (Schmitz et al., 2000; Schmitz et al., 2001). La sous-unité GluK5 est nécessaire pour cette forme de plasticité car les souris déficientes pour cette sous-unité ne présentent pas de facilitation hétérosynaptique (Contractor et al., 2003).

Comme la transmission glutamatergique, la transmission GABAergique dans l'hippocampe peut être modifiée par l'activation hétérosynaptique des récepteurs kaïnate. Un train de stimulations au niveau des collatérales de Schaffer, dans l'hippocampe, inhibe les courants postsynaptiques inhibiteurs évoqués (IPSC) dans les cellules pyramidales de CA1 (Min et al., 1999; Lourenco et al.) et augmente l'excitabilité neuronale via une dépolarisation induite par l'activation directe des récepteurs kaïnate (Semyanov and Kullmann, 2001). Cependant, des enregistrements en paires entre interneurons et cellules pyramidales de CA1 montre que suite à une stimulation haute fréquence des collatérales de Schaffer, les courants postsynaptiques inhibiteurs sont augmentés (Jiang et al., 2001). Il a été

récemment montré que l'inhibition de la transmission GABAergique est due à une action concertée entre le système endocanabinoïde et les récepteurs kaïnate, via la sous-unité GluK1, alors que l'effet facilitateur se produit au niveau des synapses dépourvues d'endocanabinoïdes (Lourenco et al., 2010). Dans l'hypothalamus, l'activation des récepteurs kaïnate contenant la sous-unité GluK1, par le glutamate ambiant, facilite la libération de GABA sur les neurones à oxytocine et à vasopressine (Bonfardin et al., 2010). L'augmentation de la concentration de glutamate ambiant, suite à une réduction de la couverture gliale, entraîne une inhibition de la libération de GABA. La facilitation est associée à un mode ionotrope car l'activation des récepteurs kaïnate est bloquée par la phyllanthotoxine (bloquant les récepteurs perméables au Ca^{2+}) alors que l'inhibition est bloquée par le U73122, un bloqueur de la PKC (activée par des protéines G).

Durant les dix dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au rôle des récepteurs kaïnate dans la régulation de l'activité synaptique. Plusieurs d'entre elles suggèrent également un rôle de ces récepteurs dans la modulation de la transmission synaptique au cours de la maturation. Ces récepteurs, comme à des stades matures, peuvent être localisés au niveau pré- et postsynaptique, agir selon un mode ionotrope mais également métabotrope.

5) Les récepteurs kaïnate au cours du développement post-natal

a) Expression

L'expression précoce des différentes sous-unités au sein du SNC suggère l'implication de ces récepteurs au cours des étapes précoces de développement post-natal (Bettler et al., 1990; Bahn et al., 1994; Ritter et al., 2002). La sous-unité GluK1 est celle présentant le plus de changements en terme d'expression notamment dans l'hippocampe où son expression diminue après la première semaine de vie post-natale (Ritter et al., 2002). Le niveau d'édiction des sous-unités GluK1 et GluK2 change également au cours de la maturation (Bernard et al., 1999). Dans l'hippocampe, le cervelet, le cortex, le bulbe olfactif et dans les ganglions de la corne dorsale de la moelle épinière, la sous-unité GluK1 est majoritairement sous la forme non-éditée (Q) c'est-à-dire perméable au Ca^{2+} . Quant à elle, la sous-unité GluK2, dans ces différentes structures, est principalement éditée c'est-à-dire imperméable au Ca^{2+} .

Les récepteurs kaïnate sont fortement exprimés au cours du développement et leur activation, notamment celle de la sous-unité GluK1, peut conduire à une entrée de Ca^{2+} dans les neurones permettant l'activation de cascades de signalisation intracellulaire.

b) Rôle des récepteurs kaïnate au cours de la maturation

✓ Au niveau du colliculus supérieur

L'ouverture des yeux, chez le rongeur, est une période intense d'affinement synaptique au cours duquel les réponses synaptiques NMDA et AMPA sont augmentées. L'amplitude de la réponse augmente rapidement puis durant les deux semaines consécutives à l'ouverture des yeux, l'amplitude des réponses diminue. Il a été montré récemment qu'une composante kaïnate postsynaptique facilite l'activation des récepteurs NMDA car, à cette période, la composante kaïnate désensibilise beaucoup plus lentement que la composante AMPA (van Zundert et al.). Cette composante kaïnate est transitoire et disparaît au cours de la maturation.

✓ Au niveau des synapses thalamocorticales

Au niveau de la couche IV du cortex somatosensoriel, les synapses thalamocorticales en développement présentent des récepteurs kaïnate postsynaptiques (Kidd and Isaac, 1999). Durant la première semaine de vie post-natale, cette composante kaïnate synaptique diminue. Une diminution similaire de cette composante a lieu lors de l'induction d'un protocole de LTP montrant l'existence d'une régulation activité-dépendante des récepteurs kaïnate postsynaptiques. L'analyse de la transmission synaptique suite à la libération d'un quantum de glutamate a montré que les récepteurs AMPA et kaïnate ne coexistaient pas au sein d'une même synapse (Bannister et al., 2005). Au cours du développement, il y a une augmentation de la contribution de la composante AMPA et une diminution de la composante kaïnate. Cette augmentation n'est pas due à un changement de conductance des récepteurs AMPA, ni à une augmentation du quantum mais bien à une augmentation du nombre de récepteurs AMPA.

Au cours de la même période de développement, des autorécepteurs kaïnate présynaptiques induisent une dépression à court terme suite à un train de stimulations à haute fréquence (5 stimuli à 100 Hz) (Kidd et al., 2002). Comme au niveau postsynaptique, ce mécanisme de dépression disparaît après la première semaine de vie post-natale permettant le transfert d'information sensoriel, du thalamus vers le

cortex, à haute fréquence au niveau des synapses. La sous-unité GluK1 a été impliquée dans ce phénomène de dépression car le LY382884 le bloque.

Ces différentes études montrent un rôle des récepteurs kaïnate dans la régulation de la transmission synaptique, notamment au niveau présynaptique. Cependant, plusieurs questions restent non résolues. Quelle(s) sous-unité(s) compose(nt) les récepteurs kaïnate postsynaptiques aux synapses thalamocorticales ? Quel rôle joue cette composante postsynaptique durant la première semaine de vie post-natale ? Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de ce changement de sous-unités ?

✓ Dans l'hippocampe

Une première étude en 2003 (Tashiro et al., 2003) a montré une régulation bidirectionnelle de la motilité des filopodes des fibres moussues suite à l'activation des récepteurs kaïnate dans des cultures de tranches d'hippocampe. L'activation des récepteurs kaïnate augmente la motilité des filopodes facilitant l'exploration de l'environnement par ces derniers. A des stades plus matures (20 – 22 jours *in vitro*), l'activation des récepteurs diminue leur motilité permettant une stabilisation des contacts synaptiques. La libération synaptique de glutamate peut reproduire les effets observés avec les agonistes des récepteurs kaïnate. Cependant, ni les mécanismes régulant la motilité ni la localisation des récepteurs kaïnate et leur composition en sous-unités ne sont connus.

L'activité spontanée de réseau est une des propriétés de l'hippocampe en développement (Ben-Ari et al., 1989). Cette activité se définit par des bouffées d'activité, induites par les récepteurs du glutamate et rythmée par des conductances induites par les récepteurs GABA_A, que l'on appelle des GDPs (Khazipov et al., 1997). Cette activité permet la synchronisation de l'ensemble du réseau (Crépel et al., 2007) et joue un rôle important dans le développement des circuits neuronaux (Zhang and Poo, 2001). En effet, durant la première semaine de vie post-natale l'activation des récepteurs GABA_A ne conduit pas une inhibition mais à une excitation (Ben-Ari, 1997). Cette dépolarisation n'est pas due à un changement de propriétés des récepteurs GABA_A mais une augmentation de la concentration en Cl⁻ intracellulaire (Ben-Ari, 1997). Les GDPs sont générés au niveau de l'hippocampe (Leinekugel et al., 1998) et plus particulièrement au niveau de la région CA3 (Khazipov et al., 1997). Dans les cellules pyramidales de CA3, les GDPs permettent la levée du blocage Mg²⁺ des récepteurs NMDA et donc l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire (Leinekugel et al., 1997).

L'activation de la sous-unité GluK1 par le glutamate ambiant dans l'hippocampe en développement (P3 – P6) atténue cette activité de réseau (Lauri, 2005). Au niveau des synapses contactant les cellules pyramidales, l'activation des récepteurs kaïnate inhibe la libération de glutamate via l'activation des protéines G et de l'activation de la PKC. Sur les terminaisons glutamatergiques des interneurons de CA3, les récepteurs kaïnate présynaptiques facilitent la libération via un mécanisme indépendant des protéines G. En revanche, sur les deux types de cellules, l'activation des récepteurs kaïnate augmente la transmission inhibitrice. En conclusion, l'activation des récepteurs kaïnate postsynaptiques diminue la transmission glutamatergique sur les interneurons, diminuant ainsi la synchronisation et les bouffées d'activité du réseau. De plus, l'application d'une faible concentration de kaïnate pour activer les récepteurs kaïnate contenant les sous-unités à forte affinité pour l'agoniste, GluK4 et GluK5, conduit à une augmentation des bouffées d'activité dans la région CA3 de l'hippocampe via une augmentation de la probabilité de décharge des cellules pyramidales (Juuri et al., 2010). Une étude récente, à laquelle j'ai participé, au niveau des interneurons *du stratum lucidum* dans la région CA3, a montré que l'activation des récepteurs kaïnate contenant la sous-unité GluK1 par le glutamate ambiant inhibe la I_{mAHP} via un mécanisme impliquant les protéines G (Segerstrale et al., 2010 ; **Annexe 1**). Cette inhibition induit une augmentation de l'excitabilité des interneurons et disparaît au cours de la maturation.

La régulation de l'activité synaptique par les récepteurs kaïnate a été également étudiée au niveau des cellules pyramidales de CA1 et des synapses faites par les collatérales de Schaffer. La probabilité de libération à cette synapse est très faible durant les stades précoces de développement. Cette régulation de la probabilité de libération est contrôlée par des récepteurs kaïnate présynaptiques, contenant la sous-unité GluK1, par un mécanisme de type métabotrope (Lauri et al., 2006; Sallert et al., 2007). Ces récepteurs sont activés par le glutamate ambiant et diminuent la probabilité de transmission d'information à haute fréquence. Suite à l'induction de LTP, l'activation tonique des récepteurs kaïnate est perdue entraînant une augmentation de la probabilité de libération (Lauri et al., 2006). De plus, l'application de BDNF sur des tranches immatures augmente la transmission synaptique glutamatergique au niveau de CA1 occluant l'effet inhibiteur des récepteurs kaïnate (Sallert et al., 2009). Inversement, les souris déficientes pour le BDNF présentent une persistance de cette inhibition au cours de la maturation. Chez des souris ne possédant pas d'activité du récepteur au BDNF, TrkB, la perte d'inhibition des récepteurs kaïnate suite à un protocole de LTP est perdue. Cette étude montre que l'activation et la maturation de la voie BDNF/TrkB est importante pour la perte d'inhibition de la probabilité de libération par les récepteurs kaïnate (Sallert et al., 2009). Les récepteurs kaïnate régulent l'activité des interneurons de CA1. L'activation de ces récepteurs produit deux effet :

une augmentation de la fréquence des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés due à l'activation de récepteurs somato-dendritiques et axonaux et une réduction de la libération synaptique GABAergique évoquée par une activation directe des récepteurs kaïnate localisés au niveau des terminaisons présynaptiques (Maingret, 2005). Quelles sont les conséquences physiologiques de cette signalisation des récepteurs kaïnate ? Une étude a montré que l'activation prolongée (16 – 20 h) des récepteurs kaïnate contenant la sous-unité GluK1, dans des tranches de cerveau en culture, augmentait le nombre de synapses glutamatergiques et non GABAergiques dans la région CA1 de l'hippocampe (Vesikansa et al., 2007).

L'activation de la sous-unité GluK1 des récepteurs kaïnate diminue également la probabilité de libération de neurotransmetteur à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 entre P2 et P5 (Caiati et al., 2010). Comme au niveau de la région CA1 et des interneurons de CA3, les récepteurs sont activés par le glutamate ambiant et inhibent la libération de neurotransmetteur via les protéines G et la voie PKC. En présence d'inhibiteur des protéines G ou de la PKC, l'activation des récepteurs kaïnate contenant la sous-unité GluK1 augmente la probabilité de libération via un mode ionotrope. Son activation dépolarise la terminaison présynaptique en permettant l'entrée de Ca^{2+} .

Ces études montrent que les récepteurs kaïnate et notamment la sous-unité GluK1, participent à la régulation de l'activité synaptique et de réseau durant les étapes précoces de développement post-natal. Quelles sont les conséquences en terme de développement de la délétion de la sous-unité GluK1 ? Qu'est-ce qui peut expliquer, d'un point de vue moléculaire, la signalisation (protéine G et ionotrope) et la régulation différente (inhibition ou facilitation) entre synapses alors que la même sous-unité (GluK1) est activée ? Est-elle associée à GluK5 ? Le couplage en aval du récepteur est-il différent ? Y a-t-il un changement dans la localisation des récepteurs ? Quelles sont les conséquences physiologiques ?

Une étude a montré que les souris déficientes, à la fois, pour les sous-unités GluK1 et GluK2 présentaient une maturation incorrecte de la transmission synaptique à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 (Marchal and Mulle, 2004). L'augmentation de la transmission synaptique induite par les récepteurs AMPA et l'apparition des propriétés de plasticité présynaptique à court terme à cette synapse est corrélée à la présence d'une composante kaïnate postsynaptique. **Durant ma thèse, j'ai étudié l'effet de la délétion de la sous-unité GluK2 sur la maturation fonctionnelle des synapses fibre moussue. J'ai également étudié la maturation morphologique de cette synapse car l'activité est un facteur important dans la mise en place et la maturation des contacts synaptiques. Pour répondre à ces différentes questions, j'ai étudié la maturation**

morphologique et fonctionnelle de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 dans l'hippocampe. Cette synapse présente des caractéristiques intéressantes pour l'étude de la maturation synaptique que je vais décrire dans le chapitre suivante

V. La synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3

L'hippocampe fait partie du système limbique et joue un rôle important dans les phénomènes de mémoire. La formation hippocampique peut se diviser en trois régions : le subiculum, le gyrus dentelé (DG) et les Cornes d'Ammon (CA1, CA2 et CA3). Les cellules principales (cellules granulaires du gyrus dentelé, cellules pyramidales de CA3 et CA1) sont interconnectées par des synapses glutamatergiques donnant lieu à un circuit trisynaptique (**Figure 13A**).

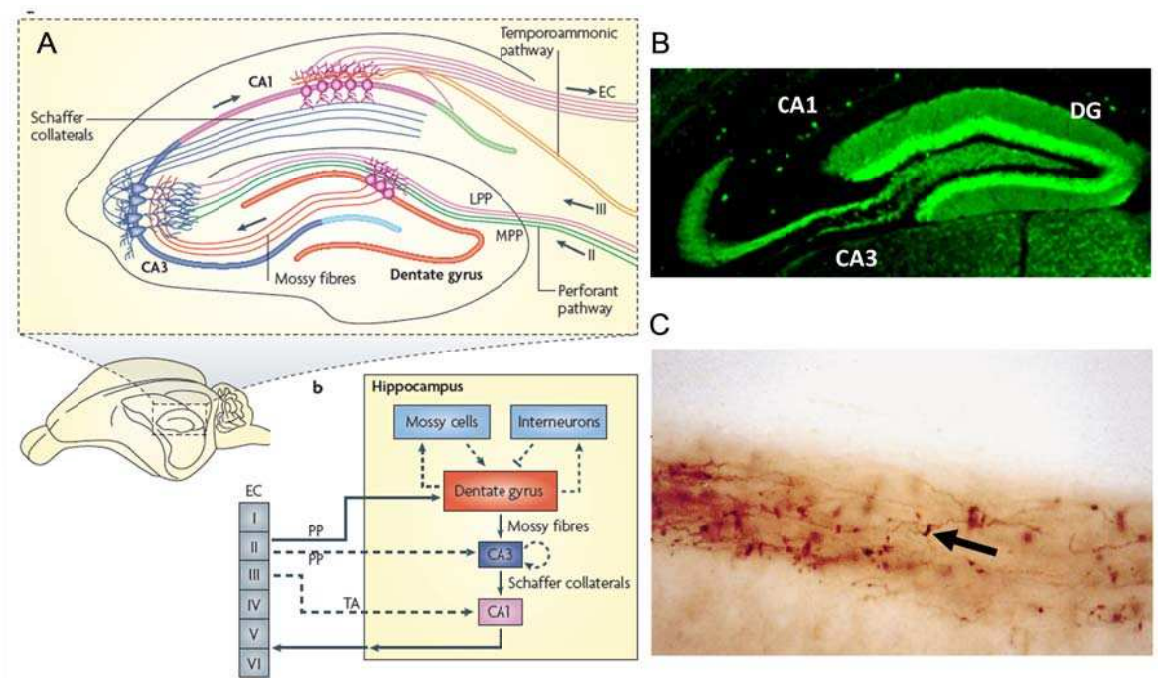


Figure 13 : Le circuit hippocampique.

(A) Illustration du circuit hippocampique et du réseau comprenant les afférences du cortex entorhinal (EC) (en bas). PP : voie perforante latérale (LPP) et médiane (MPP) D'après (Deng et al., 2010) (B) Immunohistochimie contre la Calbindin D28k (marqueur des fibres moussues et des cellules granulaires contenues dans le gyrus dentelé (DG)) révélée par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. (C) Même marquage mais révélé à la DAB. Les fibres moussues sont restreintes dans le *stratum lucidum*. La flèche indique une terminaison présynaptique.

Les cellules granulaires reçoivent des afférences glutamatergiques de la couche II du cortex enthorinal via les fibres de la voie perforante. Les cellules pyramidales de CA3 reçoivent trois types d'afférences glutamatergiques : des fibres de la voie perforante, des fibres associatives/commissurales (A/C) provenant des cellules pyramidales de CA3 ipsilatérales (fibres associatives) ou contralatérales (fibres commissurales) et des fibres moussues qui sont les axones des cellules granulaires. Les cellules pyramidales de CA3 projettent leurs axones sur les cellules pyramidales de CA1 via les collatérales de Schaffer (**Figure 13A**).

A. Vue d'ensemble de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3

Chaque cellule granulaire (un million chez le rat) donne lieu à un unique axone non myélinisé que l'on nomme fibre moussue (Henze et al., 2000). Après avoir quitté la couche granulaire, la fibre moussue émet de fines collatérales qui viennent contacter les interneurons et les cellules moussues (mossy cells = neurones excitateurs) contenus dans le hilus (Acsady et al., 1998). Les cellules moussues contactent en retour les cellules granulaires ipsi- et contralatérales (Acsady et al., 1998). L'axone principal de la fibre moussue sort du hilus et se projette dans une couche étroite (100 μ M) dans la région CA3 que l'on nomme *stratum lucidum* (**Figure 13B, C**). Les fibres moussues forment des synapses *en passant* et contactent les cellules pyramidales de CA3 au niveau de leur dendrite proximale (Gonzales et al., 2001). Les cellules pyramidales de la région CA3c reçoivent également des fibres moussues au niveau de leurs dendrites basales que l'on nomme fibres moussues infra-pyramidales. En dehors de ces régions, c'est-à-dire au niveau des dendrites apicales et basales, les synapses des cellules pyramidales de CA3 sont similaires à celles que l'on peut trouver sur les cellules pyramidales de CA1. Chaque fibre moussue forme environ dix synapses avec les cellules moussues et contacte de 11 à 18 cellules pyramidales de CA3 (Henze et al., 2000). La fibre moussue dans la région CA3 contacte également des interneurons inhibiteurs via des filopodes émergeant des terminaisons présynaptiques (40 à 50 synapses par fibre moussue). La terminaison présynaptique d'une fibre moussue peut donner lieu jusqu'à neuf filopodes. La longueur moyenne de ces filopodes varie au cours du développement allant jusqu'à 30 μ m chez le rat de deux semaines puis 12 μ m à quatre semaines. Chaque cellule pyramidale de CA3 reçoit environ cinquante synapses provenant des fibres moussues, chacune d'une cellule granulaire différente (Henze et al., 2000).

B. Mécanismes moléculaires de la ségrégation des fibres moussues

Les mécanismes moléculaires induisant la projection laminaire restreinte des fibres moussues dans le stratum lucidum sont gouvernés, entre autre, par le système des Plexines et des Sémaphorines (Suto et al., 2007). Les Plexines-A2 et -A4 sont les récepteurs de la Sémaphorine 6A. L'expression de Plexine-A4 par les fibres moussues permet à ces fibres de ne pas migrer dans la couche où les cellules pyramidales de CA3 expriment la Sémaphorine 6A, c'est-à-dire hors du *stratum lucidum*. L'effet répulsif de la Sémaphorine 6A dans le *stratum lucidum* est atténué par l'expression de Plexine-A2 dans cette région par les cellules pyramidales (Suto et al., 2007). Récemment, il a été montré que la Sémaphorine 6B, exprimée par les cellules pyramidales de CA3, jouait un rôle dans l'effet répulsif et donc la migration des fibres moussues dans le *stratum lucidum* (Tawarayama et al., 2010). Les nectine-1 et -3 jouent, quant à elles, un rôle dans la migration des fibres, plus particulièrement les infra-pyramidales (Honda et al., 2006), comme les NCAM (Cremer et al., 1997; Cremer et al., 1998), la voie de signalisation du BDNF (Tamura et al., 2006; Tamura et al., 2009), la Cadhérine-8 et la N-Cadhérine (Bekirov et al., 2008).

C. Morphologie de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3

1) Chez l'adulte

Morphologiquement, les fibres moussues forment d'énormes terminaisons présynaptiques (4 à 10 µm de diamètre) aussi bien avec les cellules moussues que les cellules pyramidales de CA3. Dans la région CA3, ces synapses sont *en passant* ou attachées à l'axone à l'aide d'une extension. Chaque terminaison présynaptique englobe une structure postsynaptique que l'on appelle excroissance épineuse (**Figure 14A, B**). Ces deux structures, bouton présynaptique et excroissance épineuse sont ancrées l'une à l'autre à l'aide de jonctions adhérentes ou *puncta adherentia*. Ces *puncta adherentia* sont composés de différentes protéines d'adhésion comme la nectine-1, la nectine-3 (Mizoguchi, 2002), l'afadine (Majima et al., 2009), la S-SCAM, la N-Cadhérine et l'αN-caténine (Takai, 2003; Takai et al., 2003; Yamada et al., 2003; Honda et al., 2006).

Ce complexe donne lieu à une synapse géante composée de multiples zones actives, en moyenne 25 (entre 7 et 45) faisant toutes face à des densités postsynaptiques (Amaral and Dent, 1981;

Rollenhagen et al., 2007) (**Figure 14B**). La taille des zones actives varie entre $0,07$ et $0,17 \mu\text{m}^2$ (en moyenne, $0,1 \mu\text{m}^2$) et sont distantes d'environ $0,45 \mu\text{m}$. Chaque complexe synaptique est séparé l'un de l'autre par des cellules gliales cependant leurs fines extensions n'atteignent jamais les zones actives (Rollenhagen et al., 2007) favorisant la diffusion de glutamate entre les sites de libération. En moyenne un bouton présynaptique contient 20400 vésicules synaptiques : environ 900 vésicules sont proches de la zone active (60 premiers nm), environ 4400 entre 60 et 200 nm et le reste forme le pool de réserve (Rollenhagen et al., 2007).

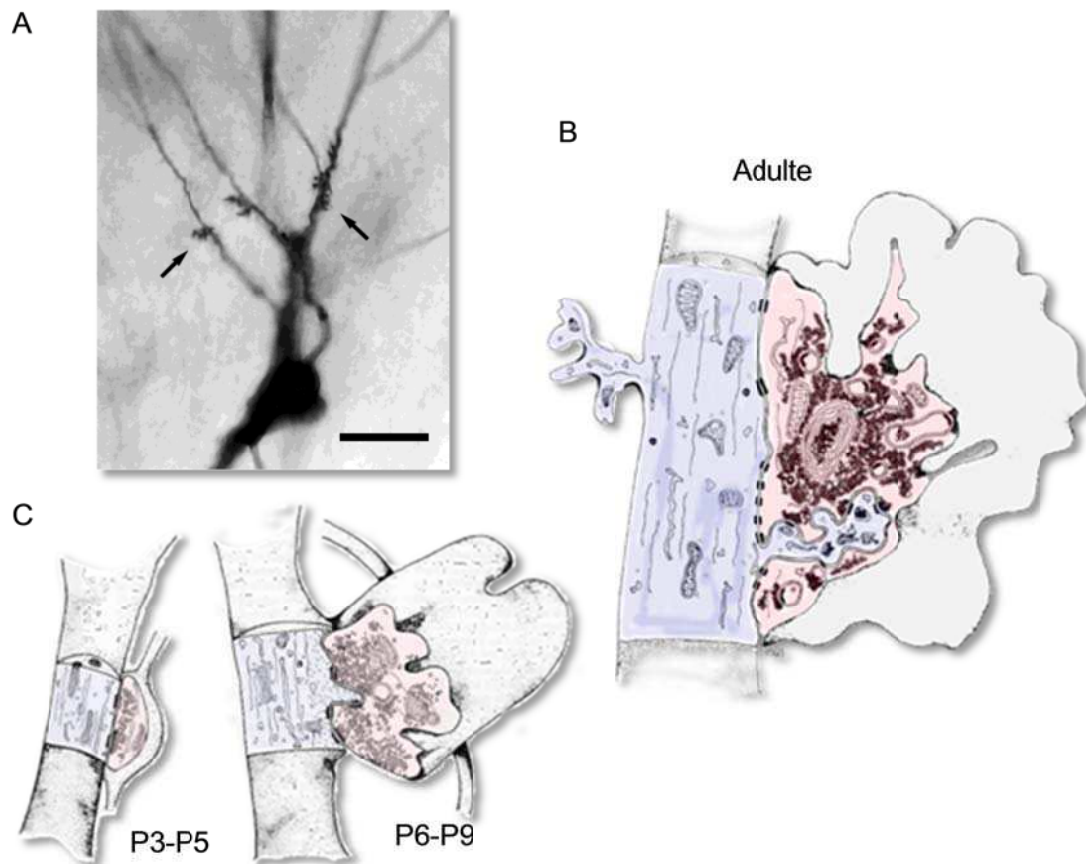


Figure 14 : Distribution et morphologie des excroissances épineuses.

(A) Cellule pyramidale de CA3 révélée à la DAB après avoir été remplie, grâce à une pipette en verre, de peroxydase. Les flèches indiquent des excroissances épineuses sur la dendrite proximale de cellule pyramidale de CA3. Echelle $25 \mu\text{m}$ D'après (Gonzales et al., 2001) (B) Représentation d'une synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 à un stade adulte et (C) au cours du développement post-natal. La post-synapse est colorée en bleu et la pré-synapse en rouge. A P6 – P9, des structures postsynaptiques viennent s'ancrer dans les terminaisons présynaptiques et deviennent des excroissances épineuses à un stade adulte. D'après (Amaral and Dent, 1981)

2) Au cours de la maturation

A ce jour, une seule étude a décrit la maturation morphologique de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 chez le rat par microscopie électronique (Amaral and Dent, 1981) (**Figure 14C**). Ces synapses se développent durant la période post-natale suivant des étapes de maturation morphologique bien définies. Les fibres moussues sont présentes au niveau du *stratum lucidum* à partir de P3 sans terminaisons présynaptiques apparentes. Cependant, à partir de P1, de petites extensions de fibres moussues font des contacts symétriques et asymétriques avec les dendrites des cellules pyramidales de CA3. Les terminaisons présynaptiques apparaissent à partir de P7 tout au long des axones et se complexifient jusqu'à P14. La partie postsynaptique des synapses fibre moussue/cellule pyramidale de CA3, les excroissances épineuses, n'émergent des dendrites proximales des cellules pyramidales de CA3 qu'à partir de P9. A partir de P21, cette synapse semble mature car peu de changements interviennent jusqu'au stade adulte (420 jours) (Amaral and Dent, 1981). Cependant, à P28, les vésicules sont distribuées dans l'ensemble de la terminaison présynaptique alors que chez l'adulte (3 – 4 mois), les vésicules synaptiques sont organisées en agrégats de taille variable (Rollenhagen et al., 2007). Au cours de la maturation, le nombre de sites de libération augmente progressivement, allant d'une seule zone active à P1-3 à plusieurs chez l'adulte (Amaral and Dent, 1981).

D. Synaptogenèse des fibres moussues en condition normale et pathologique chez l'adulte

La synaptogenèse des fibres moussues a été étudié en utilisant des cultures organotypiques d'hippocampe. Les filopodes présents au niveau des fibres moussues lors de leur migration sont très mobiles et cette mobilité est régulée par l'activation des récepteurs kaïnate (Tashiro et al., 2003). Après deux semaines en culture, les fibres moussues forment des connections synaptiques normales avec les dendrites des cellules pyramidales de CA3 (Dailey et al., 1994). L'inhibition des récepteurs du glutamate de type AMPA, kaïnate et NMDA n'empêche pas la formation des contacts synaptiques des fibres moussues ni n'altère l'ultrastructure des synapses (Qin et al., 2001). Les synapses fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 peuvent donc se mettre en place et se développer grâce à des mécanismes indépendants de l'activation des récepteurs du glutamate.

L'hippocampe, comme le bulbe olfactif, est un lieu de forte neurogenèse chez l'adulte (Ming and Song, 2005). Les neurones nouvellement formés du gyrus dentelé contactent les cellules pyramidales de CA3 et forment, d'un point de vue morphologique, des complexes synaptiques semblables à ceux se développant au cours de la maturation et pouvant libérer du glutamate (Toni et al., 2008).

Suite à des crises d'épilepsie brèves et répétées, les fibres moussues forment des synapses récurrentes au niveau des cellules granulaires du gyrus dentelé (Sutula et al., 1988; Sutula and Dudek, 2007). Ces nouvelles synapses augmentent l'activité de réseau par une activité réverbérante, ce qui favorise l'apparition des crises d'épilepsie. Ces synapses récurrentes ont été caractérisées d'un point de vue fonctionnel, et comme sur les cellules pyramidales de CA3, ces synapses possèdent une composante kaïnate postsynaptique (Epsztein et al., 2005).

E. Plasticité structurale

Contrairement aux synapses dites classiques comme les épines dendritiques des cellules pyramidales de CA1, très peu d'études se sont intéressées à la plasticité structurale de ces synapses. Une fibre moussue contient de dix à quinze terminaisons présynaptiques, toutes différentes en terme de complexité (Galimberti et al., 2006). Des souris soumises à un environnement enrichi présentent une augmentation du nombre, de la complexité de ces terminaisons et une stabilisation de ces structures. Ce phénomène est dépendant de l'activité synaptique et plus précisément de la libération de neurotransmetteur de la fibre moussue et de l'activation de la PKC. De plus, cette étude a montré que plus de la moitié des terminaisons présynaptiques présentaient des présynapses « satellites ». Ces satellites ont toutes les caractéristiques d'une terminaison présynaptique car ils possèdent des filopodes et contactent les cellules pyramidales de CA3. Les souris élevées en milieu enrichi possèdent plus de « satellites ». L'augmentation du nombre de synapses et de la complexité, par enrichissement du milieu, implique l'augmentation de l'expression et de la libération de Wnt7a/b de la part des cellules pyramidales de CA3 (Gogolla et al., 2009). L'augmentation du volume des terminaisons fait intervenir la voie de signalisation Rab3a. Toutes les fibres moussues ne possèdent pas de terminaisons « satellites » car il existe une spécification topographique dans l'hippocampe basée sur la position des cellules granulaires dans le gyrus dentelé et l'expression d'EphA4 (Galimberti et al., 2010). Les cellules granulaires exprimant EphA4 possèdent plus de deux « satellites » par terminaison.

Il a été récemment montré que les souris rendues épileptiques possèdent des terminaisons présynaptiques plus complexes et plus volumineuses possédant plus de « satellites » (Danzer et al., 2010), alors que le nombre d'excroissances épineuses sur les dendrites des cellules pyramidales de CA3 diminue (McAuliffe et al., 2009).

F. Transmission et plasticité synaptique

1) Transmission synaptique

La synapse entre fibre moussue et cellule pyramidale de CA3 libère du glutamate qui active des récepteurs ionotropiques postsynaptiques AMPA, NMDA et kaïnate (Jonas et al., 1993; Castillo et al., 1997a; Vignes and Collingridge, 1997; Mulle et al., 1998) et des récepteurs ionotropiques présynaptiques kaïnate (Contractor et al., 2001) (**Figure 15**). Le glutamate libéré peut également activer des récepteurs métabotropiques présynaptiques, appartenant au groupe II et postsynaptiques, appartenant au groupe I (Kamiya et al., 1996; Heuss et al., 1999). Cette synapse est facilement accessible à l'expérimentation car il est possible de stimuler une seule fibre moussue en appliquant un protocole de stimulation minimale (Jonas et al., 1993; Marchal and Mulle, 2004; Sachidhanandam et al., 2009). De plus, l'application en bain d'un agoniste des récepteurs métabotropiques du groupe II inhibe spécifiquement la réponse synaptique induite par la stimulation des fibres moussues et non des fibres associatives commissurales, permettant de vérifier la spécificité de l'enregistrement (Salin et al., 1996).

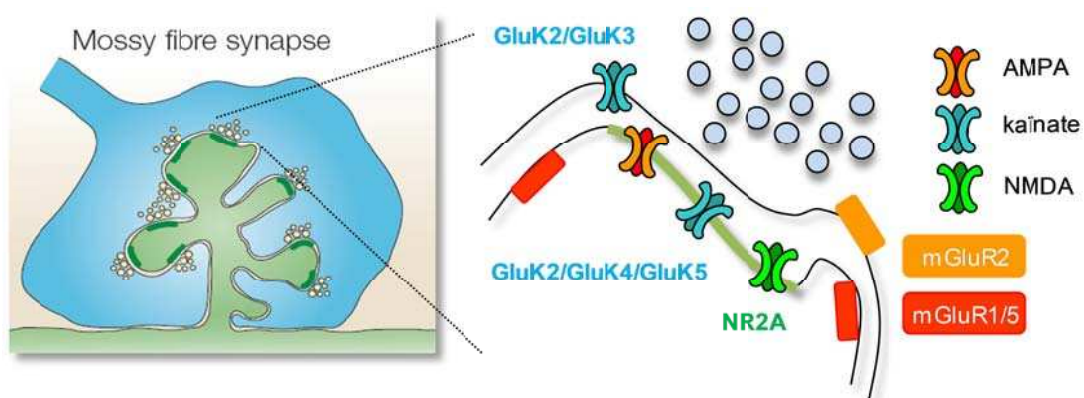


Figure 15 : Composition des récepteurs du glutamate pré- et postsynaptiques à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3.

La composition en sous-unité des récepteurs kaïnate pré- et postsynaptiques est connue : GluK2/GluK4/GluK5 au niveau postsynaptique et GluK2/GluK3 au niveau présynaptique (Pinheiro et al., 2007; Sachidhanandam et al., 2009). Ces récepteurs sont concentrés au niveau du *stratum lucidum* (Castillo et al., 1997a) et apparaissent à une période critique de maturation fonctionnelle de la synapse fibre moussue c'est-à-dire entre P6 et P9 (Marchal and Mulle, 2004). L'apparition de cette composante est étroitement corrélée à l'augmentation de la transmission synaptique induite par les récepteurs AMPA durant cette période (Marchal and Mulle, 2004). Le ratio de l'amplitude des EPSC AMPA/kaïnate reste constant entre P6 et P15, représentant environ 6 - 7 % de la réponse synaptique, puis diminue entre P16 et P21, pour atteindre entre 4 et 5% (Marchal and Mulle, 2004; Sachidhanandam et al., 2009). La composition en sous-unité AMPA et NMDA n'est pas connue. Les récepteurs AMPA ne sont pas perméables au Ca^{2+} à partir de P17 (Jonas et al., 1993; Ho et al., 2007) mais le sont entre P11 et P17 (Ho et al., 2007). L'expression des récepteurs NMDA à cette synapse a très peu été étudiée. La contribution des récepteurs NMDA aux EPSC induits par les fibres moussues est inférieure à celle des EPSC induits au niveau des fibres associatives/commissurales (Kakegawa et al., 2004). Une seule étude a analysé la cinétique des réponses NMDA à la fibre moussue au cours de la maturation et a montré qu'à P7, les EPSC sont plus lents qu'à P32 suggérant la présence de la sous-unité GluN2B ou GluN2D tôt durant le développement (Khazipov et al., 1995). De plus, des marquages immunohistologiques ont montré que la sous-unité GluN2A était présente dans le *stratum radiatum* et le *stratum lucidum* alors que la sous-unité GluN2B est totalement exclue de ce dernier à l'âge adulte (Fritschy et al., 1998; Watanabe et al., 1998). Une étude au laboratoire montre qu'à un stade mature (P17-21), les récepteurs NMDA à la synapse fibre moussue sont composés uniquement de la sous-unité GluN2A (Bettadapura et al., In preparation).

La fibre moussue est une synapse excitatrice glutamatergique mais il a été montré qu'elle libère également du GABA qui agit sur des récepteurs GABA_A pré- (Ruiz et al., 2003) et postsynaptiques (Walker et al., 2001). Durant la première semaine de vie post-natale chez le rat, la fibre moussue libère majoritairement du GABA (Safiulina et al., 2006). La majorité des fibres libèrent uniquement du GABA alors que certaines libèrent à la fois du GABA et glutamate ou uniquement du glutamate. La probabilité de libération à ces synapses est très faible à cause de l'activation de récepteurs kaïnate présynaptiques contenant la sous-unité GluK1 par le glutamate ambiant (Caiati et al., 2010) et de récepteurs GABA_B présynaptiques activés par du GABA ambiant (Safiulina and Cherubini, 2009).

2) Plasticité à court-terme

La probabilité de libération à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 est très faible lorsque la fréquence de stimulation est comprise entre 0,05 et 0,1 Hz, se traduisant par un grand nombre d'échecs de la transmission synaptique à ces fréquences (Salin et al., 1996) (**Figure 16A**). Il a été proposé que l'activation tonique des récepteurs à l'adénosine A1 est responsable de la faible probabilité de libération initiale (Moore et al., 2003), mais une étude a remis en cause l'hypothèse de l'adénosine (Kukley et al., 2005). Cette synapse se distingue des autres synapses dans le SNC par une forte facilitation lors de stimulation en paire à intervalle court (entre 10 et 50 ms) (**Figure 16C**) et lorsque la fréquence de stimulation augmente à 1 Hz par exemple (Salin et al., 1996; Pinheiro et al., 2007; Sachidhanandam et al., 2009) (**Figure 16B**).

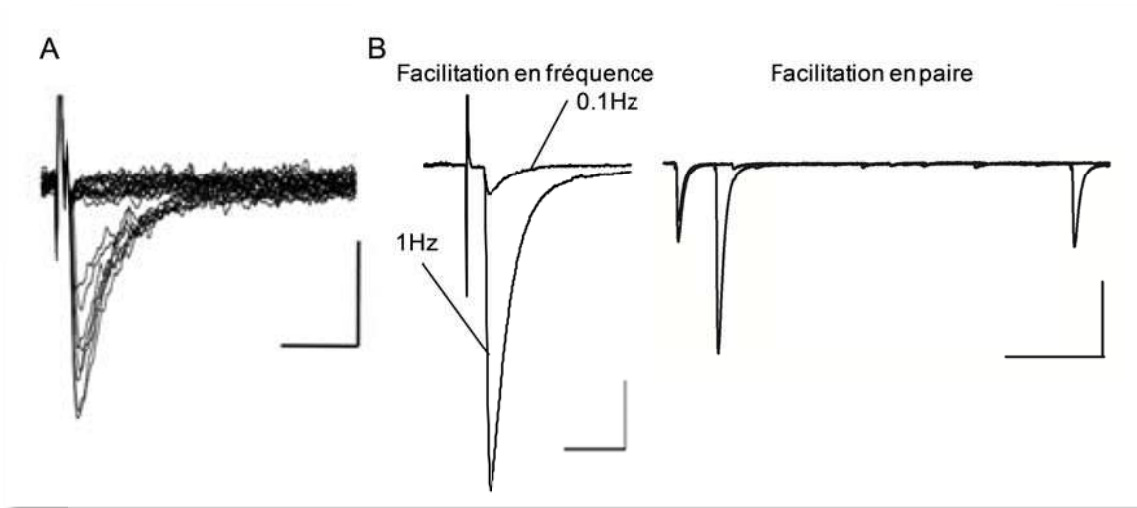


Figure 16 : La plasticité à court terme à la fibre moussue.

(A) Courants postsynaptiques excitateurs (EPSC) superposés, enregistrés au niveau d'une cellule pyramidale de CA3 après stimulation d'une fibre moussue en potentiel imposé. Suite à une stimulation, des échecs de la transmission synaptique sont enregistrés. Echelle 10 ms, 20 pA D'après (Sachidhanandam et al., 2009) (B) EPSC moyen enregistré à 0,1 Hz et 1 Hz (à gauche) représentant la facilitation en fréquence. Echelle 20 ms, 50 pA Moyenne de deux stimulations données à 40 et 400 ms d'intervalle illustrant la facilitation en paire (à droite). Echelle 100 ms, 100 pA

Ces deux formes de plasticité impliquent les récepteurs kaïnate présynaptiques (Pinheiro et al., 2007; Sachidhanandam et al., 2009). La facilitation en paire est due au Ca^{2+} résiduel dans la terminaison présynaptique suite à une stimulation et la facilitation en fréquence dépend de l'activation de la CaMKII présynaptique (Salin et al., 1996). Au cours du développement, ces deux types de facilitation présynaptique à court terme augmentent (Marchal and Mulle, 2004) pour diminuer ensuite à des stades plus matures (entre 3 et 9 semaines) (Mori-Kawakami et al., 2003).

3) Plasticité à long-terme

a) Potentialisation à long terme

Les synapses dans le système nerveux central présentent la faculté d'augmenter leur transmission synaptique d'une façon activité-dépendante.

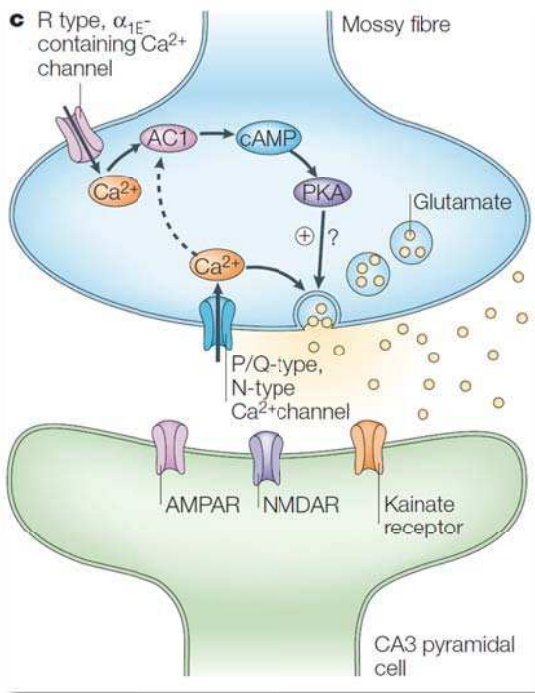


Figure 17 : La potentialisation à long-terme à la fibre moussue.

La LTP à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 est exprimée de façon présynaptique. L'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques de type R augmente l'activité de l'adénylate cyclase de type I (AC1), produisant une augmentation de l'AMPc et activation de la PKA. La PKA phosphoryle RIM1 α , interagissant avec Rab3A (protéines des vésicules synaptiques), ce qui entraîne une augmentation de la libération de glutamate. Les canaux calciques de type P/Q et N sont également représentés sur ce schéma et participent à la transmission synaptique. D'après (Nicoll and Schmitz, 2005)

Au niveau des synapses des cellules pyramidales de CA1, la stimulation répétée des collatérales de Schaffer entraîne un influx de Ca^{2+} dû à l'activation des récepteurs NMDA et l'insertion de récepteurs AMPA au niveau postsynaptique. Dans ce cas, l'induction et l'expression de la LTP sont postsynaptiques. A la fibre moussue, le schéma est différent. La LTP ne nécessite pas l'activation des récepteurs NMDA, ni une augmentation du Ca^{2+} postsynaptique (Mellor and Nicoll, 2001; Kakegawa et al., 2002) et est exprimée présynaptiquement (Zalutsky and Nicoll, 1990). Elle nécessite une entrée de Ca^{2+} au niveau présynaptique via les canaux calciques de type R (Breustedt et al., 2003). L'augmentation de Ca^{2+} présynaptique active l'adénylate cyclase de type 1 (AC1) (Villacres et al., 1998) qui stimule la production d'AMPc. Ce dernier active la PKA (Weisskopf et al., 1994) qui phosphoryle la protéine RIM1 α (Castillo et al., 2002) et permet l'augmentation de la libération de neurotransmetteur via la protéine vésiculaire Rab3A (Castillo et al., 1997b) (**Figure 17**). Ce type de LTP peut être induit à l'aide de protocoles utilisant des fréquences constantes, par exemple 3 x 100 stimulations à 100 Hz ou 125 stimulations à 25 Hz, mais également à l'aide de patterns de stimulation

issus d'enregistrements *in vivo* de l'activité de cellules granulaires du gyrus dentelé (Gundlfinger et al., 2010).

L'induction de cette forme de LTP requiert également l'activation des récepteurs kainate présynaptiques (Schmitz et al., 2003; Pinheiro et al., 2007). Plusieurs études ont remis en cause le mode d'induction de cette forme de LTP et ont montré qu'elle nécessite l'augmentation de Ca^{2+} dans la cellule postsynaptique (Williams and Johnston, 1989; Kapur et al., 1998; Yeckel et al., 1999; Wang et al., 2004). De plus, l'activation des récepteurs mGluR postsynaptiques a été impliquée (Yeckel et al., 1999). Leur activation permet la libération de Ca^{2+} par les réserves calciques intracellulaires (Kapur et al., 2001). Il est intéressant de noter que chez les souris $\text{GluK2}^{-/-}$, la LTP à la fibre moussue est diminuée par rapport aux souris contrôles, mais toujours présente et que cette LTP résiduelle est bloquée par un antagoniste des récepteurs mGluR (Contractor et al., 2001).

Un nouveau mécanisme d'induction postsynaptique a été proposé. La LTP à la fibre moussue est absente en présence d'un peptide compétiteur pour les protéines à domaine PDZ dans la cellule postsynaptique (Contractor et al., 2002). Cette compétition empêche la liaison des récepteurs EphB aux protéines éphrines-B3 présynaptiques et inhibe la LTP (Contractor et al., 2002; Armstrong et al., 2006). Cependant, les mécanismes moléculaires induits par cette interaction trans-synaptique et entraînant l'augmentation de la libération de neurotransmetteur ne sont pas connus.

La synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 ne présente pas de LTP postsynaptique dont l'expression se traduit par une insertion de récepteurs AMPA. Cependant, il existe une LTP des récepteurs NMDA (Kwon and Castillo, 2008a; Rebola et al., 2008) à cette synapse.

b) Dépression à long terme

L'induction de la LTD à la fibre moussue nécessite l'activation des récepteurs mGluR2 présynaptiques et est exprimée présynaptiquement par une diminution de la libération de neurotransmetteur (Kobayashi et al., 1996; Yokoi et al., 1996). L'activation de mGluR2 n'est pas suffisante et requiert une élévation de Ca^{2+} dans la terminaison présynaptique (Tzounopoulos et al., 1998; Kobayashi et al., 1999). L'activation de mGluR2 diminue l'activation de l'adénylate cyclase de type 1 (AC1) qui elle-même diminue l'activité de la PKA (Tzounopoulos et al., 1998) (**Figure 18**). Le protocole utilisé pour l'induction de cette LTD permet la dépotentialisation de la LTP présynaptique (Huang et al., 2002).

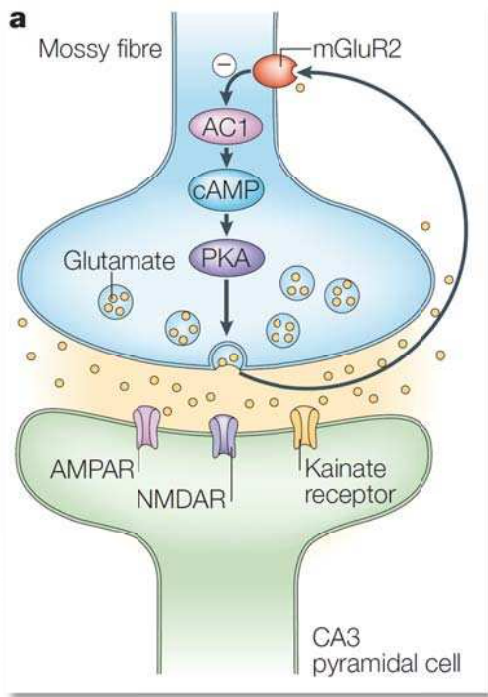


Figure 18 : La dépression à long terme à la fibre moussue.

L'adénylate cyclase de type I (AC1) présente une activité de base qui est inhibée par l'activation des récepteurs mGluR2 présynaptiques, entraînant une diminution de l'AMPc, de l'activité de la PKA et de la libération de neurotransmetteur. D'après (Nicoll and Schmitz, 2005)

c) Au cours de la maturation

Entre P2 et P5, chez le rat, lorsque la fibre moussue libère du GABA, il est possible d'induire une LTP de façon Hebbienne c'est-à-dire en corrélant l'activité de la présynapse et de la postsynapse (Sivakumaran et al., 2009). Selon le délai entre la genèse d'un potentiel d'action postsynaptique et une stimulation présynaptique, il est possible d'induire une LTP ou une LTD à cette synapse immature. Lorsqu'une stimulation présynaptique précède de 15 ms un potentiel d'action postsynaptique (pairing positif), il y a induction d'une LTP. Si le protocole est inversé (pairing négatif), la synapse exprime une LTD. Cette forme de LTP nécessite l'influx de Ca^{2+} dans la cellule postsynaptique ainsi que l'activation de la PKA et la libération de BDNF. Elle est exprimée de façon présynaptique par augmentation de la probabilité de libération de neurotransmetteur. De plus, si l'activité métabotrope de la sous-unité GluK1 présynaptique est inhibée et que son activité ionotrope est stimulée, la LTP devient une LTD (Caiati et al., 2010) ce qui suggère une importante participation de la dynamique du Ca^{2+} au niveau de la terminaison présynaptique.

Entre P6 et P14, un train de 100 stimulations à 100 Hz (protocole à haute fréquence) ou 900 stimulations à 1 Hz (protocole à basse fréquence), produisent une LTD à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 glutamatergique. Cette LTD est induite et exprimée de façon

postsynaptique et est indépendante de l'activation des récepteurs NMDA (Battistin and Cherubini, 1994). À un stade plus mature ($> P15$), le protocole à haute fréquence induit une LTP. Les deux protocoles de LTD induisent deux formes de plasticité avec des mécanismes différents (Domenici et al., 1998). La LTD induite grâce au protocole à haute fréquence nécessite une augmentation du Ca^{2+} postsynaptique alors que le protocole à basse fréquence nécessite l'activation des récepteurs mGluR et son expression est présynaptique. L'hypothèse que ces deux formes de LTD possèdent des mécanismes d'induction et d'expression différents est renforcée par le fait qu'elles peuvent être induites dans la même cellule en même temps (Domenici et al., 1998).

Une autre forme de LTD a été mise en évidence à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 entre P11 et P17 (Lei et al., 2003). Cette LTD est induite en dépolarisant la cellule postsynaptique pendant 5 min à -10 mV. Elle nécessite l'entrée de Ca^{2+} postsynaptique par les canaux calciques voltage-dépendants de type L, la libération de Ca^{2+} des réserves calciques intracellulaires et est exprimée de façon postsynaptique (Lei et al., 2003) par la perte de récepteurs AMPA perméables au Ca^{2+} (Ho et al., 2007). Son induction n'occlut pas la LTD présynaptique suggérant des mécanismes différents. De plus, cette LTD peut être induite à l'aide de trains de potentiels d'action permettant l'entrée de Ca^{2+} à travers les canaux calciques voltage-dépendants de type L (Ho et al., 2009).

G. Rôle fonctionnel de la fibre moussue

Il a été proposé que la fibre moussue joue le rôle de détonateur c'est-à-dire que lorsqu'une cellule granulaire décharge, toutes les cellules pyramidales de CA3 connectées produisent des potentiels d'action. Cette hypothèse considère que les cellules pyramidales de CA3 ont un seuil d'initiation des potentiels d'action fixe et que l'activité synaptique est toujours suffisante pour dépasser ce seuil. Cependant, l'initiation d'un potentiel d'action est un événement complexe résultant de l'interaction de différents facteurs tels que l'activité de décharge récente de la cellule pyramidale et le ratio entre les afférences excitatrices et inhibitrices. Du fait de ces différents paramètres et des réponses synaptiques induites par les fibres moussues qui ont des amplitudes variables, l'initiation d'un potentiel d'action n'a pas toujours lieu lorsqu'une cellule granulaire décharge. Néanmoins, l'amplitude des réponses synaptiques de la fibre moussue augmente avec la fréquence de stimulation. Les cellules granulaires contenues dans le gyrus dentelé sont des cellules de place c'est-à-dire que ces cellules augmentent leur décharge lorsque l'animal se situe dans une position donnée dans l'espace. A l'extérieur de ce champ, une cellule granulaire décharge à faible fréquence ($< 0,05$ Hz) (Jung and McNaughton, 1993).

et a donc très peu d'influence sur les cellules pyramidales de CA3 car les fibres moussues ne facilitent pas à cette fréquence, l'inhibition dominant l'excitation (Mori et al., 2004). En revanche, lorsqu'une cellule granulaire décharge à haute fréquence car l'animal est à l'intérieur de son champ d'activation, une fibre moussue est capable d'induire des décharges de potentiels d'action au niveau des cellules pyramidales de CA3 (Henze et al., 2002). De part ces caractéristiques, cette synapse agit donc comme un détonateur conditionnel.

L'activité synaptique de la fibre moussue permet également de produire une dépolarisation assez importante de la cellule pyramidale de CA3 pour l'induction de la LTP Hebbienne dépendante de l'activation des récepteurs NMDA au niveau des afférences autres que les fibres moussues (Chattarji et al., 1989). Les fibres moussues régulent également l'activation des canaux ioniques voltage-dépendants. L'activité synaptique des fibres moussues facilite l'activation des synapses entre la voie perforante et les cellules pyramidales de CA3 par des effets indirects sur des canaux voltage-dépendants dendritiques (Urban and Barrionuevo, 1998).

En conclusion, cette synapse présente des caractéristiques intéressantes pour l'étude de la maturation synaptique. Sa maturation morphologique et fonctionnelle se réalise durant des étapes définies. Cependant aucune étude à ce jour n'a mis en évidence de corrélation entre maturation morphologique et fonctionnelle à cette synapse.

RESULTATS

-

DISCUSSION

RESULTATS-DISCUSSION

I. Article 1 : “Impaired development of hippocampal mossy fibre synapses in mouse mutants for the presynaptic scaffold protein Bassoon”

Frederic Lanore*, Christophe Blanchet*, Anna Fejtova, Paulo Pinheiro, Karin Richter, D Balschun, Eckart Gundelfinger et Christophe Mulle.

* equal contribution

(2010) J Physiol 588.12: 2133-2145

A. Problématique

La protéine Bassoon est une protéine d'échafaudage présente la zone active. À ce jour, le rôle de Bassoon dans la formation de la zone active et sa fonction dans la libération de neurotransmetteur a été étudié chez l'adulte à l'aide d'une souris mutante exprimant la protéine Bassoon tronquée dans sa partie centrale. Cette région centrale est nécessaire à l'ancrage de la protéine à la zone active. L'analyse des souris mutantes a montré que les synapses glutamatergiques de la région CA1 de l'hippocampe étaient morphologiquement normales chez ces souris mais qu'une fraction de celles-ci était silencieuse (Altrock et al., 2003). Bassoon est une des premières protéines recrutées au niveau des contacts synaptiques nouvellement formés suggérant un rôle de cette protéine dans l'assemblage des terminaisons présynaptiques (Zhai et al., 2000; Zhai et al., 2001; Shapira et al., 2003). Nous avons évalué le rôle de Bassoon au cours de la maturation synaptique de la synapse glutamatergique entre fibre moussue et cellule pyramidale de CA3 par des approches électrophysiologiques et immunohistochimiques. Cette synapse possède des propriétés présynaptiques à court terme particulières comme une importante facilitation en paire et en fréquence. Elle constitue donc un bon modèle pour l'étude du rôle de Bassoon lors de la libération de neurotransmetteur. La synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 présente également une LTP exprimée de façon présynaptique. Cette synapse est également un modèle attractif pour l'étude de la maturation synaptique car les

éléments pré- et postsynaptique se mettent en place en suivant des étapes de maturation morphologique et fonctionnelle définies.

B. Résultats

Nous avons tout d'abord caractérisé le rôle de la protéine Bassoon sur les propriétés électrophysiologiques de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 à P21. Comme la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 possède plusieurs sites de libération, nous avons voulu savoir si une partie de ces sites était inactifs. Nos données montrent que la transmission synaptique, la probabilité de libération et la plasticité présynaptique à court terme sont inchangées chez les souris $Bsn^{-/-}$. Cependant, nous observons une diminution de la potentialisation post-tétanique après un train à haute fréquence permettant l'induction de la LTP présynaptique à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3.

Nous avons ensuite étudié le rôle de la protéine Bassoon à des stades précoces de maturation de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3. Nous avons mis en évidence une augmentation de la transmission synaptique à P7, accompagnée par une augmentation de la probabilité de libération du neurotransmetteur et de l'amplitude du quantum. Par ailleurs, par des techniques d'immunohistochimie et de microscopie confocale, nous avons montré qu'à cet âge le nombre de sites de libération par terminaison présynaptique est augmenté.

Nous avons étudié la possibilité que la mutation de la protéine Bassoon affecte la transmission synaptique à un stade plus tardif. A P14, l'amplitude de la transmission synaptique est diminuée chez les souris $Bsn^{-/-}$. Cette diminution est accompagnée par une augmentation du nombre d'échecs de la transmission synaptique chez ces souris par rapport aux souris contrôles. La probabilité de libération n'est pas affectée par la perte de Bassoon, ce qui suggère une diminution du nombre de sites de libération par terminaison présynaptique. Cependant, les marquages immunohistochimiques des sites de libération ne montrent aucune différence à P14 entre les souris $Bsn^{+/+}$ et $Bsn^{-/-}$. Comme dans CA1 (Altrock et al., 2003), certains sites de libération de neurotransmetteur à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 sont présents physiquement mais silencieux fonctionnellement.

Impaired development of hippocampal mossy fibre synapses in mouse mutants for the presynaptic scaffold protein Bassoon

Frederic Lanore¹, Christophe Blanchet¹, Anna Fejtova², Paulo Pinheiro¹, Karin Richter³, Detlef Balschun², Eckart Gundelfinger² and Christophe Mulle¹

¹Laboratoire Physiologie Cellulaire de la Synapse, CNRS UMR 5091, University of Bordeaux, 33077 Bordeaux, France

²Leibniz Institute for Neurobiology, Brennekestr. 6, 39118 Magdeburg, Germany

³Institute for Biochemistry & Cell Biology, Otto von Guericke University, Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg, Germany

Bassoon, a protein highly concentrated at the synaptic active zone, is thought to participate in the organization of the cytomatrix at the site of neurotransmitter release. Bassoon is amongst the first proteins to accumulate at newly formed synaptic junctions, raising the question of the functional role of this protein in the early stages of synaptic development. Here we show that the course of synaptic maturation of hippocampal mossy fibre (MF) synapses (glutamatergic synapses with multiple release sites) is markedly altered during the first 2 weeks of postnatal development in mutant mice lacking the central region of Bassoon (*Bsn*^{−/−} mice). At postnatal day 7 (P7), *Bsn*^{−/−} mice display large amplitude MF-EPSCs with decreased paired pulse ratios, an abnormality which may be linked to deficits in the organization of the presynaptic active zone. Surprisingly, 1 week later, decreased MF-EPSCs amplitude is observed in *Bsn*^{−/−} mice, consistent with the inactivation of a subset of synaptic release sites. Finally, at more mature states a decreased posttetanic potentiation is observed at MF-synapses. These results support the notion that Bassoon is important for organizing the presynaptic active zone during the postnatal maturation of glutamatergic synapses.

(Received 25 November 2009; accepted after revision 20 April 2010; first published online 26 April 2010)

Corresponding author C. Mulle: Laboratoire Physiologie Cellulaire de la Synapse, CNRS UMR 5091, University of Bordeaux, 33077 Bordeaux, France. Email: mulle@u-bordeaux2.fr

Abbreviations CAZ, cytoskeletal matrix associated with the active zone; LFF, low frequency facilitation; MF, mossy fibre; PPF, paired pulse facilitation.

Introduction

Synapse formation within the central nervous system is initiated by the formation of axodendritic contacts followed by the differentiation and maturation of pre- and postsynaptic functional domains at the contact site. The differentiation of the presynaptic bouton includes the formation of active zones, i.e. regions of the synaptic plasma membrane specialized for neurotransmitter release. The electron-dense cytoskeletal matrix associated with the active zone (CAZ) is thought to organize the synaptic vesicles that are lined up in close vicinity to the cytoplasmic face of the terminal. The CAZ contains several multimeric protein complexes,

including the major scaffolding proteins Bassoon and Piccolo (tom Dieck *et al.* 1998; Fenster *et al.* 2000; Schoch & Gundelfinger, 2006). The role of Bassoon in the formation and function of active zones has been addressed by analyzing a mouse mutant lacking the central exons of the Bassoon (*Bsn*) gene. Although this central region is critical for anchoring Bassoon to the CAZ, mutant hippocampal synapses look structurally normal (Altrock *et al.* 2003). In the adult hippocampus, neither synapse density nor morphological parameters defining presynaptic nerve terminals are significantly altered in *Bsn*^{−/−} mice as compared to *Bsn*^{+/+} mice. However, a fraction of glutamatergic synapses in CA1 pyramidal cells appears inactivated in *Bsn*^{−/−} mice (Altrock *et al.* 2003).

Bassoon is expressed at early stages of neuronal differentiation and is one of the first proteins to be found at nascent synapses, at least in cultured

F. Lanore and C. Blanchet contributed equally to this work.

neurons, suggesting a role in the assembly of the active zone (Zhai, 2000, 2001; Shapira *et al.* 2003). To evaluate whether Bassoon may perform a key role in the postnatal development of synaptic properties, we investigated the functional maturation of a model glutamatergic synapse during the first postnatal weeks in *Bsn*^{-/-} mice. Guided by the need to understand how presynaptic parameters might be impaired in the absence of functional Bassoon, we have studied hippocampal mossy fibre synapses, which display unique presynaptic properties (Henze *et al.* 2000). In the mature rodent brain, mossy fibre synapses onto CA3 pyramidal cells (MF–CA3 synapses) display robust forms of presynaptic short-term plasticity (Nicoll & Schmitz, 2005) and express high levels of Bassoon close to release sites (Richter *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2000). MF–CA3 synapses constitute an attractive system to investigate patterns of synaptic maturation. In rodents, MF synaptic contacts are established following concurrent pre- and postsynaptic morphological changes that take place during the first weeks of development (Amaral & Dent, 1981). During a critical period of postnatal development, between postnatal days 6 and 9, rapid changes in presynaptic and postsynaptic electrophysiological properties of MF–CA3 synapses occur in parallel (Marchal & Mulle, 2004). Here we show that pre- and postsynaptic parameters of synaptic transmission at MF–CA3 pyramidal cell synapses are clearly and biphasically impaired at earlier stages of maturation indicating that Bassoon might be important for organizing the presynaptic active zone during synaptic development.

Methods

Experimental procedures followed the recommendations of the CNRS ethics committee and the French Ministry of Agriculture and Forestry concerning animal care (authorization number, A33093). *Bsn*^{-/-} mice were generated as described earlier (Altrock *et al.* 2003), backcrossed into the C57/Bl6 mouse strain, and then crossed with the SV129 strain yielding mice with a mixed C57/bl6/SV129 genetic background. Mutant and wild-type mice used were littermates of heterozygote breeding pairs.

Pups and young mice (<P21) were killed by cervical dislocation. Parasagittal brain slices (350 μ m thick) were prepared from P5 to P21 mice (P0 being the day of birth). For the dissection and the storage of the slices, a solution containing: 80 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.5 mM NaH₂PO₄, 7 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 10 mM glucose and 75 mM sucrose (equilibrated with 95% O₂–5% CO₂) was used. Slices were incubated at 33°C for 30 min and subsequently stored at room temperature. Whole-cell voltage-clamp recordings

(2.6–3.4 M electrodes, –70 mV holding potential) were made from hippocampal CA3 pyramidal cells visualized by infrared video-microscopy. Experiments were performed at room temperature (22–25°C). Slices were superfused with extracellular solution composed of: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 4 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 11 mM glucose and equilibrated with 95% O₂–5% CO₂. Bicuculline (10 μ M) was added to the bath to inhibit GABA_A receptors. Intracellular solution was composed of: 122 mM cesium methanesulfonate, 2 mM NaCl, 10 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 4 mM ATP-Na (pH 7.3).

A glass microelectrode was placed in the hilus of the dentate gyrus to stimulate MFs. While recording from a pyramidal cell, the stimulating electrode was moved to a position where a sharp EPSC with fixed latency was evoked. Stimulation intensity (200 μ s pulse; <20 μ A) was adjusted just above the sharp threshold for activation of a synaptic response. Using such low minimal stimulations, no prominent polysynaptic activation was observed. MF stimulation was assessed by its short term facilitation properties (40 ms paired pulse ratio or 1 Hz/0.1 Hz ratio above 3), except for some P5 or P7 recordings where facilitation ratio could be less because of their immature state. In that case, the group II mGluR agonist LCCG-1 (10 μ M) was applied to confirm that MFs were stimulated. LCCG-1 was also occasionally applied even when the facilitation ratio was above 3, and, in such cases, it always markedly inhibited EPSCs (Supplemental Fig. 1). Recordings were analysed using IGOR pro (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA). Low-frequency facilitation was evoked by stimulating MFs at frequencies of 0.1 and 1 Hz. For Sr²⁺ experiments, slices were bathed in an extracellular solution containing SrCl₂ (2 mM) and a low concentration of CaCl₂ (0.03 mM). Asynchronous EPSCs (aEPSCs) were evoked by trains of five stimuli at 50 Hz repeated 100 times at 30 s intervals. Only events with amplitudes larger than 7.5 pA and occurring within a 400 ms time window beginning 50 ms after each train were considered for statistical analysis.

Unless otherwise mentioned, values are expressed as means $\pm$ S.E.M. ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test, the Mann–Whitney *U* test or the Kolmogorov–Smirnov (KS) test were used where appropriate.

All drugs were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK) or Ascent Scientific (Avonmouth, UK).

Immunostaining of brain sections

Mice at P7, P14 and P21 (5 animals of each genotype and age) were deeply anaesthetized using a mixture of Ketavet (Parke-Davis) and Domitor (Pfizer) and perfused transcardially with 0.9% NaCl for 1 min followed by 4%

formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 10 min. Brains were removed, post-fixed in the same fixative for 20 h at 6°C, freeze-protected with 1 M sucrose in 0.1 M PB and frozen at -40°C in isopentane. Free-floating 25 μ m thick coronal sections of dorsal hippocampus were stained 48 h with mouse anti-synaptophysin (1:2000), rabbit anti-Munc13-1 (1:1000, both Synaptic systems, Germany), and guinea pig anti-ProSAP2/Shank3 (1:2000, Bockmann *et al.* 2002) followed by overnight incubation with Alexa488-labelled anti-rabbit (1:2000, Invitrogen), Cy3-labelled anti-guinea pig (1:1000); Cy5-labelled anti-mouse (1:1000, both Jackson lab) antibodies. The mossy fibre termination zone (stratum lucidum) in the CA3 region of hippocampus was analysed. The images with resolution of 80 $\times$ 80 $\times$ 300 nm per voxel were taken on CLSM SP2 or SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using 63 $\times$ objective and 6-fold zoom of scanner head. Munc-13 positive puncta were counted manually on around 60 mossy terminals on 5–9 μ m thick stacks (minimum 10 stacks per genotype and age) using Image5D plug-in of ImageJ freeware (NIH, USA). In preparing the figures, stacks were deconvolved using Imaris 5.0 software (Bitplane, Zurich, Switzerland), maximal fluorescence Z-projection was created using ImageJ and assembled using Adobe CS2 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Results

Electrophysiological properties of MF–CA3 synapses in P21 *Bsn*^{-/-} mice

Single MF boutons contain multiple active zones (25 on average) and their associated post-synaptic densities (Henze *et al.* 2000; Rollenhagen *et al.* 2007). *Bsn* mutation leads to the inactivation of a fraction of conventional excitatory synapses in CA1 pyramidal cells (Altrock *et al.* 2003). We sought to explore whether a single MF bouton would show a decreased number of release sites in *Bsn* mutant (*Bsn*^{-/-}) mice, i.e. whether all or only some of the active zones would be functionally inactive. For this purpose we have recorded MF excitatory postsynaptic currents (MF-EPSCs) from CA3 pyramidal cells in hippocampal slices from wild-type (*Bsn*^{+/+}) and *Bsn*^{-/-} mice at P21. Throughout this study, a minimal stimulation protocol was used to evoke MF-EPSCs. At low frequency (0.1 Hz), we did not observe any significant difference in the average amplitude of MF-EPSCs between *Bsn*^{-/-} mice and *Bsn*^{+/+} littermates (*Bsn*^{+/+}: 51.1 $\pm$ 7.8 pA, *n* = 11 and *Bsn*^{-/-}: 43.1 $\pm$ 10.0 pA, *n* = 9, *P* = 0.32) (KS test for distribution: *P* = 0.33) (Fig. 1A) as well as in the rate of failures (*Bsn*^{+/+}: 25.8 $\pm$ 6.1%, *n* = 11 and *Bsn*^{-/-}: 36.6 $\pm$ 6.1%, *n* = 9, *P* = 0.23) (Fig. 1B).

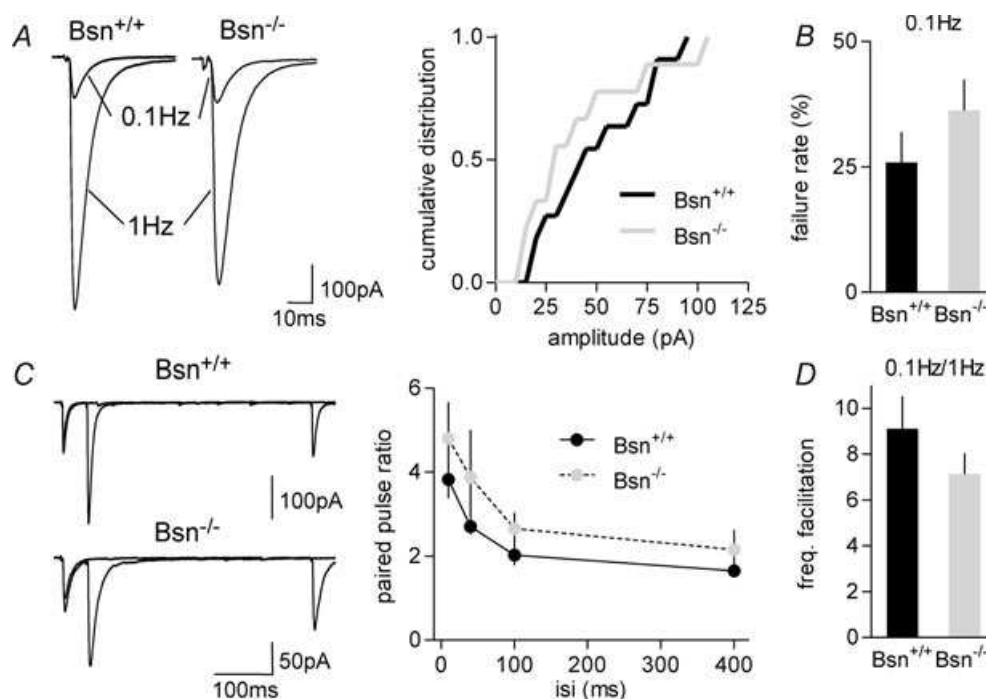


Figure 1. Normal synaptic transmission and presynaptic short-term plasticity in *Bsn*^{-/-} mice at P21

A, average of 50 traces (left) illustrating LFF of MF-EPSCs when shifting stimulation from 0.1 to 1 Hz for *Bsn*^{+/+} and *Bsn*^{-/-} mice. Cumulative distribution (right) of average MF-EPSC amplitudes at 0.1 Hz (*Bsn*^{+/+}: *n* = 11 and *Bsn*^{-/-}: *n* = 9) (KS test for distribution, *P* = 0.33). B, bar graph of failure rate at 0.1 Hz (*Bsn*^{+/+}: *n* = 11 and *Bsn*^{-/-}: *n* = 9). C, average of 20 traces (left) illustrating PPF at 40 and 400 ms for *Bsn*^{+/+} and *Bsn*^{-/-} mice. Summary graph (right) of PPF ratio at 10, 40, 100 and 400 ms (*Bsn*^{+/+}: *n* = 10 and *Bsn*^{-/-}: *n* = 6). Isi: interstimulus interval. D, bar graph of mean LFF ratio from 0.1 to 1 Hz (*Bsn*^{+/+}: *n* = 9 and *Bsn*^{-/-}: *n* = 9).

Potency (average amplitude excluding failures) was not significantly different ($Bsn^{+/+}$: 80.2 ± 16.1 pA, $n = 11$ and $Bsn^{-/-}$: 62.6 ± 9.0 pA, $n = 9$, $P = 0.36$).

MF synaptic transmission displays prominent forms of presynaptic short-term plasticity, among which are paired pulse facilitation (PPF) and low frequency facilitation (LFF), which are likely to depend on different presynaptic mechanisms: residual Ca^{2+} for PPF and activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) for LFF (Salin *et al.* 1996). We did not find any significant difference in PPF ratio between the two genotypes with intervals ranging from 10 to 400 ms ($Bsn^{+/+}$, $n = 10$ and $Bsn^{-/-}$, $n = 6$; from 10 ms to 400 ms, $P > 0.05$) (Fig. 1C). LFF develops over a slow time scale with repetitive stimulation in the low frequency range (0.05 to 5 Hz). We tested LFF of MF-EPSCs by increasing the stimulation frequency from 0.1 Hz to 1 Hz for 60 s. LFF developed in a few seconds to the same extent in $Bsn^{+/+}$

and $Bsn^{-/-}$ mice (ratio 1 Hz/0.1 Hz: $Bsn^{+/+}$: 9.1 ± 1.4 , $n = 9$ and $Bsn^{-/-}$: 7.1 ± 0.9 , $n = 9$, $P = 0.22$) (Fig. 1D). MF-CA3 synapses display a well known PKA-dependent presynaptic form of LTP (MF-LTP) (Nicoll & Schmitz, 2005) that can be induced either chemically with forskolin (10 μ M, 15 min) or by a high frequency stimulations (HFS) protocol (100 stimuli at 100 Hz repeated 3 times at 10 s intervals). MF-EPSCs were potentiated to a similar extent in $Bsn^{+/+}$ and $Bsn^{-/-}$ mice whatever the induction protocol (average LTP between 30 and 35 min; HFS: $Bsn^{+/+}$: $181 \pm 31\%$, $n = 9$ and $Bsn^{-/-}$: $163 \pm 23\%$, $n = 12$, $P = 0.69$; and forskolin: $Bsn^{+/+}$: $205.7 \pm 49.1\%$, $n = 6$ and $Bsn^{-/-}$: $190.5 \pm 18.8\%$, $n = 6$, $P = 0.79$) (Fig. 2A, C and D). However, we observed that posttetanic potentiation (PTP) was significantly smaller in $Bsn^{-/-}$ mice as compared with $Bsn^{+/+}$ mice ($Bsn^{+/+}$: $847 \pm 85\%$, $n = 9$ and $Bsn^{-/-}$: $553 \pm 71\%$, $n = 12$, $P = 0.01$) (Fig. 2B).

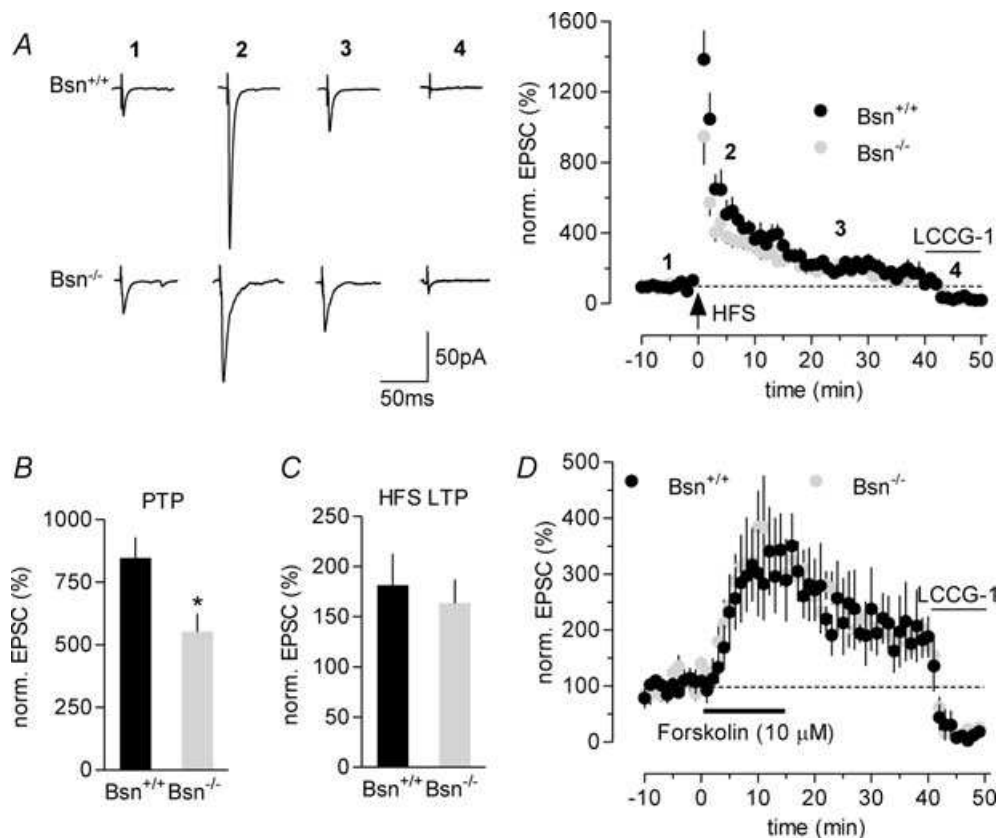


Figure 2. PTP is decreased in $Bsn^{-/-}$ mice

A, traces (top) represent MF-EPSCs during baseline (1), PTP (2), LTP (3) and LCCG-1 (10 μ M) application (4) in $Bsn^{+/+}$ and $Bsn^{-/-}$ mice. The LTP protocol was applied at the time indicated by the arrow. Time course (bottom) of MF LTP for $Bsn^{+/+}$ ($n = 9$) and $Bsn^{-/-}$ ($n = 12$) mice. MF-EPSCs were averaged every minute and normalized to the mean amplitude of the 10 min period preceding the LTP induction protocol. B, bar graph of PTP (average first 5 min after the LTP protocol) ($Bsn^{+/+}$: $n = 9$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 12$). C, bar graph of LTP 30–35 min after LTP induction ($Bsn^{+/+}$: $n = 9$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 12$). D, time course of MF-EPSCs potentiation induced by bath application of forskolin (10 μ M, 15 min) for $Bsn^{+/+}$ ($n = 6$) and $Bsn^{-/-}$ ($n = 6$). MF-EPSCs were averaged every minute and normalized to the mean amplitude of the 10 min period preceding bath application of forskolin. * $P < 0.05$.

MF-CA3 synapses show impaired synaptic transmission in *Bsn*^{-/-} mice at a critical period of postnatal development

Bassoon has been proposed to participate in the initial stages of synapse formation and maturation (Zhai, 2000), and we cannot exclude that compensatory mechanisms occurring progressively during the course of post-synaptic maturation (including possible replacement of Bassoon by Piccolo) could explain the lack of significant functional changes in *Bsn*^{-/-} mice at P21. We thus evaluated the impact of the *Bsn* mutation on MF synaptic transmission at earlier stages of postnatal development. We first focused on a critical period of synaptic maturation for MF-CA3 synapses (between P6 and P9 in mice)

(Amaral & Dent, 1981; Marchal & Mulle, 2004), during which rapid morphological and functional changes occur at both pre- and postsynaptic levels. MF-EPSCs evoked by minimal stimulation at a rate of 0.1 Hz were recorded at P5, P7 and P9 (Fig. 3A). The mean MF-EPSC amplitude markedly increased between P5 and P9 in both *Bsn*^{+/+} and *Bsn*^{-/-} mice but this increase appears to occur earlier in the absence of Bassoon (Fig. 3B). The average MF-EPSC amplitude was notably larger in *Bsn*^{-/-} mice as compared to *Bsn*^{+/+} mice at P7 (Fig. 3B) although this difference did not reach statistical significance due to high variability of the individual average values (Fig. 3D). Further examination of the distribution of average MF-EPSC amplitudes revealed striking differences between *Bsn*^{+/+} and *Bsn*^{-/-} mice at P5 and at P7 (KS test,

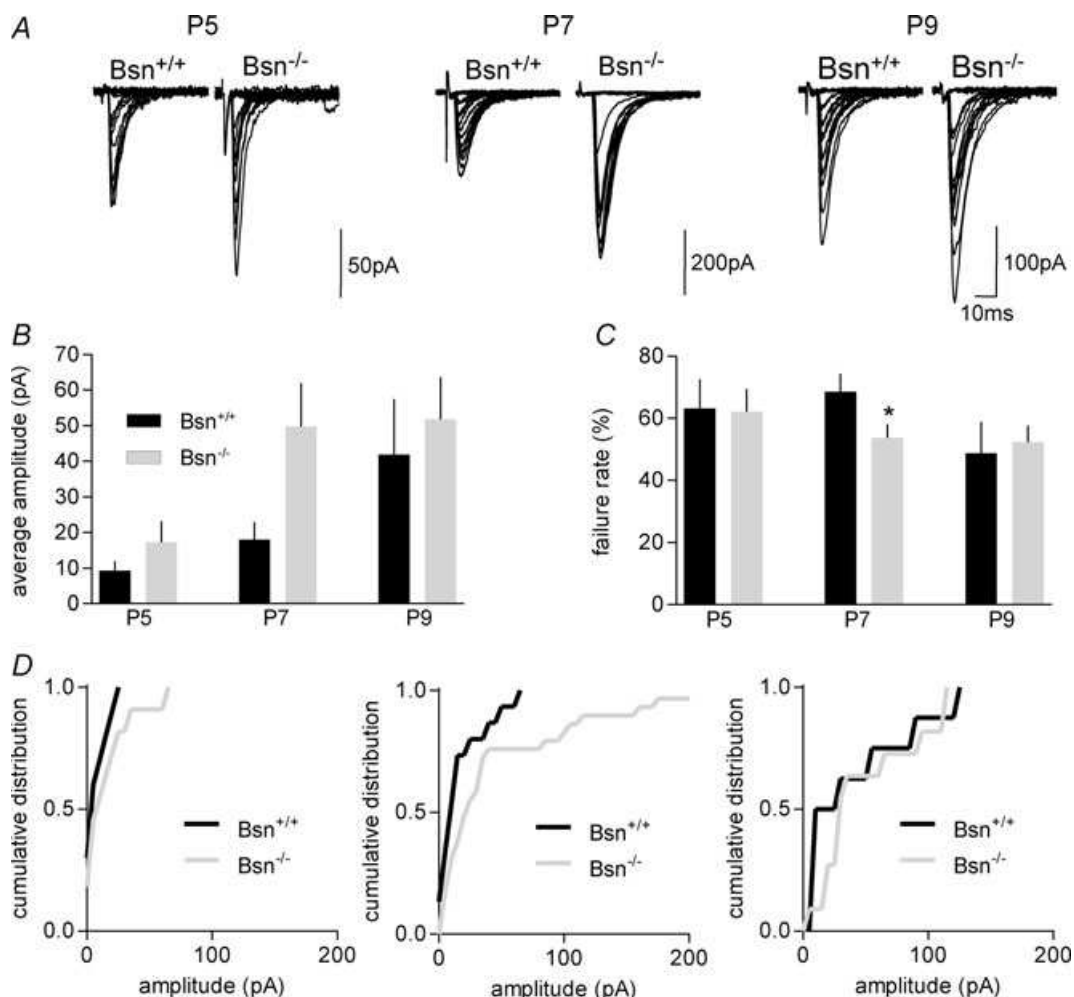


Figure 3. Impaired synaptic transmission at immature hippocampal MF-CA3 synapses

A, superimposed recordings showing 'all or none' unitary MF-EPSCs recorded at P5, P7 and P9 in *Bsn*^{+/+} and *Bsn*^{-/-} mice at 0.1 Hz. B, bar graph of average MF-EPSC amplitudes at 0.1 Hz at P5, P7 and P9 for *Bsn*^{+/+} and *Bsn*^{-/-} mice (P5: *Bsn*^{+/+}: *n* = 10 and *Bsn*^{-/-}: *n* = 11; P7: *Bsn*^{+/+}: *n* = 10 and *Bsn*^{-/-}: *n* = 11; P9: *Bsn*^{+/+}: *n* = 8 and *Bsn*^{-/-}: *n* = 11). C, bar graph of failures at 0.1 Hz at P5, P7 and P9 for *Bsn*^{+/+} and *Bsn*^{-/-} mice (P5: *Bsn*^{+/+}: *n* = 10 and *Bsn*^{-/-}: *n* = 11; P7: *Bsn*^{+/+}: *n* = 10 and *Bsn*^{-/-}: *n* = 11; P9: *Bsn*^{+/+}: *n* = 8 and *Bsn*^{-/-}: *n* = 11). D, cumulative distribution of average MF-EPSC amplitudes at 0.1 Hz (KS test for distribution: P5: *P* = 0.01; P7: *P* = 0.0001; P9: *P* = 0.13). **P* < 0.05.

comparison of distributions: P5, $P = 0.01$; P7, $P = 0.0001$; P9, $P = 0.13$) (Fig. 3D). Because we average together failures and successful synaptic events, the increase in mean MF-EPSC amplitude at P7 could be due to a decrease in failure rate between $Bsn^{+/+}$ and $Bsn^{-/-}$ mice. We

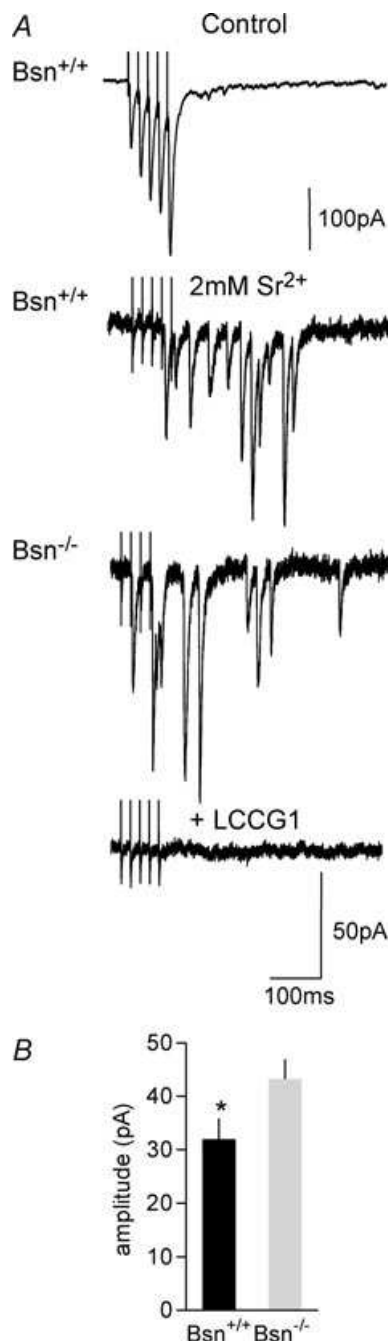


Figure 4. Increase in average MF-EPSC amplitudes at P7 cannot be attributed to a change in quantal size

A, representative recordings of MF-EPSCs in response to a train of 5 MF stimuli (50 Hz, every 10 s) in control conditions (top) or in an extracellular medium where Ca^{2+} is replaced by Sr^{2+} (2 mM) in $Bsn^{+/+}$ (middle) and $Bsn^{-/-}$ mice (bottom). B, bar graph of average aEPSC amplitudes ($Bsn^{+/+}$: $n = 14$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 17$). * $P < 0.05$.

thus measured the failure rate at 0.1 Hz and found that, at P7 but not at P5 and P9, it was significantly lower in $Bsn^{-/-}$ mice (P5: $Bsn^{+/+}$: $63.2 \pm 9.4\%$ and $Bsn^{-/-}$: $62.2 \pm 7.2\%$, $P = 0.93$; P7: $Bsn^{+/+}$: $68.5 \pm 5.8\%$ and $Bsn^{-/-}$: $53.6 \pm 4.4\%$, $P = 0.04$; P9: $Bsn^{+/+}$: $48.8 \pm 10.1\%$ and $Bsn^{-/-}$: $52.4 \pm 5.2\%$, $P = 0.73$) (Fig. 3C). As for the average amplitude, the mean potency of MF-EPSCs was not significantly different between both genotypes at P5, P7 and P9 (P5: $Bsn^{+/+}$: 22.9 ± 3.0 pA and $Bsn^{-/-}$: 41.8 ± 10.7 pA, $P = 0.50$; P7: $Bsn^{+/+}$: 48.8 ± 9.7 pA and $Bsn^{-/-}$: 83.6 ± 14.0 pA, $P = 0.13$; P9: $Bsn^{+/+}$: 64.5 ± 13.7 pA and $Bsn^{-/-}$: 98.7 ± 14.6 pA, $P = 0.09$). Interestingly, however, we recorded individual MF-EPSCs of large amplitude at 0.1 Hz (>200 pA; 'maxi' MF-EPSCs) in a larger proportion of cells from $Bsn^{-/-}$ than from $Bsn^{+/+}$ mice (12 out of 29 cells, in 8 out of 10 $Bsn^{-/-}$ mice; vs. 2 out of 15 cells, in 2 out of 7 $Bsn^{+/+}$ mice) (Fig. 3A). To ensure that the unusual amplitude of these 'maxi' MF-EPSCs did not result from polysynaptic activity in $Bsn^{-/-}$ mice, we analysed the rise time (20–80%) for each individual MF-EPSC recorded at 0.1 and 1 Hz in $Bsn^{+/+}$ and $Bsn^{-/-}$ mice at P7 and did not find any significant differences between the two genotypes (0.1 Hz: $Bsn^{+/+}$: 0.61 ± 0.04 ms, $n = 10$ and $Bsn^{-/-}$: 0.74 ± 0.07 ms, $n = 11$, $P = 0.16$; 1 Hz: $Bsn^{+/+}$: 0.73 ± 0.04 ms, $n = 10$ and $Bsn^{-/-}$: 0.83 ± 0.05 ms, $n = 11$, $P = 0.09$) (Supplemental Fig. 2).

As 'maxi' MF-EPSCs and the increased mean MF-EPSC amplitude could result, at least partially, from an increased quantal size, we analysed the amplitude of asynchronous EPSCs (aEPSCs) recorded in the presence of Sr^{2+} in the external solution as previously described (Marchal & Mulle, 2004). At other synapses, it was demonstrated that aEPSCs arise from the same synapses that generated the evoked EPSC and correspond to the quantal release of neurotransmitter (Bekkers & Clements, 1999). We found a significant difference between mean aEPSC amplitude recorded in cells from $Bsn^{+/+}$ and $Bsn^{-/-}$ mice ($Bsn^{+/+}$: 31.9 ± 3.8 pA, $n = 14$ and $Bsn^{-/-}$: 43.2 ± 3.6 pA, $n = 17$, $P = 0.03$) (Fig. 4B), consistent with changes occurring at a postsynaptic level (e.g. changes in the number of activated AMPA receptors). The large amplitude of MF-EPSCs in $Bsn^{-/-}$ mice at P7 may also depend on either the number of functional release sites or the release probability. We thus compared PPF in the two genotypes. With paired MF-EPSCs evoked at intervals ranging from 10 to 400 ms, the paired pulse ratio increased from P5 to P9 for short interstimulus intervals (ISIs) (Fig. 5A and B) in $Bsn^{+/+}$ mice. This developmental increase appeared to be delayed in $Bsn^{-/-}$ mice at P7 with values of PPF significantly smaller at 10 and 40 ms ISIs ($Bsn^{+/+}$, $n = 10$ and $Bsn^{-/-}$, $n = 10$, 10 ms $P = 0.01$; 40 ms $P = 0.005$), while no significant differences were observed at P5 and P9 at any ISI. We also compared LFF in both genotypes, but we found no significant differences

between mean values during this developmental time period (ratio 1 Hz/0.1 Hz: P5: $Bsn^{+/+}$: 2.9 ± 0.8 , $n = 10$ and $Bsn^{-/-}$: 2.7 ± 0.3 , $n = 11$, $P = 0.40$; P7: $Bsn^{+/+}$: 5.5 ± 0.8 , $n = 10$ and $Bsn^{-/-}$: 4.4 ± 0.8 , $n = 11$, $P = 0.37$; P9: $Bsn^{+/+}$: 4.3 ± 0.6 , $n = 8$ and $Bsn^{-/-}$: 5.1 ± 1.1 , $n = 11$, $P = 0.96$). However, plotting mean LFF or PPF at 40 ms as a function of the corresponding mean MF-EPSC amplitudes at 0.1 Hz at P7 (Fig. 5C and D) revealed that cells displaying large mean MF-EPSC amplitudes had also low facilitation ratios. This suggests that the increased MF-EPSC amplitudes in $Bsn^{-/-}$ mice are probably, at least partially, due to higher release probability. Overall, the changes in aEPSCs and facilitation ratios suggest that the lack of a functional Bassoon protein at a critical period of postnatal development impairs normal functional MF synapse maturation both at the pre- and postsynaptic levels, at least in a subpopulation of these synapses.

Impairment of MF–CA3 synaptic transmission at P14 in $Bsn^{-/-}$ mice

We explored the possibility that the *Bsn* mutation could alter MF synaptic transmission at a later stage of maturation, P14. Surprisingly, we observed a marked decrease in the mean amplitude of MF-EPSCs recorded at 0.1 Hz in $Bsn^{-/-}$ mice ($Bsn^{+/+}$: 70.8 ± 11.1 pA, $n = 9$ and $Bsn^{-/-}$: 44.6 ± 6.6 pA, $n = 15$, $P = 0.04$) (KS test for distribution, $P = 0.01$) (Fig. 6A). This decrease was accompanied by an increase in the proportion of failures, which could by itself explain the change in mean MF-EPSC amplitude ($Bsn^{+/+}$: $20.8 \pm 4.7\%$, $n = 9$ and $Bsn^{-/-}$: $42.8 \pm 5.0\%$, $n = 15$, $P = 0.01$) (Fig. 6B). Indeed, potencies of MF-EPSCs were not significantly different in both genotypes ($Bsn^{+/+}$: 88.0 ± 11.2 pA, $n = 9$ and $Bsn^{-/-}$: 76.4 ± 8.3 pA, $n = 15$, $P = 0.44$). However, the

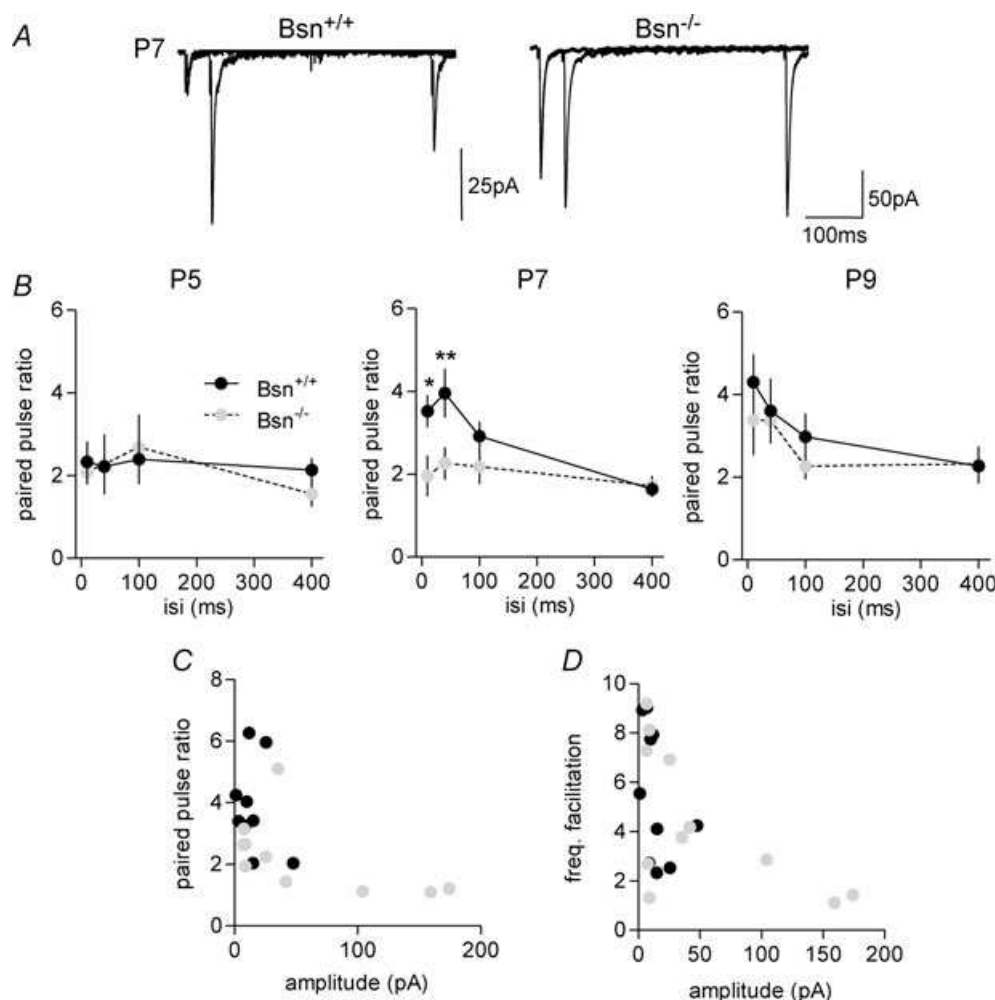


Figure 5. Developmental increase in PPF is delayed in $Bsn^{-/-}$ mice

A, average of 20 traces illustrating PPF at 40 and 400 ms for $Bsn^{+/+}$ and $Bsn^{-/-}$ mice at P7. B, summary graph of PPF ratio at 10, 40, 100 and 400 ms at P5, P7 and P9 (P5: $Bsn^{+/+}$: $n = 8$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 8$; P7: $Bsn^{+/+}$: $n = 10$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 10$; P9: $Bsn^{+/+}$: $n = 8$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 7$). Isi: interstimulus interval. C, plots of PPF ratio as a function of average MF-EPSCs amplitude for $Bsn^{+/+}$ (black circles) and $Bsn^{-/-}$ (grey circles) mice. D, plots of LFF ratio from 0.1 to 1 Hz as a function of average MF-EPSC amplitude for $Bsn^{+/+}$ (black circles) and $Bsn^{-/-}$ (grey circles) mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Bsn mutation did not affect PPF at any ISI ranging from 10 to 400 ms ($Bsn^{+/+}$: $n = 8$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 9$, $P > 0.05$) (Fig. 6C), nor LFF (ratio 1 Hz/0.1 Hz: $Bsn^{+/+}$: 5.3 ± 0.3 , $n = 8$ and $Bsn^{-/-}$: 5.6 ± 0.7 , $n = 14$, $P = 0.58$) (Fig. 6D). Hence the decrease of MF-EPSCs and the increase in failure rate in P14 $Bsn^{-/-}$ cannot be easily explained by a change in the probability of release of MF synaptic sites. A change in failure rates may alternatively rely on a change in the number of release sites. The simplest explanation might therefore be that in individual MF boutons, a proportion of synaptic active zones in P14 mutant mice are functionally inactive, similarly to what has been observed in autapses of hippocampal micro-island cultures (Altrock *et al.* 2003). Finally, to further explore mechanisms underlying changes in the mean amplitude of MF-EPSCs, we evaluated the quantal size of MF-EPSCs by aEPSCs in the presence of Sr^{2+} in P14 mice, as described above. We did not find any significant difference in the mean amplitude of aEPSCs ($Bsn^{+/+}$: 40.2 ± 3.3 pA, $n = 10$ and $Bsn^{-/-}$: 41.6 ± 3.0 pA, $n = 9$, $P = 0.71$) (Supplemental Fig. 3) suggesting that, at this maturation stage, the quantal sizes of MF-EPSCs in $Bsn^{-/-}$ mice were normal. Altogether our electrophysiological data suggest that the Bsn mutation affects

MF synaptic maturation in CA3 pyramidal cells (before P14) but reaches apparently almost normal function before adulthood.

The time course of maturation of MF-EPSCs was characterized in conditions of 4 mM Ca^{2+} /4 mM Mg^{2+} at room temperature in order to minimize overall neuronal excitability. However, these conditions are known to reduce presynaptic function. We have reexamined the properties of MF synaptic transmission at the main time points of postnatal development, at near physiological temperature ($33^{\circ}C$) and in conditions of 2 mM Ca^{2+} /1 mM Mg^{2+} . For these experiments we have monitored NMDAR-dependent MF-EPSCs at +30 mV in the presence of 10 μM NBQX (Supplemental Fig. 4). Essentially, we repeated our observations in conditions of 4 mM Ca^{2+} /4 mM Mg^{2+} at room temperature. In $Bsn^{-/-}$ mice we observed: at P7, an increase of the mean amplitude of NMDAR-dependent MF-EPSCs, a significant decrease of failure rate and of PPF ratio; at P14, a significant decrease of the mean amplitude of NMDAR-dependent MF-EPSCs, a significant increase of failure rate and no change of PPF ratio; at P21, no significant changes in these parameters (Supplemental Fig. 4).

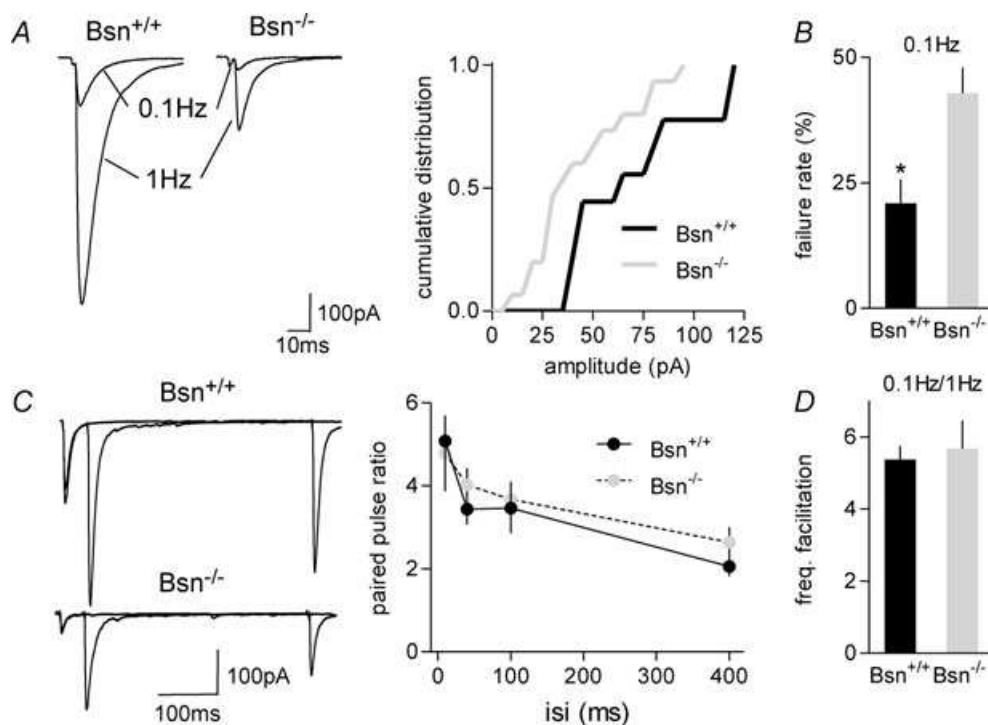


Figure 6. Synaptic transmission is decreased in $Bsn^{-/-}$ mice at P14

A, average of 50 traces (left) illustrating LFF of MF-EPSCs when shifting stimulation from 0.1 to 1 Hz for $Bsn^{+/+}$ and $Bsn^{-/-}$ mice. Cumulative distribution (right) of average MF-EPSCs at 0.1 Hz ($Bsn^{+/+}$: $n = 9$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 15$). B, bar graph of failure rate at 0.1 Hz ($Bsn^{+/+}$: $n = 9$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 15$). C, average of 20 traces (left) illustrating PPF at 40 and 400 ms for $Bsn^{+/+}$ and $Bsn^{-/-}$ mice. Summary graph (right) of PPF ratio at 10, 40, 100 and 400 ms ($Bsn^{+/+}$: $n = 8$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 9$). Isi: interstimulus interval. * $P < 0.05$. D, bar graph of mean LFF ratio from 0.1 to 1 Hz ($Bsn^{+/+}$: $n = 8$ and $Bsn^{-/-}$: $n = 13$).

Morphological correlates of MF synaptic transmission impairment in *Bsn*^{-/-} mice

To compare the developmental course of assembly of presynaptic cytomatrix in MF synapses we performed immunostaining of brain sections from *Bsn*^{-/-} and

their wild-type littermates at P7, 14 or 21 (Fig. 7A). Anti-synaptophysin antibodies were used to identify the presynapses of MF and anti-Munc13-1 to label active zones. The active zones of MF–CA3 synapses were counted as detectable discrete spots of Munc13-1 staining. The

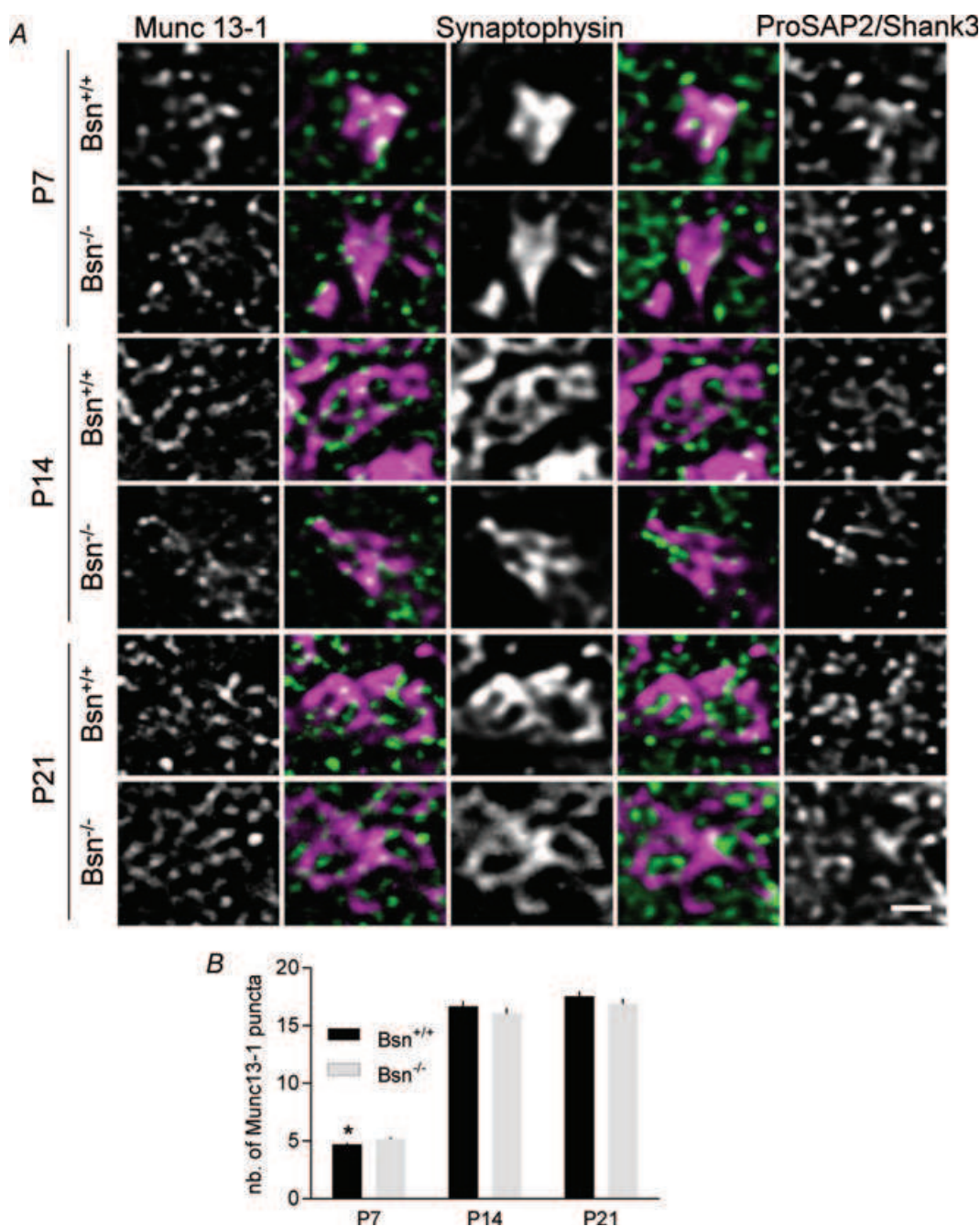


Figure 7. Increased number of active zones at P7 in *Bsn*^{-/-} mice

A, brain sections of *Bsn*^{+/+} and *Bsn*^{-/-} animals killed at days of P7, P14 and P21 days were stained with antibody against the active zone protein Munc13-1 (first column), the presynaptic marker protein synaptophysin (third column) and the postsynaptic marker ProSAP2/Shank3 (fifth column). Staining of single MF terminals is shown on maximal projections of confocal stacks. Second and fourth columns show overlay of images on their right and left. Scale bar 1 μ m. B, bar graph showing the quantification of the numbers of Munc13-1 puncta in MF terminals. * $P < 0.05$.

quantitative analysis revealed a slightly but significantly increased number of Munc13-1 puncta per MF–CA3 synapse in $Bsn^{-/-}$ animals at P7 compared to $Bsn^{+/+}$ ($Bsn^{+/+}$: 4.7 ± 0.1 sites, $n = 59$ and $Bsn^{-/-}$: 5.2 ± 0.1 sites, $n = 58$, $P = 0.01$) (Fig. 7B). On the contrary, no significant differences could be found in MF–CA3 synapses at later time points (P14: $Bsn^{+/+}$: 16.0 ± 0.4 sites, $n = 60$ and $Bsn^{-/-}$: 16.6 ± 0.4 sites, $n = 60$, $P = 0.35$; P21: $Bsn^{+/+}$: 16.8 ± 0.4 sites, $n = 61$ and $Bsn^{-/-}$: 17.5 ± 0.4 sites, $n = 74$, $P = 0.28$). This suggests that at P7 but not at P14 or P21, there is more presynaptic active zone containing Munc13-1, at least large enough to be observed optically. The apparent discrepancy between immunofluorescent and electrophysiological data at P14 might simply indicate that the presence of a presynaptic active zone does not necessarily mean functional release site as has been suggested by Altrock *et al.* (2003).

Discussion

In this report we show that the course of functional maturation of hippocampal MF–CA3 synapses during the first 2 weeks of postnatal development is markedly impaired in $Bsn^{-/-}$ mice. Interestingly three stages can be distinguished: a gain of function at the end of the first week, a loss of function at the end of the second week and an apparent normalization with some impairment of PTP, but normal presynaptic LTP at the end of the third week (Fig. 7). Our data thus point to a complex function of Bassoon in synaptic maturation that might be due to defects in the structural organization of the presynaptic active zone during key steps of postnatal development.

The maturation of MF–CA3 synapses is likely to extend from the very first postnatal days (P0–P3), when the first synaptic contacts are made, up to delayed changes in morphological and probably physiological properties well into adulthood (Amaral & Dent, 1981; Marchal & Mulle, 2004; Gogolla *et al.* 2009). During the first days of postnatal development, MF–CA3 synaptic currents can be recorded, although they display very low probability of release and high fatigue and thus appear as presynaptically ‘silent’ (Gasparini *et al.* 2000). Before P6, MF-EPSCs are of low amplitude, are devoid of a kainate receptor component, and display a moderate extent of presynaptic plasticity (Marchal & Mulle, 2004). At this stage it has also been reported that GABA acts as a neurotransmitter in addition to glutamatergic synaptic signalling (Safilina, 2006). The beginning of the second week (P6–P9) has been described as a critical period of synaptic development at MF–CA3 synapses because it is characterized by a steep and robust increase in the average amplitude of MF-EPSCs, the appearance of both postsynaptic KARs and prominent forms of short-term plasticity (Marchal & Mulle, 2004). The data we obtained with $Bsn^{+/+}$ mice

are in quite good agreement with this previous report despite differences in mouse strains and experimental conditions. In addition, we report that during a critical period of maturation, between P5 and P9, the paired-pulse ratio increases earlier than basal MF-EPSC amplitudes and success rate at 0.1 Hz (Fig. 8). This suggests that, while the number of release sites increases (Amaral & Dent, 1981), the probability of release at each site decreases. After P9, MF-EPSC amplitude increases, as a possible consequence of an increase in the number of release sites. Between P14 and P21, the properties of basal synaptic transmission seem to stabilize. However, LFF keeps increasing during this period suggesting a delayed maturation of more complex presynaptic properties (Fig. 8). It should be noted that the presynaptic form of LTP specific to this synapse also emerges at this period (Battistin & Cherubini, 1994).

As shown previously (Altrock *et al.* 2003), the protein Bassoon is not essential for synapse formation and function. However, the maturation of synaptic properties is clearly impaired in the absence of Bassoon, at least at the hippocampal mossy fibre synapse. In $Bsn^{-/-}$ mice, basal MF-EPSC amplitude and success rate increase before paired pulse ratio during the critical period of maturation (P5–P9). This suggests that the number of release site increases before the release probability decreases contrary to wild-type mice (Fig. 8). At P7, we recorded MF-EPSCs of unusual large amplitude (‘maxi’ MF-EPSCs). The slight increase in quantal content revealed by the mean amplitude of Sr^{2+} -evoked asynchronous MF-EPSCs is unlikely to be sufficient to account for the presence of ‘maxi’ MF-EPSCs. In addition, we cannot exclude that these asynchronous MF-EPSCs arise from a different pool of vesicles than the synchronously evoked MF-EPSCs in control conditions (Neher & Sakaba, 2008). The higher release probability and the changes in quantal content are in favour of a deficit at both pre- and postsynaptic levels. A critical structural determinant for synaptic transmission at a multisite synapse, like the MF–CA3 synapse, is the spacing between individual active zones as well as the organization of the pool of vesicles, which has not yet been precisely examined at early stages of postnatal development. However, this organization was reported to differ in young (P28) and adult rats (Rollenhagen *et al.* 2007), with synaptic vesicles evenly distributed in the MF terminal at P28, and clustered in the adult stage. It could be speculated that unequal distribution of CAZ components to active zones due to the lack of Bassoon might impair the precise organization of vesicles in the presynaptic terminal. Here we report a slight increase in the number of Munc13-1 puncta at P7. This could reflect an increased number of release sites but also an impaired organization of the CAZ. One possibility might be that Bassoon is important for the fine positioning of release ready vesicles and Ca^{2+} channels. Accordingly, it has been reported that release probability depends on the distance

between fusion competent vesicles and Ca^{2+} channels (Wadel *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008). Furthermore, as pre- and postsynaptic compartments mature in parallel, presynaptic changes could be linked to an increase in the size of the PSD and of the number of postsynaptic AMPA receptors, as suggested by the observed increase in quantal size in $\text{Bsn}^{-/-}$ mice.

At P9, we observed an apparent normalization of synaptic parameters in $\text{Bsn}^{-/-}$ mice, which appeared to be transitory. Indeed, at P14, we observed a decrease of MF-EPSC amplitude that is reminiscent of what was observed in CA1 (Altrock *et al.* 2003). In this earlier work the reason why *Bsn* mutation only affected a fraction of synapses impinging onto a given neuron was unclear, given the fact that Bassoon is present in $\geq 90\%$ of hippocampal synapses together with Piccolo. Here we show that a single MF-CA3 synapse with multiple release sites might contain a fraction of non-functional sites. This is suggested by the fact that the decrease in average MF-EPSC amplitude correlates directly with the decrease in success rate without any change in aEPSCs nor short-term facilitation (Fig. 8). These data seem to confirm the earlier interpretation made for CA1 proposing a microheterogeneity of hippocampal synapses (Rosenmund *et al.* 2002; Altrock *et al.* 2003). This notion can now be extended to microheterogeneity even within a single multisite presynaptic terminal. A recent study in the calyx of Held showed that within a single presynaptic terminal, only 60% of Bassoon and

Piccolo clusters overlapped, while the remaining clusters contained either Bassoon or Piccolo (Dondzillo *et al.* 2010). A molecular explanation for this observation might be provided by recent data showing that the disturbance of the interaction between Bassoon and dynein light chain impairs the reliability of Bassoon and Piccolo delivery to synapses, as shown by a much higher variance in the content of these proteins in individual synapses/active zones (Fejtova *et al.* 2009).

Finally, at more mature synapses (P21), we did not observe any significant differences in basal synaptic transmission in $\text{Bsn}^{-/-}$ mice. We cannot exclude that some differences persist but did not reach statistical significance because of the overall variability in between MF-synapses. The significantly decreased PTP we observed in $\text{Bsn}^{-/-}$ mice might argue in favour of persistent underlying impairments. PTP is a form of presynaptic short-term potentiation that neurons exhibit after high frequency tetanus. PTP is likely to be due to a tetanus-induced elevation in presynaptic Ca^{2+} which leads to a short-lived increase in release probability (Griffith, 1990; Regehr *et al.* 1994). At MF-CA3 synapses, the mechanisms of PTP have not been fully characterized. However, changes in PTP could result from alterations in presynaptic Ca^{2+} entry or in the size of the readily releasable pool (RRP) of vesicles (Zucker & Regehr, 2002). This last hypothesis is supported by the apparent decrease in the RRP at autaptic synapses of cultured hippocampal neurons (Altrock *et al.* 2003).

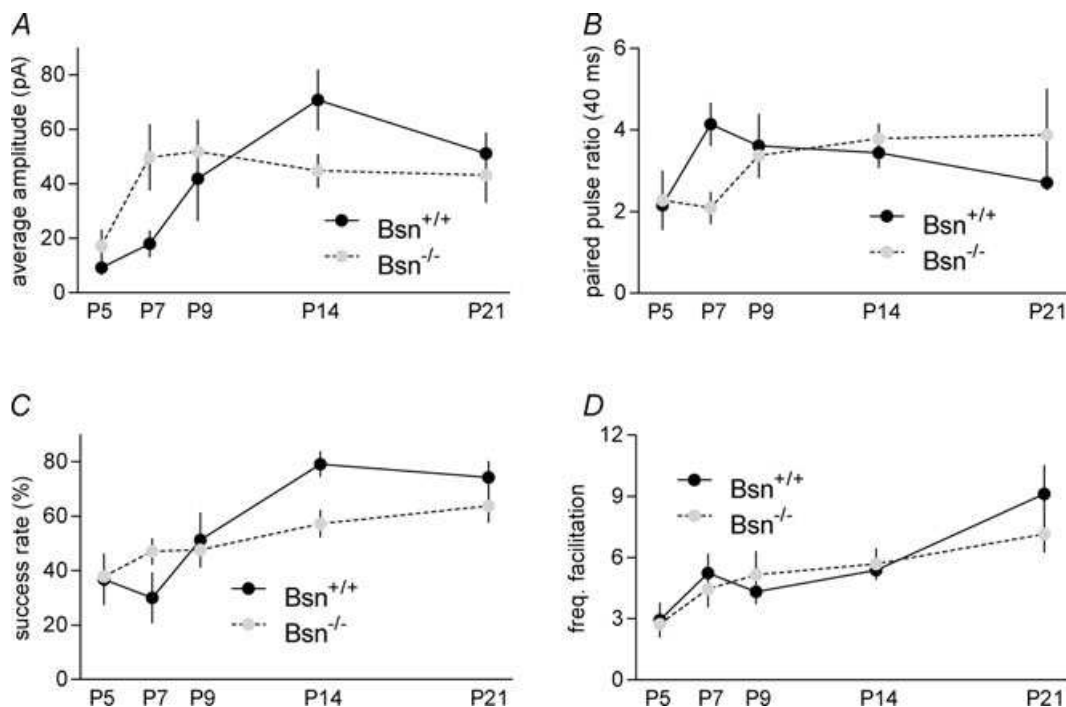


Figure 8. MF-EPSC amplitudes at 0.1 Hz, PPF ratio at 40 ms, success rate at 0.1 Hz and LFF ratio from 0.1 to 1 Hz

Summary graphs of average MF-EPSC amplitudes at 0.1 Hz (A), PPF ratio at 40 ms (B), success rate at 0.1 Hz (C) and LFF ratio from 0.1 to 1 Hz (D) in $\text{Bsn}^{+/+}$ (black circles) and $\text{Bsn}^{-/-}$ (grey circles) at P5, P7, P9, P14 and P21.

At P21, *Bsn*^{-/-} mice could have less fusion-competent synaptic vesicles in MF synapses without significantly affecting synaptic transmission, release probability and presynaptic short-term plasticity except PTP.

Overall, MF–CA3 synaptic transmission shows opposite abnormalities at two distinct phases of postnatal development in *Bsn*^{-/-} mice. It cannot be predicted whether these early abnormalities in synaptic transmission bear important functional consequences in terms of higher brain function. Whatever, this study highlights the fact that in some instances, the mutation of a gene might be considered as without any effect on synaptic function when analysed at a single time point, whereas the proper course of development is affected. Compensatory mechanisms appear to alleviate the lack of a functional Bassoon protein at MF–CA3 synapses. However, it should be reminded that *Bsn*^{-/-} mice display an epileptic phenotype, for which there is no direct synaptic explanation (Altrock *et al.* 2003; Ghiglieri *et al.* 2009). One can speculate that this epileptic phenotype might lie in a subtle imbalance in hippocampal network activity, which could find a cause in an abnormal synaptic maturation process. A difficult question that lies beyond the scope of this study relates to the question of the nature of the compensatory mechanisms taking place during development in *Bsn*^{-/-} mice. Hence the postnatal development of the MF synapse is a complex but tightly controlled process, which depends on the organizing properties of presynaptic scaffold proteins, such as Bassoon.

References

- Altrock WD, Tom Dieck S, Sokolov M, Meyer AC, Sigler A, Brakebusch C, Fässler R, Richter K, Boeckers T, Potschka H, Brandt C, Löscher W, Grimberg D, Dresbach T, Hempelmann A, Hassan H, Balschun D, Frey JU, Brandstätter JH, Garner CC, Rosenmund C & Gundelfinger E (2003). Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon. *Neuron* **37**, 787–800.
- Amaral DG & Dent JA (1981). Development of the mossy fibres of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibres and their expansions. *J Comp Neurol* **195**, 51–86.
- Battistin T & Cherubini E (1994). Developmental shift from long-term depression to long-term potentiation at the mossy fibre synapses in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **6**, 1750–1755.
- Bekkers JM & Clements JD (1999). Quantal amplitude and quantal variance of strontium-induced asynchronous EPSCs in rat dentate granule neurons. *J Physiol* **516**, 227–248.
- Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED & Bockers TM (2002). ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53. *J Neurochem* **83**, 1013–1017.
- Dondzillo A, Satzler K, Horstmann H, Altrock WD, Gundelfinger ED & Kuner T (2010). Targeted three-dimensional immunohistochemistry reveals localization of presynaptic proteins Bassoon and Piccolo in the rat calyx of Held before and after the onset of hearing. *J Comp Neurol* **518**, 1008–1029.
- Fejtova A, Davydova D, Bischof F, Lazarevic V, Altrock WD, Romorini S, Schone C, Zuschratter W, Kreutz MR, Garner CC, Ziv NE & Gundelfinger ED (2009). Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of Bassoon. *J Cell Biol* **185**, 341–355.
- Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempf U, Kindler S, Gundelfinger ED & Garner CC (2000). Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* **25**, 203–214.
- Gasparini S, Saviane C, Voronin LL & Cherubini E (2000). Silent synapses in the developing hippocampus: lack of functional AMPA receptors or low probability of glutamate release? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9741–9746.
- Ghiglieri V, Picconi B, Sgobio C, Bagetta V, Barone I, Paille V, Di Filippo M, Polli F, Gardoni F, Altrock W, Gundelfinger ED, De Sarro G, Bernardi G, Ammassari-Teule M, Di Luca M & Calabresi P (2009). Epilepsy-induced abnormal striatal plasticity in Bassoon mutant mice. *Eur J Neurosci* **29**, 1979–1993.
- Gogolla N, Galimberti I, Deguchi Y & Caroni P (2009). Wnt signalling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fibre connectivities in the adult hippocampus. *Neuron* **62**, 510–525.
- Griffith WH (1990). Voltage-clamp analysis of posttetanic potentiation of the mossy fibre to CA3 synapse in hippocampus. *J Neurophysiol* **63**, 491–501.
- Henze DA, Urban NN & Barrionuevo G (2000). The multifarious hippocampal mossy fibre pathway: a review. *Neuroscience* **98**, 407–427.
- Marchal C & Mulle C (2004). Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *J Physiol* **561**, 27–37.
- Neher E & Sakaba T (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* **59**, 861–872.
- Nicoll R & Schmitz D (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* **6**, 863–876.
- Regehr WG, Delaney KR & Tank DW (1994). The role of presynaptic calcium in short-term enhancement at the hippocampal mossy fibre synapse. *J Neurosci* **14**, 523–537.
- Richter K, Langnaese K, Kreutz MR, Olias G, Zhai R, Scheich H, Garner CC & Gundelfinger ED (1999). Presynaptic cytomatrix protein bassoon is localized at both excitatory and inhibitory synapses of rat brain. *J Comp Neurol* **408**, 437–448.
- Rollenhagen A, Satzler K, Rodriguez EP, Jonas P, Frotscher M & Lubke JH (2007). Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fibre synapses. *J Neurosci* **27**, 10434–10444.
- Rosenmund C, Sigler A, Augustin I, Reim K, Brose N & Rhee JS (2002). Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* **33**, 411–424.

- Safulina VF (2006). GABAergic signalling at mossy fibre synapses in neonatal rat hippocampus. *J Neurosci* **26**, 597–608.
- Salin PA, Scanziani M, Malenka RC & Nicoll RA (1996). Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13304–13309.
- Schoch S & Gundelfinger E (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* **326**, 379–391.
- Shapira M, Zhai RG, Dresbach T, Bresler T, Torres VI, Gundelfinger E, Ziv N & Garner CC (2003). Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. *Neuron* **38**, 237–252.
- tom Dieck S, Sanmarti-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kampf U, Franzer JT, Stumm M, Garner CC & Gundelfinger ED (1998). Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* **142**, 499–509.
- Wadel K, Neher E & Sakaba T (2007). The coupling between synaptic vesicles and Ca^{2+} channels determines fast neurotransmitter release. *Neuron* **53**, 563–575.
- Wang LY, Neher E & Taschenberger H (2008). Synaptic vesicles in mature calyx of Held synapses sense higher nanodomain calcium concentrations during action potential-evoked glutamate release. *J Neurosci* **28**, 14450–14458.
- Zhai R (2000). Temporal appearance of the presynaptic cytomatrix protein bassoon during synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci* **15**, 417–428.
- Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE & Garner CC (2001). Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron* **29**, 131–143.
- Zhang L, Volkmandt W, Gundelfinger ED & Zimmermann H (2000). A comparison of synaptic protein localization in hippocampal mossy fibre terminals and neurosecretory endings of the neurohypophysis using the cryo-immunogold technique. *J Neurocytol* **29**, 19–30.
- Zucker RS & Regehr WG (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **64**, 355–405.

Author contributions

F.L., C.B. and C.M. designed the experiments. E.D.G. provided the Bsn mutant mice. F.L. and C.B. performed the experiments and analysed the data. F.L., C.B. and C.M. wrote the paper. A.F., D.B. and E.D.G. critically revised the manuscript. A.F., D.B., K.R. and P.P. provided preliminary experiments on Bsn^{-/-} mice. All authors approved the final version of the paper for publication.

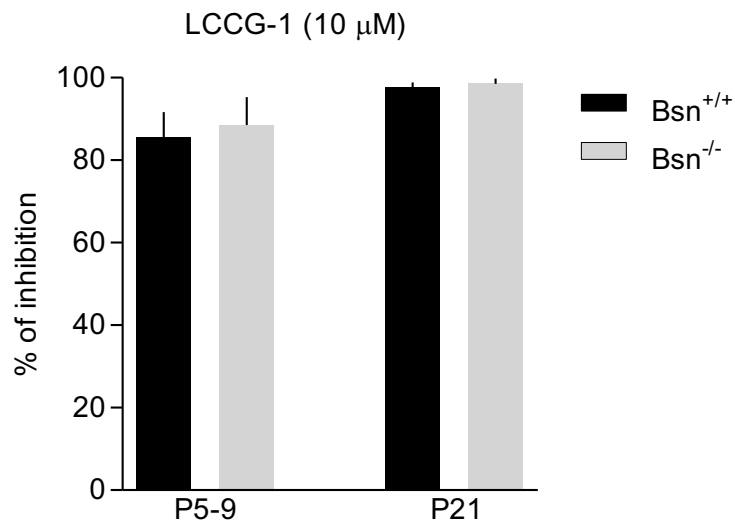
Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Ministère de la Recherche of France, the Conseil Régional of Aquitaine, the European Commission (SYNSCAFF program, contract number LSH-2003-511995), the Fondation pour la Recherche Médicale and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB779/B9). We thank Alice Vimeney, Audrey Lacquemant, Noëlle Grosjean and Bettina Kracht for technical assistance and mouse breeding.

Author's present address

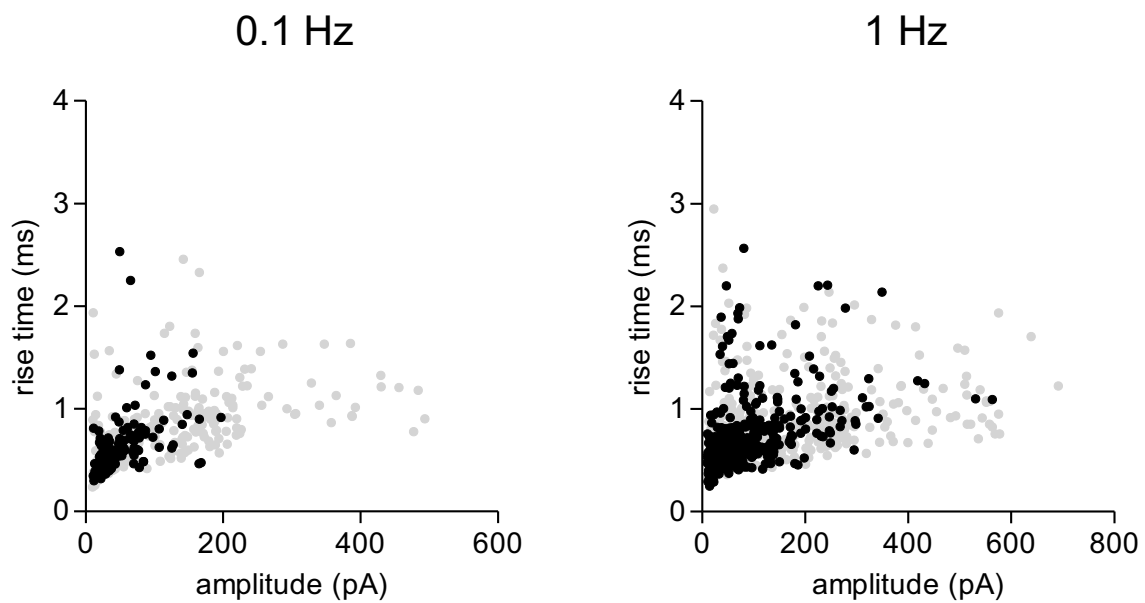
D. Balschun: Laboratory of Biological Psychology, University of Leuven, Tiensestraat 102, 3000 Leuven, Belgium.

Supplementary figure 1



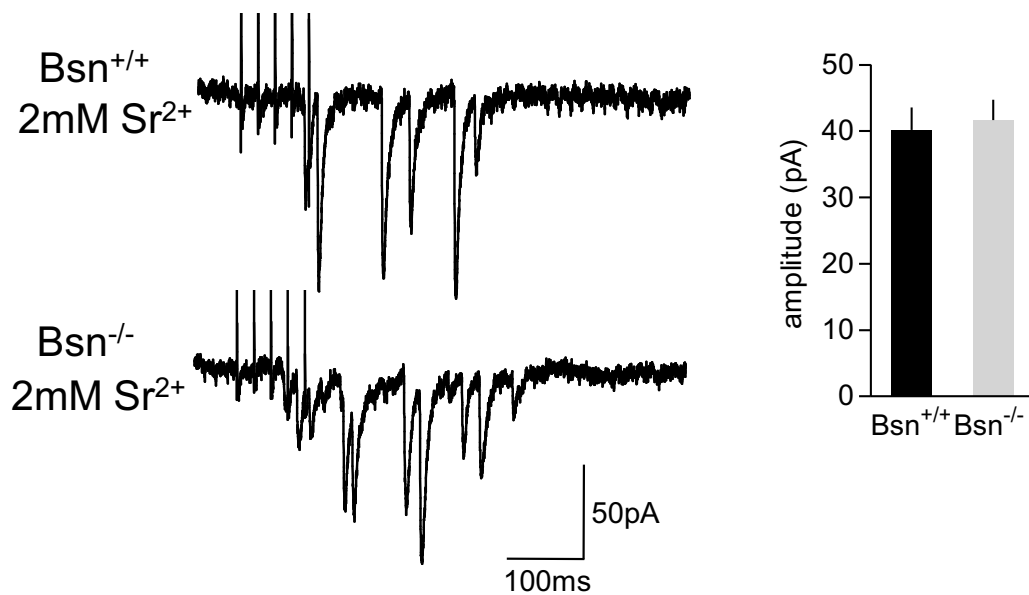
Supplementary figure 1. LCCG-1 (10 μM) inhibition of Mf-EPSCs at P5-9 and P21 in Bsn^{+/+} and Bsn^{-/-} mice. (P5-9: Bsn^{+/+}: 85.4 ± 6.1, n = 11 and Bsn^{-/-}: 88.4 ± 6.7, n = 7, p = 1.00; P21: Bsn^{+/+}: 97.6 ± 1.2, n = 9 and Bsn^{-/-}: 98.4 ± 1.3, n = 15, p = 0.27).

Supplementary figure 2



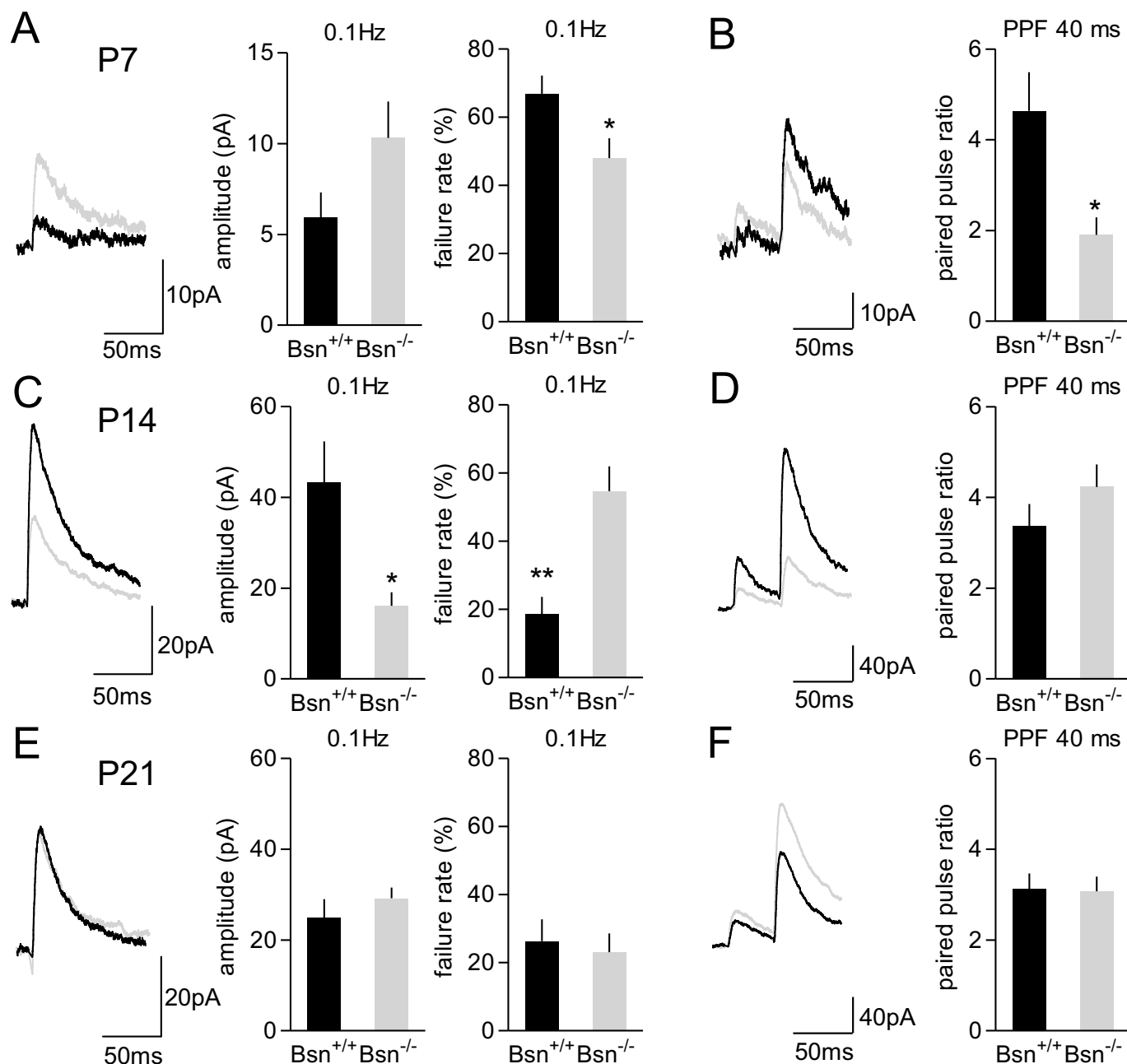
Supplementary figure 2. Plots of rise time (20 – 80 % in ms) at 0.1 Hz (left) and 1 Hz (right) as a function of individual Mf-EPSC amplitude at P7 for *Bsn*^{+/+} (black circles) and *Bsn*^{-/-} (gray circles) mice.

Supplementary figure 3



Supplementary figure 3. Decrease in Mf-EPSCs at P14 is not due to a change in quantal size. Representative recordings of Mf-EPSCs in response to a train of 5 Mf stimuli (50 Hz, every 10 s) in an extracellular medium where Ca^{2+} is replaced by Sr^{2+} (2 mM) in *Bsn*^{+/+} (top left) and *Bsn*^{-/-} (bottom left) mice. Histogram of average aEPSCs amplitude (right) (*Bsn*^{+/+}: n = 10 and *Bsn*^{-/-}: n = 9).

Supplementary figure 4



Supplementary figure 4. Under physiological conditions, synaptic transmission is impaired in Bsn^{-/-} mice. **A, C, E**, average of 50 traces (left) illustrating NMDAR-mediated Mf-EPSCs at 0.1 Hz in Bsn^{+/+} (black trace) and Bsn^{-/-} (gray trace) mice at P7, P14 and P21. Histograms of average Mf-EPSCs (middle) (P7 (**A**): Bsn^{+/+}: 5.9 ± 1.3 pA, $n = 11$ and Bsn^{-/-}: 10.3 ± 6.6 pA, $n = 11$, $p = 0.11$; P14 (**C**): Bsn^{+/+}: 43.2 ± 9.0 pA, $n = 11$ and Bsn^{-/-}: 16.1 ± 2.9 pA, $n = 9$, $p = 0.01$ and P21 (**E**): Bsn^{+/+}: 24.9 ± 4.0 pA, $n = 7$ and Bsn^{-/-}: 29.2 ± 2.2 pA, $n = 9$, $p = 0.4$) and failure rate (right) (P7 (**A**): Bsn^{+/+}: 18.7 ± 4.9 %, $n = 11$ and Bsn^{-/-}: 54.6 ± 7.3 %, $n = 9$, $p = 0.002$; P14 (**C**): Bsn^{+/+}: 18.7 ± 4.9 %, $n = 11$ and Bsn^{-/-}: 54.6 ± 7.3 %, $n = 9$, $p = 0.002$ and P21 (**E**): Bsn^{+/+}: 26.2 ± 6.4 %, $n = 7$ and Bsn^{-/-}: 23.1 ± 5.4 %, $n = 9$, $p = 0.59$) at 0.1 Hz. **B, D, F**, averages of 20 traces (left) illustrating PPF at 40 ms in Bsn^{+/+} (black trace) and Bsn^{-/-} (gray trace) mice at P7, P14 and P21. Histograms of PPF ratio at 40 ms (right) (P7 (**B**): Bsn^{+/+}: 4.6 ± 0.8 , $n = 9$ and Bsn^{-/-}: 1.9 ± 0.3 , $n = 11$, $p = 0.01$; P14 (**D**): Bsn^{+/+}: 3.3 ± 0.4 , $n = 12$ and Bsn^{-/-}: 4.2 ± 0.4 , $n = 11$, $p = 0.16$ and P21 (**F**): Bsn^{+/+}: 3.1 ± 0.3 , $n = 7$ and Bsn^{-/-}: 3.0 ± 0.3 , $n = 9$, $p = 1.00$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

C. Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que la maturation fonctionnelle des synapses fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 chez les souris mutantes présente trois stades distincts. A la fin de la première semaine de vie post-natale, on observe chez les souris $Bsn^{-/-}$ une augmentation de la transmission synaptique suivie d'une diminution à la fin de la deuxième semaine puis une normalisation à la fin de la troisième semaine. Nos données mettent en avant la complexité de la mise en place des terminaisons présynaptiques et le rôle de Bassoon dans ce processus.

La période entre P6 et P9 à la fibre moussue a été définie comme étant une période critique de maturation fonctionnelle (Marchal and Mulle, 2004). Durant cette période, l'amplitude de la transmission synaptique augmente de façon importante. Dans cette étude, nous avons confirmé les données obtenues auparavant. De plus, nous avons montré que l'augmentation de la transmission synaptique entre P5 et P9 est précédée par une augmentation de la facilitation en paire suggérant que l'augmentation du nombre de sites de libération est accompagnée par une diminution de la probabilité de libération à chaque site. Entre P14 et P21, l'amplitude de la transmission synaptique semble se stabiliser alors que la facilitation en fréquence continue d'augmenter. Cela signifie que la maturation fonctionnelle de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 continue d'évoluer notamment avec la mise en place de propriétés présynaptiques plus complexes.

Chez les souris $Bsn^{-/-}$, la facilitation en paire augmente entre P5 et P7 suggérant une diminution de la probabilité de libération alors que l'augmentation de l'amplitude des courants synaptiques se fait entre P7 et P9. Cela suggère que le nombre de sites de libération augmente après la diminution de la probabilité de libération. Cette hypothèse a été confirmée par nos données en immunohistochimie qui montrent une augmentation du nombre de sites de libération à P7. De plus, à cet âge, nous avons enregistré des événements d'amplitude importante chez les souris $Bsn^{-/-}$ dus à une augmentation de la probabilité de libération à ces synapses. Il faut également noter l'augmentation de l'amplitude de la réponse synaptique suite à la libération d'un quantum de glutamate. L'absence de la protéine Bassoon entraîne ainsi un déficit de la maturation synaptique aussi bien au niveau pré- que postsynaptique. Comme il a été réalisé à P28 et chez le rat adulte (Rollenhagen et al., 2007), il serait intéressant de déterminer l'organisation structurale, par microscopie électronique, des sites de libération et des densités postsynaptiques à cette synapse chez les souris déficientes pour la protéine Bassoon à cette période de développement (P5-P9). En effet, Bassoon pourrait jouer un rôle dans l'organisation et la mise en place des sites de libération au cours de la maturation. L'augmentation de la probabilité de

libération de neurotransmetteur est liée au positionnement des canaux calciques responsables de la fusion des vésicules (Wadel et al., 2007). A P7, chez les souris $Bsn^{-/-}$, l'augmentation de la probabilité de libération pourrait également être due à un mauvais positionnement de ces canaux calciques.

A P14, les souris $Bsn^{-/-}$ présentent une diminution de la transmission synaptique due à une augmentation du nombre d'échecs de la transmission synaptique et non à un changement de la probabilité de libération, ni du nombre de sites de libération de neurotransmetteur. Notre hypothèse est qu'une fraction des sites de libération au sein d'une synapse est silencieuse comme il a été montré au niveau de la région CA1 dans l'hippocampe (Altrock et al., 2003). Ceci suggère une microhétérogénéité dans la composition en protéines présynaptiques des sites de libération comme au niveau de CA1 ou du Calyx de Held (Rosenmund et al., 2002; Dondzillo et al., 2010). Le Calyx de Held est également une synapse multi-sites et il a été montré qu'une fraction de sites de libération ne contenait que la protéine Bassoon et que l'autre fraction contenait soit Piccolo seule, soit à la fois Bassoon et Piccolo dans 60 % des cas (Dondzillo et al., 2010). Cette hypothèse suggère que les sites de libération ne contenant ni Bassoon, ni Piccolo sont mis en place correctement mais restent non fonctionnels. Cependant, l'inhibition de l'expression de la protéine Bassoon par shRNA chez les souris déficientes pour la protéine Piccolo n'entraîne pas la perte de la libération de neurotransmetteur (Mukherjee et al., 2010).

A P21, la transmission synaptique et les paramètres de facilitation présynaptique à court terme sont identiques entre les souris $Bsn^{+/+}$ et $Bsn^{-/-}$. Cependant, une diminution de la potentialisation post-tétanique (PTP), suite à des trains de stimulation à haute fréquence, est observée chez les souris $Bsn^{-/-}$. La PTP est due à une élévation de la concentration en Ca^{2+} présynaptique entraînant une augmentation de la probabilité de libération. Les mécanismes moléculaires responsables de cette forme de plasticité à court terme ne sont pas connus à cette synapse. Cependant, la diminution de la PTP chez les souris $Bsn^{-/-}$ pourrait être due à une diminution de l'entrée de Ca^{2+} dans la terminaison présynaptique ou à une diminution du RRP (Zucker and Regehr, 2002). Cette dernière hypothèse est soutenue par le fait que le RRP est diminué au niveau des synapses autaptiques glutamatergiques dans des cultures de neurones hippocampiques (Altrock et al., 2003). Une étude récente dans le cervelet, au niveau des synapses entre fibres moussues et cellules granulaires, a montré que la perte de Bassoon entraînait une diminution de la vitesse de rechargement des vésicules synaptiques au cours d'un train de stimulation à haute fréquence sans changement de la probabilité de libération, ni du nombre de sites de libération (Abstract SFN 448.19/G49, San Diego, 2010). Cette étude suggère que Bassoon accélérerait le rechargement des vésicules.

Ce travail montre la complexité de la mise en place d'une synapse glutamatergique et l'importance d'étudier l'impact de la délétion d'une protéine synaptique au cours de la mise en place des synapses. Comme Piccolo et Bassoon présentent de fortes homologues, la suppression d'une protéine peut être compensée par l'autre. Seule une souris double KO ou une délétion aigue des deux protéines en utilisant des shRNA ciblant leur expression (Leal-Ortiz et al., 2008; Mukherjee et al., 2010) pourrait apporter une réponse quant aux rôles de ces protéines. L'absence de différence morphologique au sein des synapses du SNC chez la souris $Bsn^{-/-}$ peut être due au fait que la délétion de la partie centrale de la protéine n'abolit pas totalement sa fonction ou parce que la perte de Bassoon est compensée, au cours de la maturation, par la protéine Piccolo. En effet, l'expression de Piccolo est augmentée de 1,5 fois chez les souris $Bsn^{-/-}$ (Altrock et al., 2003).

Nos données immunologiques ne permettent pas d'étudier clairement la morphologie des synapses fibre moussue/cellule pyramidale de CA3. Il serait donc intéressant d'étudier leur ultrastructure par microscopie électronique à P7, P14 et P21 et ainsi de déterminer l'impact de l'altération de la transmission synaptique à ces âges sur la morphologie de la synapse au cours de la maturation. Malgré l'absence de différence morphologique à des stades matures au niveau des synapses glutamatergiques de la région CA1 de l'hippocampe (Altrock et al., 2003), la perte de Bassoon pourrait entraîner des modifications de la structure de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 à des stades immatures.

Toutes les études à ce jour ont analysé le rôle de Bassoon au niveau des synapses excitatrices glutamatergiques. Cependant, cette protéine est également exprimée au niveau des terminaisons présynaptiques inhibitrices (Zhai et al., 2000). L'activité GABAergique au cours de la première semaine de vie post-natale est dépolarisante et entraîne une activité de réseau sous forme de potentiels dépolarisants géants (GDP) (Ben-Ari et al., 1997). Cette activité est importante pour la mise en place des réseaux neuronaux (Leinekugel et al., 1997) et pourrait être modifiée chez les souris $Bsn^{-/-}$ suite à un dysfonctionnement de la libération de GABA.

II. Article 2 : “Concerted morphological and functional maturation during a critical phase of hippocampal mossy fiber development”

Frederic Lanore, Virginie F. Labrousse, Elisabeth Normand, Zsolt Szabo, Christophe Blanchet and Christophe Mulle

En préparation

A. Problématique

La formation des contacts synaptiques au cours du développement est une étape importante conduisant à la mise en place des réseaux neuronaux. Cette formation implique des étapes de maturation mettant en jeu la coordination des éléments pré- et postsynaptique. De plus en plus d'études, chez l'homme, ont mis en évidence des mutations de gènes codant pour des protéines synaptiques étant impliquées dans des maladies neurodéveloppementales telles que l'autisme. Des mutations dans le gène *GRIK2* chez l'homme, codant pour la sous-unité GluK2 des récepteurs kaïnate, entraînent une perte de fonction de la protéine et des retards mentaux (Motazacker et al., 2007). Les récepteurs kaïnate comprenant cette sous-unité sont particulièrement abondants à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 à la fois au niveau pré- et postsynaptique (Mulle et al., 1998; Contractor et al., 2001). Nous avons donc étudié le rôle de la sous-unité GluK2 au cours de la maturation de cette synapse.

B. Résultats

Nous avons tout d'abord étudié la transmission synaptique à la fibre moussue chez les souris déficientes pour la sous-unité GluK2 des récepteurs kaïnate (*GluK2^{-/-}*). L'amplitude de la transmission synaptique, à 0.1 et 1 Hz, chez les souris *GluK2^{+/+}* augmente entre P6 et P21. Cette augmentation est accentuée entre P6 et P9 et est corrélée à la présence d'une composante kaïnate postsynaptique comme reporté précédemment (Marchal and Mulle, 2004). Nos données montrent une diminution de la

transmission synaptique à P8-P9 chez les souris GluK2^{-/-} par rapport aux souris contrôles. Nous avons donc essayé de comprendre quels étaient les mécanismes responsables de l'augmentation de la transmission synaptique entre P6 et P9 et du délai de maturation de la transmission synaptique chez les souris GluK2^{-/-}.

L'augmentation de la transmission synaptique entre P6 et P9 est corrélée à une diminution du nombre d'échecs de la transmission synaptique. Cette diminution peut être attribuée à une augmentation de la probabilité de libération. Cependant, à ce stade de développement, la facilitation en fréquence augmente suggérant plutôt une diminution de la probabilité de libération. L'augmentation de l'amplitude des réponses synaptiques peut également être due à une augmentation du nombre de sites de libération au sein d'une même synapse comme le laisse suggérer l'augmentation des réponses synaptiques moyenne en excluant les échecs de la transmission. Une alternative à cette hypothèse peut être une augmentation du nombre de récepteurs AMPA postsynaptiques ou de leur conductance. Chez les souris GluK2^{-/-}, le retard dans l'augmentation de l'amplitude des réponses synaptiques est accompagnée par une augmentation du nombre d'échecs de la transmission et une diminution des réponses synaptiques excluant les échecs suggérant une diminution du nombre de sites de libération à P8-9 par rapport aux souris GluK2^{+/+} ou bien une diminution de la densité de récepteurs AMPA postsynaptiques ou de leur conductance.

Le changement de sous-unité des récepteurs NMDA au cours du développement, notamment le remplacement de la sous-unité GluN2B par la sous-unité GluN2A, est une étape importante de maturation synaptique dans la plupart des régions cérébrales (van Zundert et al., 2004). Cependant, à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3, cette composante n'a jamais été étudiée au cours de la maturation. Nos résultats montrent que, contrairement à la composante AMPA, l'amplitude des EPSC induits par les récepteurs NMDA est stable entre P6 et P9. De plus, la cinétique des réponses NMDA s'accélère entre P6 et P21 comme il a été montré précédemment (Khazipov et al., 1995). Tôt dans le développement, ces récepteurs sont composés de la sous-unité GluN2B car le Ro25-6981, un inhibiteur des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, inhibe d'environ 50 % l'amplitude des réponses synaptiques NMDA à P8-9 chez les souris GluK2^{+/+}. Le ratio NMDA/AMPA diminue entre P6 et P9 chez les souris GluK2^{+/+} alors que chez les souris GluK2^{-/-}, cette diminution a lieu plus tard au cours de la maturation ce qui est en accord avec le délai de maturation de la composante AMPA. En conclusion, ces expériences suggèrent que l'augmentation de la transmission synaptique AMPA entre P6 et P9, est possiblement due à l'incorporation de récepteurs AMPA au sein de la postsynapse ou à une augmentation de leur conductance.

En plus de suivre des étapes de maturation fonctionnelle définies, la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 suit des étapes de maturation morphologique (Amaral and Dent, 1981). Dans le but de comprendre si la maturation fonctionnelle et morphologique sont liées, nous avons mis en place des infections de lentivirus codant pour une protéine membranaire fluorescente (mYFP) chez le souriceau. Cette technique nous permet de marquer soit les cellules pyramidales de CA3 soit les cellules granulaires du gyrus dentelé afin de marquer leurs axones : les fibres moussues. Dans un premier temps, nous avons analysé la morphologie du compartiment postsynaptique de ces synapses : les excroissances épineuses, entre P6 et P21. Le volume individuel de chaque excroissance épineuse et leur nombre par cellule sont inchangés entre P6 et P9 mais augmentent de façon importante entre P9 et P14, contrairement au changement au niveau fonctionnel qui a lieu entre P6 et P9, chez les souris GluK2^{+/+}. Chez les souris GluK2^{-/-}, l'apparition de ces structures postsynaptiques est retardée et leur volume, à P14, est inférieur à celui observé chez les souris GluK2^{+/+}. Ces données suggèrent donc un délai dans l'apparition des excroissances épineuses en l'absence de la sous-unité GluK2. Nous avons ensuite voulu savoir si ce changement morphologique était associé à une mauvaise mise en place des densités postsynaptiques. Pour cela, nous avons réalisé des marquages immunohistologiques à l'aide de deux marqueurs postsynaptiques : SAP102 et PSD-95. Nos résultats montrent une diminution du nombre de puncta pour ces deux marqueurs chez les souris GluK2^{-/-} par rapport aux souris GluK2^{+/+} à P6 et P21. De plus, nous avons analysé le volume des puncta de SAP102 et PSD-95. Chez les souris GluK2^{+/+}, le volume des puncta de SAP102 et PSD-95 est stable au cours de la maturation alors que chez les souris GluK2^{-/-}, les puncta de SAP102 sont plus volumineux.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé la morphologie des terminaisons présynaptiques des fibres moussues. A P6, la morphologie de ces structures est homogène alors qu'à P9 elles commencent à se complexifier chez les souris contrôles. L'apparition des filopodes, structures émergeant des terminaisons présynaptiques et formant des synapses avec les interneurons de CA3 (Acsady et al., 1998), se fait entre P9 et P14 entraînant une complexification importante de ces structures. Chez les souris GluK2^{-/-}, le volume et la complexité des terminaisons présynaptique est diminué à P9 suggérant un retard dans leur mise en place. Comme pour les densités postsynaptiques, nous avons réalisé des marquages des sites de libération de neurotransmetteur à l'aide de Munc13-1. Munc13-1 est présente au niveau de la zone active (Garner et al., 2000). Le nombre et le volume des puncta de Munc13-1 suivent le même profil que les puncta SAP102. Chez les souris GluK2^{-/-}, la densité de ces puncta est diminuée par rapport aux souris GluK2^{+/+} alors que leur volume est supérieur aux souris contrôles à P14 et P21. La perte de GluK2 entraîne donc une forte perturbation dans la mise en

place, à la fois des éléments pré- et postsynaptiques à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3.

Comme la présence d'un puncta de SAP102, PSD-95 ou Munc13-1 ne veut pas forcément dire présence d'un site de libération, nous avons réalisé des colocalisations Munc13-1/SAP102 et Munc13-1/PSD95. Le pourcentage de colocalisation entre le marqueur pré- et postsynaptique reflète le nombre de sites de libération au niveau du *stratum lucidum*. Ce pourcentage est diminué, pour les marqueurs Munc13-1 et SAP102, chez les souris GluK2^{-/-} entre P6 et P14 suggérant une diminution du nombre de sites de libération.

Concerted morphological and functional maturation during a critical phase of hippocampal mossy fiber synapse development.

By Frederic Lanore, Virginie F. Labrousse, Elisabeth Normand, Zsolt Szabo, Christophe Blanchet and Christophe Mulle

Laboratoire Physiologie Cellulaire de la Synapse, CNRS UMR 5091, University of Bordeaux, 33077 Bordeaux, France.

Running title: maturation of hippocampal mossy fiber synapses

Keywords: hippocampus, mossy fiber, kainate receptors, maturation

Corresponding author: C. Mulle

Tel: +33 5 57 57 40 86

Fax: +33 5 57 57 40 82

e-mail: mulle@u-bordeaux2.fr

Abstract

The *GRIK2* gene, coding for the kainate receptor subunit GluK2 is associated with autism spectrum disorders and learning disabilities. Nevertheless the role of GluK2 in synaptic maturation has not been clearly defined. We analyzed morphological and functional maturation of hippocampal mossy fiber (Mf) synapses in mice deficient for the GluK2 subunit (GluK2^{-/-}). We showed a delay in the functional maturation of hippocampal synaptic contacts in GluK2^{-/-} mice. To know if this delay correlates with impaired morphological changes, we have implemented *in vivo* infections from mouse pups with lentiviruses and performed 3D anatomical reconstruction of thorny excrescences and presynaptic boutons to describe the morphological parameters of Mf-synapses during maturation. Our data demonstrated that the course of structural synaptic maturation is impaired in GluK2^{-/-} mice. This study highlights how synaptic connectivity is established and maintained in healthy and pathological brain and the possible consequence for the construction of synaptic networks.

Introduction

Neuronal circuits in the central nervous system are precisely assembled during development by the formation of synaptic connections between thousands of differentiating neurons. Precise control of the development of synapses and neuronal connectivity is critical for accurate neural network activity and normal brain function at the adult stage. In cortical regions of the brain, most excitatory glutamatergic synapses are established during postnatal development, a period which spans the first few weeks in rodents. Following the initial establishment of synaptic contacts, synapses undergo a phase of maturation that is characterized by profound structural and functional remodeling. Most excitatory synapses in the mammalian brain are formed at dendritic spines (Bourne and Harris, 2008). It is widely believed that changes in spine morphology are correlated with the strength of excitatory synaptic transmission (Toni et al., 1999), in particular during learning-induced plasticity of synaptic circuits (Yuste and Bonhoeffer, 2001). Functionally, synaptic maturation is characterized by postsynaptic changes in the properties of glutamate receptors (Durand et al., 1996; van Zundert et al., 2004), as well by changes in efficacy of release, reliability and short term dynamics (Feldmeyer and Radnikow, 2009). Coordinated developments of pre- and postsynaptic properties are likely correlated with morphological maturation of both compartments.

Improper formation or function of synapses during childhood are common features associated with neurodevelopmental disorders, including mental retardation (Boda et al., 2010; Humeau et al., 2009) and autism spectrum disorders (Toro et al., 2010). A substantial amount of studies on the underlying mechanisms were performed *in vitro* from models with gene mutations mimicking those found in humans. Gain and loss of function approaches in mouse models of mental retardation have revealed alterations in function, plasticity and spine morphology. A further and complementary step is to understand how mutations of genes associated with neurodevelopmental disorders impair the course of synaptic development and maturation *in vivo*.

A recent genetic study found loss of function mutations in the *GRIK2* gene, encoding the GluK2 subunit of kainate receptors, that cosegregated with nonsyndromic autosomal recessive mental retardation in a consanguineous family (Motazacker et al., 2007). Kainate receptors play an important role in the regulation of network activity in the mature hippocampus by acting at both pre- and postsynaptic sites (Pinheiro and Mulle, 2006). Besides the functional importance of GluK2 for higher brain function, highlighted by this genetic study, we reasoned that GluK2 may also serve in the activity-dependent refinement of synaptic connections during development,

leading to improper maturation of neuronal networks involved in memory. Kainate receptors and especially those comprising the GluK2 subunit are particularly abundant at pre- and postsynaptic levels at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses (Contractor et al., 2001; Mulle et al., 1998). The hippocampal mossy fibers (Mf) are axons from dentate granule cells that make characteristic synaptic connections with large spines of both CA3 pyramidal neurons and hilar mossy cells (Henze et al., 2000). These glutamatergic synapses display a number of unique functional features that have been rather well studied in the mature rodent brain and play a major role in learning and memory (Kesner, 2007). The presynaptic elements at mossy fiber synapses are large and complex structures which are susceptible to long term morphological rearrangement (Galimberti et al., 2010; Galimberti et al., 2006; Gogolla et al., 2009).

Hippocampal Mf-synapses constitute an attractive model to investigate patterns of synaptic maturation and to establish direct links between the different steps of morphological and functional development. In mice, Mf synaptic contacts are established following concurrent pre- and postsynaptic morphological changes that take place during the first two weeks of development (Amaral and Dent, 1981). First functional mossy fiber contacts can be observed just after birth, although they appear unstable and have been identified as presynaptically silent (Gasparini et al., 2000). In addition, evidence has been provided that Mf release GABA during the first week of postnatal life (Safiulina et al., 2006). A parallel study has characterized steps of functional maturation of Mf-synapses during the first 3 weeks of postnatal development with the identification of a "critical" phase between P6 and P9 during which the composition of postsynaptic glutamate receptors and the strength of synaptic connections change abruptly (Marchal and Mulle, 2004). Short-term dynamics of Mf-synapses (frequency-dependent facilitation) is subject to protracted modifications during the following weeks (Mori-Kawakami et al., 2003).

In the present study, we have analyzed the coordinated maturation of pre- and postsynaptic elements at hippocampal Mf-synapses at a structural and functional level, during the first three weeks of postnatal development. We have combined 3D anatomical reconstruction of thorny excrescences and presynaptic boutons, with detailed analysis of synaptic properties, at critical stages of postnatal development. These analyses were performed in parallel in control mice and in mice deficient for the GluK2 subunit, as a mouse model of autosomal non-syndromic mental retardation.

Methods

Experimental procedures followed the recommendations of the CNRS ethics committee and the French Ministry of Agriculture and Forestry concerning animal care (authorization number, A33093). Mice deficient for the GluK2 subunit were produced on a hybrid C57Bl6/SV129 background and backcrossed for 12 generations on an FVB background. For the experiments, wild type (GluK2^{+/+}) and GluK2 knock-out (GluK2^{-/-}) mice were obtained from littermates of heterozygous breeding pairs.

Electrophysiology

Pups and young mice were killed by cervical dislocation. Parasagittal brain slices (350 μ m thick) were prepared from P6 to P21 mice (P0 being the day of birth). For the dissection and the storage of the slices, a solution containing: 80 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.5 mM NaH₂PO₄, 7 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 10 mM Glucose and 75 mM Sucrose (equilibrated with 95% O₂/ 5% CO₂) was used. Slices were incubated at 33 °C for 30 min and subsequently stored at room temperature. Whole-cell voltage-clamp recordings (2.6-3.4 M Ω electrodes, -70 mV holding potential) were made from hippocampal CA3 pyramidal cells visualized by infrared video-microscopy. Experiments were performed at near physiological temperature (33°C). Slices were superfused with extracellular solution composed of: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 4 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 11 mM Glucose and equilibrated with 95% O₂/ 5% CO₂. Bicuculline (10 μ M) and D-AP5 (25 μ M) were added to the bath to inhibit GABA_A and NMDA receptors respectively. Intracellular solution was composed of: 122 mM CsMethanesulfonate, 2 mM NaCl, 10 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 4 mM ATP-Na (pH 7.3). To record NMDA-EPSCs, cells were clamped at +30 mV and NMDA-EPSCs were isolated by blocking AMPA and kainate receptors with 10 μ M NBQX.

Mf-EPSCs were evoked by minimal intensity stimulation (Marchal and Mulle, 2004; Sachidhanandam et al., 2009). A glass microelectrode was placed in the hilus of the dentate gyrus to stimulate Mfs. While recording from a CA3 pyramidal cell, the stimulating electrode was moved to a position where a sharp EPSC with fixed latency was evoked. Stimulation intensity (200 μ s pulse; < 20 μ A) was adjusted just above the sharp threshold for activation of a synaptic response. Using such low minimal stimulations, no prominent polysynaptic activation was observed. Mf stimulation was assessed by its short term facilitation properties (40 ms paired pulse ratio or 1 Hz / 0.1 Hz ratio above 3) except for some P5 or P7 recordings where facilitation ratio could be less because of their immature state. In that case, the group II mGluR agonist

LCCG-1 (10 μ M) was applied to confirm that Mfs were stimulated (Lanore et al., 2010). LCCG-1 was also occasionally applied even when the facilitation ratio was above 3, and, in such case, it always inhibited EPSCs. Recordings were analyzed using IGOR pro (WaveMetrics, Inc.). Low-frequency facilitation was evoked by stimulating Mfs at frequencies of 0.1 and 1 Hz.

Generation of lentiviral vectors

The myristoylated-palmitoylated YFP-expressing lentiviral vector (mYFP) is based on the FUW plasmid (generously provided by C. Lois). FUW vector carries a CMV enhancer substituted 5' LTR for viral RNA expression, an ubiquitin promoter, a polylinker, the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WRE) followed by a self-inactivating 3' LTR (Lois et al., 2002).

The membrane-bound YFP is based on the plasmid MyrPalm-mYFP in pcDNA3, originally from R. Y. Tsien's lab and was a gift of Helge Ewers. It contains three amino acid substitution/insertions (19K, E209D, L240K) and two silent mutations compared to the published sequence. The BamHI-EcoRI-digested MyrPalm-mYFP fragment carrying the entire coding sequence was subcloned into the vector pGEM-7zf(+) (Promega France) at identical positions. The resulting clone was digested by BamHI and EcoRI, ligated into identical positions of the polylinker of FUW and transformed into Stbl3 chemically-competent *E. coli* bacteria (Invitrogen). Sequence integrity was verified by restriction enzyme cleavages and partial DNA sequencing.

Viral gene transfer and stereotaxic delivery

Mouse pups (P1-2) were anesthetized by isoflurane inhalation. Virus solution was injected with a brief pulse of air delivered by a picospritzer (Intracell) and approximately 100 nl of virus solution was distributed in the CA3 layer or in the dentate gyrus to label CA3 pyramidal cells and granule cells respectively. After surgery, animals recovered within minutes and were returned to their mother. The injection capillaries were pulled on a puller (Sutter) using micropipettes (5 μ l, ringcaps). The specific settings resulted in elongated tips which were trimmed to obtain a sharply edged tip with a diameter of around 30 μ m.

After *in vivo* protein expression for a minimum of 4 days, mice were deeply anesthetized using 0.7% chlorohydrate and perfused transcardially with 0.9% NaCl for 1 min followed by 4% formaldehyde in 0.1 mM phosphate buffer (PBS) for 10 min. Brains were removed, post-fixed in the same fixative for 4 h at 4°C and conserved at 4°C in PBS azide. Coronal sections of the

hippocampus (60 μ m) were cut on a vibratome (Leica VT1000S) and examined with confocal microscopy.

Confocal laser scanning fluorescence microscopy and image analysis

Confocal image stacks of PFA-fixed brain slices at P6, P9, P14 and P21 (60 μ m thick coronal sections of hippocampus) were acquired with a Leica TCS SP2 laser scanning microscope with 488 nm (YFP) excitation wavelength using 63X Leica oil objectives or a confocal spinning-disk (Leica DMI6000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a confocal Scanner Unit CSU-X1 (Yokogawa), an Evolve EMCCD camera (Roper Scientific, Evry, France), a galvanometric stage (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), using the objective HCX PL Apo CS 63X oil NA 1.4 and the 491nm diode laser. High resolution three-dimensional (3D) stacks were recorded and generated using Imaris 7.1.1 (Bitplane, Zurich, Switzerland). For 3D analysis, images were smoothened by the median filter. Images shown here are snapshots of reconstructions generated in 3D. Data sets containing information about volume and area of presynaptic terminals and thorny excrescences were exported to a Microsoft (Redmond, WA) Excel spreadsheet for further analysis.

Immunostaining of brain sections

Pups and young mice (P6/P9/P14/P21) were killed by cervical dislocation. Brains were quickly removed, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before sectioning. Fourteen μ m coronal sections of hippocampus were stained 96 h with mouse anti-SAP102 or anti-PSD-95 (both 1:500, Neuromab) and rabbit anti-Munc13-1 (1:500, Synaptic systems) on coated slides followed by overnight incubation with Alexa488-labelled anti-rabbit and Alexa568-labelled anti-mouse (both 1:1000, Invitrogen) antibodies. The mossy fiber termination zone (*stratum lucidum*) in the CA3b region of hippocampus was analyzed. A serie of images with an interval of 0.2 μ m in the z-axis was captured with a spinning disk microscope (Leica DMI6000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a confocale Scanner Unit CSU-X1 (Yokogawa), an Evolve EMCCD camera (Roper Scientific, Evry, France), a galvanometric stage (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), using the objective HCX PL Apo CS 100X oil NA 1.4 and the 491nm and 561nm diode laser. Camera aperture, magnification, light power, and exposure time were fixed for all images. Images were processed with Metamorph software (Molecular Devices). 10 stacks from 5 animals of each genotype and age minimum were acquired randomly. Colocalization of Munc13-1 and SAP102 or PSD-95 puncta analysis was performed using the “Colocalization”

module of Imaris 7.1.1 software (Bitplane, Zurich, Switzerland). The analysis of the number and the volume of puncta was performed using the “Surface” automatic module of Imaris software.

Statistical analysis

Unless otherwise mentioned, the values were expressed as mean $\pm$ s.e.m, and ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests and U-Mann-Whitney test were used where appropriate.

All drugs were obtained from Tocris Biosciences or Ascent Scientific.

Results

Functional maturation of mossy fiber synapses is delayed in $\text{GluK2}^{-/-}$ mice

We investigated the time course of maturation of Mf synaptic transmission at critical stages of postnatal development in wild-type FVB ($\text{GluK2}^{+/+}$) and $\text{GluK2}^{-/-}$ mice between P6 and P21. For this purpose, we recorded Mf excitatory postsynaptic currents (Mf-EPSCs) evoked with a minimal stimulation protocol in CA3 pyramidal cells in hippocampal slices, for which we have previously provided evidence that EPSCs from the activity of single Mf boutons are recorded (Fig. 1A). Consistent with previous observations (Marchal and Mulle, 2004), the average amplitude of Mf-EPSCs recorded at low stimulation rate (0.1 Hz) abruptly increased between P6 and P9 (Fig. 1B, C). The developmental increase in the amplitude of Mf-EPSCs was only apparent with a delay of 1-3 days in $\text{GluK2}^{-/-}$ mice suggesting an impairment in functional maturation in these mice (P8-9: $\text{GluK2}^{+/+}$: 29.3 ± 6.9 pA, $n = 11$ and $\text{GluK2}^{-/-}$: 9.0 ± 2.0 pA, $n = 11$, $p = 0.01$). A similar delay was observed for Mf-EPSCs with a stimulation frequency of 1 Hz (Supp. fig 1). As previously shown, the presence of Mf-EPSCs of large amplitude tightly coincided with the emergence of a postsynaptic kainate receptor component (Supp. fig 2) (Marchal and Mulle, 2004).

We next tried to understand which changes in synaptic parameters account for the developmental increase, and also for the delay in maturation of synaptic transmission in $\text{GluK2}^{-/-}$ mice. The increase in the strength of Mf synaptic transmission between P6 and P9 was accompanied with a decrease in the rate of failures (Fig. 1D) which by itself may explain the increase in Mf-EPSC amplitude during the course of maturation (Supp. fig 3). The increase of Mf-EPSC amplitude and the reduction in failure rate in control mice may both be attributed to an increase in release probability. However, the extent of Mf-EPSC facilitation observed when switching the rate of stimulation from 0.1 Hz to 1 Hz ("frequency facilitation") steadily increases during maturation in wild type and KO animals suggesting that release probability decreases (Fig. 1E). An increase in the number of release sites per Mf bouton could best explain the increase in synaptic transmission as shown by the increase in Mf-EPSC potency (average amplitude excluding failures) at 0.1 Hz and decrease failure rate. Alternatively, or in parallel, the density per PSD of postsynaptic AMPA receptors or their conductance may increase during maturation (Fig. 1F). The difference between the amplitude of Mf-EPSCs in control and $\text{GluK2}^{-/-}$, is also apparent when examining Mf-EPSC potency which was significantly lower in $\text{GluK2}^{-/-}$ mice at P8-9 (P8-9: $\text{GluK2}^{+/+}$: 57.4 ± 6.6 pA, $n = 11$ and $\text{GluK2}^{-/-}$: 36.3 ± 5.8 pA, $n = 11$, $p = 0.03$) (Fig1F). This suggests that the delay in the maturation of synaptic transmission could also be

associated with a decreased number of release sites or a decreased density or conductance of AMPA receptors in the postsynaptic compartment. The higher failure rate observed in GluK2^{-/-} mice (P8-9: GluK2^{+/+}: 47.5 ± 8.2 %, $n = 11$ and GluK2^{-/-}: 69.5 ± 3.6 %, $n = 11$, $p = 0.03$) can also be attributed to a lower number of release sites per Mf bouton. As previously shown, frequency facilitation is lower in GluK2^{-/-} mice as compared to GluK2^{+/+}, although this is only apparent at P14 (P14-16: GluK2^{+/+}: 8.1 ± 0.7 , $n = 16$ and GluK2^{-/-}: 5.9 ± 0.3 , $n = 12$, $p = 0.04$; P19-21: GluK2^{+/+}: 7.8 ± 0.7 , $n = 12$ and GluK2^{-/-}: 5.5 ± 0.5 , $n = 9$, $p = 0.04$) and it is likely caused by the absence of facilitatory presynaptic kainate receptors composed of GluK2 and GluK3 subunits (Contractor, 2001; Pinheiro et al., 2007; Sachidhanandam et al., 2009).

NMDA-EPSCs at Mf-synapses during maturation

To further characterize the postsynaptic component at hippocampal Mf-synapses, we analyzed the maturation of NMDA-EPSCs. We recorded in parallel AMPA-mediated Mf-EPSCs at -70 mV and NMDA-EPSCs at +30 mV in the presence of 10 μ M NBQX (Fig. 2A). Contrary to AMPA-EPSCs, the amplitude of NMDA-EPSCs at 0.1 Hz remained stable between P6 and P9, and increased in a second phase (Fig. 2B). The decay kinetics of NMDA-EPSCs became faster during the course of maturation (Supp fig 4). Synaptic NMDA receptors contained GluN2B subunits in young animals as demonstrated by the inhibition of Ro25-6981 at 1 μ M at P8-9 in GluK2^{+/+} mice (Supp fig 4). Whereas the amplitude of the NMDA component remained stable between P6 and P9, the NMDA/AMPA ratio sharply decreased in control mice (Fig. 2B). The decrease in NMDA/AMPA ratio in GluK2^{-/-} mice (P8-9: GluK2^{+/+}: 0.44 ± 0.04 , $n = 12$ and GluK2^{-/-}: 1.1 ± 0.2 , $n = 8$, $P = 0.01$) (Fig. 2C) only occurred at a later stage of postnatal development, in line with the delay in the maturation of AMPA-mediated synaptic transmission in these mice. This observation may suggest that the increase in Mf-EPSCs is rather due to the incorporation of AMPA receptors or to an increase in their conductance rather than to an increase in the number of release sites. However, alternatively, a compensatory expression of postsynaptic NMDA receptors may also explain this result.

The developmental increase of synaptic transmission precedes the enlargement of thorny excrescences

Electron microscopy studies in the rat have provided evidence that thorny excrescences, the postsynaptic structures of Mf-synapses, appear in CA3 pyramidal cells between P0 and P3 (Amaral and Dent, 1981). We investigated the maturation of these postsynaptic elements by confocal microscopy of YFP-expressing pyramidal cells, followed by 3D reconstruction. For this

purpose, we developed an *in vivo* lentivirus injection approach. We injected lentiviruses coding for a membrane-bound YFP (mYFP) in pups (P1-2) in the CA3 region of the hippocampus, (Fig. 3A). After at least 4 days of expression (Fig. 3A), brains of P6, P9, P14 and P21 mice were fixed. Z stacks of infected CA3b pyramidal cells were acquired by confocal microscopy (Fig 3C). Thorny excrescences located in the proximal dendrites were reconstructed in 3D (Fig. 3D). We calculated the volume of individual thorny excrescences and their number per cell. Both these parameters were unchanged between P6 and P9, but sharply increased after P9. Interestingly, this contrasts with the abrupt increase in the strength of synaptic transmission observed earlier during development, between P6 and P9. The same analysis performed in *GluK2*^{-/-} mice revealed that only 29% of the cells displayed thorny excrescences in *GluK2*^{-/-} mice as compared to 50% in *GluK2*^{+/+} mice at P9. Furthermore, the volume of thorny excrescences in *GluK2*^{-/-} at P14 was significantly smaller as compared to *GluK2*^{+/+} mice (P14: *GluK2*^{+/+}: $11.3 \pm 1.1 \mu\text{m}^3$, $n = 85$ and *GluK2*^{-/-}: $3.4 \pm 0.5 \mu\text{m}^3$, $n = 19$, $p < 0.001$) (Fig. 3E, F). These observations suggest a delay in the appearance of the postsynaptic elements of Mf-synapses.

We then tested whether these alterations in synaptic morphology were accompanied by a change in the number of postsynaptic densities in the *stratum lucidum* of the CA3b region. We performed immunohistochemical labeling of two postsynaptic markers, SAP102 and PSD-95 independently (Fig. 4A, B). SAP102 is expressed from P2 in rat hippocampus and PSD-95 around P9 (Sans et al., 2000). SAP102 is predominantly localized at the perisynaptic level whereas PSD-95 is found at the center of the PSD (Petrulia et al., 2010; Zhang and Diamond, 2009). The number of SAP102 puncta per volume unit (density) in the *stratum lucidum* decreased between P6 and P9 and sharply increased between P9 and P21 (Fig. 4A). This reduction between P6 and P9 suggests an elimination of the postsynaptic structures or a replacement by PSD-95. In parallel, the number of PSD-95 puncta steadily increased from P6 to P21 in *GluK2*^{+/+} mice (Fig. 4B). Between P9 and P21, the increase in the density of puncta for both markers is consistent with the addition of postsynaptic densities within individual Mf-synapses. At P21, we found that *GluK2*^{-/-} mice showed a reduction in the number of SAP102 and PSD-95 puncta as compared to *GluK2*^{+/+} mice (SAP102: P21: *GluK2*^{+/+}: 0.18 ± 0.01 , $n = 11$ and *GluK2*^{-/-}: 0.122 ± 0.005 , $n = 11$, $p = 0.0008$; PSD-95: P21: *GluK2*^{+/+}: 0.16 ± 0.01 , $n = 10$ and *GluK2*^{-/-}: 0.083 ± 0.006 , $n = 10$, $p = 0.0001$) as well as at P6 for SAP102 puncta (*GluK2*^{+/+}: 0.13 ± 0.01 , $n = 9$ and *GluK2*^{-/-}: 0.08 ± 0.01 , $n = 5$, $p = 0.01$), suggesting in a reduction of postsynaptic densities per thorny excrescence in the absence of GluK2. We also took advantage of the confocal stack acquisition to study the volume of SAP102 and PSD-95 puncta (Fig. 4A, B) which appeared rather stable during the course of maturation except for an increase at P9. Strikingly,

the volume of SAP102 puncta regularly increased from P6 to P21 in GluK2^{-/-} mice, whereas the volume of PSD-95 puncta were not affected (Fig. 4B).

The increase in synaptic transmission is associated with a complexification of the presynaptic terminals

Like thorny excrescences, presynaptic boutons of the Mf terminal develop after birth, with the first Mf contacts being visible with electron microscopy at P0-P3 (Amaral and Dent, 1981). After the establishment of synaptic contacts, presynaptic terminals grow and the number of release sites steadily increases until P21, and presynaptic vesicle pools reorganize until adulthood (Amaral and Dent, 1981; Rollenhagen et al., 2007). We used the lentiviral injection approach to label granule cells (Fig. 5A, B). We quantified the morphological properties of presynaptic terminals during the course of maturation. At P6, the presynaptic terminal structure is homogeneous and becomes more complex around P9 (Fig. 5B). Between P9 and P14, the appearance of filopodia on the presynaptic boutons causes a dramatic complexification of the structure. These filopodia are known to contact CA3 interneurons (Acsady et al., 1998). We analyzed the volume and the complexity of presynaptic terminals during postnatal development. In control mice, the volume of presynaptic boutons remained unchanged between P6 and P9, abruptly increased between P9 and P14 and remained stable later (Fig. 5C), in accordance with the maturation of thorny excrescences. The index of complexity, calculated by dividing the volume of the bouton by the area rapidly increased between P6 and P14 (Fig. 5D). In GluK2^{-/-}, the same developmental profile was found for both parameters although it was delayed: the volume of presynaptic elements as well as their complexity were significantly decreased at P9 (complexity: P9: GluK2^{+/+}: 0.24 ± 0.02 , $n = 11$ and GluK2^{-/-}: 0.047 ± 0.001 , $n = 9$, $p = 0.0002$; volume: P9: GluK2^{+/+}: $5.1 \pm 1 \mu\text{m}^3$, $n = 11$ and GluK2^{-/-}: $1.4 \pm 0.1 \mu\text{m}^3$, $n = 9$, $p = 0.0004$) (Fig. 5C) suggesting an impaired morphological maturation of the presynaptic compartment which parallels defects observed for the postsynaptic compartment.

We performed immunohistochemistry against Munc 13-1 to label active zones (Garner et al., 2000). Like for SAP102, the development of Munc 13-1 puncta in the *stratum lucidum* exhibited two phases, a decrease of density between P6 and P9 and an increase until P21 (Fig. 6A). Interestingly, the average volume of individual Munc 13-1 puncta followed the same developmental pattern as that of SAP102 puncta. In GluK2^{-/-} mice, the density of Munc 13-1 puncta was significantly reduced at P21 (P21: GluK2^{+/+}: 0.28 ± 0.02 , $n = 11$ and GluK2^{-/-}: 0.17 ± 0.01 , $n = 11$, $p = 0.0006$) (Fig. 6A). However, the average volume of individual Munc 13-1 puncta was smaller in GluK2^{-/-} at P9 (P9: GluK2^{+/+}: $0.47 \pm 0.03 \mu\text{m}^3$, $n = 14$ and GluK2^{-/-}: 0.29 ± 0.02

μm^3 , $n = 16$, $p = 0.0003$) and was larger at P14 and P21 compared to GluK2^{+/+} mice (P14: GluK2^{+/+}: $0.20 \pm 0.03 \mu\text{m}^3$, $n = 11$ and GluK2^{-/-}: $0.43 \pm 0.06 \mu\text{m}^3$, $n = 14$, $p = 0.001$; P21: GluK2^{+/+}: $0.24 \pm 0.02 \mu\text{m}^3$, $n = 11$ and GluK2^{-/-}: $0.59 \pm 0.04 \mu\text{m}^3$, $n = 11$, $p = 0.0001$) indicating a strong perturbation of active zone formation in GluK2^{-/-} mice (Fig. 6A).

Postsynaptic SAP102 and PSD-95 puncta or presynaptic Munc 13-1 puncta do not necessarily correspond to functional synapses with a pre- or postsynaptic element. Indeed, extrasynaptic clusters of SAP102 and PSD-95 have been described in neurons hippocampal culture (Petràlia et al., 2010). We therefore analyzed the percentage of colocalized voxels between Munc 13-1 and SAP102 and between Munc 13-1 and PSD-95 in the *stratum lucidum* (Fig. 6B) that may better reflect the density of functional synaptic sites. The percentage of Munc 13-1/SAP102 colocalized voxels was decreased in GluK2^{-/-} as compared to GluK2^{+/+} mice at P6, P9 and P14 (P6: GluK2^{+/+}: $0.7 \pm 0.1 \%$, $n = 9$ and GluK2^{-/-}: $0.36 \pm 0.05 \%$, $n = 8$, $p = 0.04$; P9: GluK2^{+/+}: $1.1 \pm 0.1 \%$, $n = 13$ and GluK2^{-/-}: $0.60 \pm 0.07 \%$, $n = 13$, $p = 0.001$; P14: GluK2^{+/+}: $2.2 \pm 0.2 \%$, $n = 11$ and GluK2^{-/-}: $1.4 \pm 0.2 \%$, $n = 13$, $p = 0.02$) (Fig. 6B). However, the colocalization between Munc 13-1 and PSD-95 was unchanged (Fig. 6B).

Discussion

In this report, we show that the development of hippocampal Mf-synapses is precisely timed during the first three weeks of postnatal development, with distinct critical periods of morphological and functional maturation. Interestingly, the critical period of abrupt changes in the properties of synaptic transmission and in the establishment of presynaptic short term facilitation (between P6 and P9) precedes the emergence of the characteristic Mf synaptic structure. The thorny excrescences at the postsynaptic site and the presynaptic boutons display increased volume and complexity roughly after P9. Furthermore, we show that the correct maturation of this synapse is altered both functionally and structurally in mice deficient for the kainate receptor subunit gene *GRIK2*, a gene associated with mental retardation in human. Our data thus point a complex and dynamic interplay between pre- and postsynaptic maturation at the functional and morphological level.

Altered functional maturation in *GluK2*^{-/-} mice

The hippocampal Mf-synapse is an attractive model for studying the maturation of synaptic contacts during development. This synapse develops after birth in mice and follows different steps of functional and morphological maturation (Amaral and Dent, 1981; Marchal and Mulle, 2004). During the first postnatal week, Mf-CA3 synapses release GABA and glutamate, and display very low release probability and high presynaptic fatigue (Gasparini et al., 2000; Safiulina et al., 2006). From P6 to P9, the amplitude of Mf-mediated AMPA-EPSCs markedly increases and this increase is correlated with the appearance of a postsynaptic kainate receptor component (Marchal and Mulle, 2004). This period is also characterized by changes in release probability with an increase in the extent of presynaptic short term facilitation as evidenced in paired pulse and frequency facilitation protocols (Lanore et al., 2010; Marchal and Mulle, 2004). Our present data in control FVB mice are in agreement with these previous studies performed with hybrid strains (C57Bl6/SV129). Furthermore, double-knockout mice for GluK1 and GluK2 subunits of kainate receptors displayed a decrease in Mf-EPSC amplitude throughout development. However, GluK2 comprises kainate receptors at the pre-and postsynaptic level at Mf-synapses, at least in mature (circa P21) mice (Mulle et al., 1998; Pinheiro et al., 2007; Ruiz et al., 2005; Sachidhanandam et al., 2009). Moreover, *GRIK2*, the gene coding for the GluK2 subunit, has been implicated in neurodevelopmental pathologies like autism spectrum disorders and learning disabilities in human (Dutta et al., 2007; Jamain et al., 2002; Kim et al., 2007; Motazacker et al., 2007). We investigated the role of this subunit in maturation of Mf-synapses and found a marked impairment of synaptic function during postnatal development, which is

clearly visible between P6 and P9. The loss of GluK2 subunit of kainate receptors impacts the timing of proper maturation of Mf-synapses, even though at the end of the second postnatal week, synaptic transmission at low frequency was not different between GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice. The same type of delayed maturation has been described in the barrel cortex of *fmrp1*^{-/-} mice (Harlow et al., 2010). The delay in functional maturation in GluK2^{-/-} mice fits with the time window for the appearance of a synaptic kainate receptor component. Our data therefore reinforce the importance of kainate receptors in Mf-synapses functional maturation (Marchal and Mulle, 2004). However, the mechanisms by which kainate receptors regulate the maturation of this synapse are not known. The physical presence of GluK2 subunits, independent of their activity may be sufficient for the proper maturation of the synapse, for instance by interaction with adhesion molecules such as N-cadherins (Coussen et al., 2002). Similarly to the role of NMDA receptors in the development of synaptic circuits (van Zundert et al., 2004), the influx of Ca²⁺ through unedited kainate receptors (Seeburg and Hartner, 2003) may play an important role for the refinement of synaptic transmission. Along these lines, the edition of GluK2-containing kainate receptors was shown to be developmentally regulated (Bernard et al., 1999). Previous studies have rather identified GluK1-containing kainate receptors which are present very early during development (Bahn et al., 1994) as important players in the maturation of hippocampal networks (Caiati et al., 2010; Juuri et al., 2010; Lauri, 2005; Lauri et al., 2006; Sallert et al., 2007; Sallert et al., 2009; Vesikansa et al., 2007). GluK1-containing receptors appear to impact the regulation of the activity of immature networks, for instance through attenuation of afterhyperpolarizing potassium currents by tonically active kainate receptors (Segerstrale et al., 2010). In contrast GluK2-containing receptors may be involved in the localized refinement of synaptic contacts.

In addition, we have characterized the postsynaptic NMDA receptor component at Mf-synapses. In the hippocampus, GluN2B and GluN2D subunits of NMDA receptors are expressed earlier than GluN2A and GluN2C (Monyer et al., 1994; Okabe et al., 1998; Ritter et al., 2002). However, the NMDA receptor composition has never been characterized at immature Mf-synapses. A single study found that the decay kinetics of NMDA-EPSCs were slower at P8 as compared to P32 (Khazipov et al., 1995). Our data confirmed the slow kinetics in younger mice and suggested that NMDA receptors contain GluN2B subunits during early postnatal development, and are characterized by an absence of GluN2B at later stages (Bettadapura et al, in preparation). The amplitude of NMDA-EPSCs did not follow the maturation pattern observed for AMPA-EPSCs, and strikingly remained stable at the critical P6-P9 period. The decay kinetics of NMDA-EPSCs however became faster between P6 and P9 indicating changes in the

composition of NMDA receptors during this critical period of maturation. The NMDA/AMPA ratio at hippocampal Mf-synapses which is low as compared to associative-commissural synapses (Kakegawa et al., 2004) at mature stages markedly decreased between P6 and P9. The relative developmental changes in AMPA and NMDA-EPSCs may suggest that the increase in Mf synaptic transmission is due to an insertion of AMPA receptors at pre-existing sites or to an increase in their conductance, a notion which would be in line with the existence of "silent" synaptic sites, which are un-silenced during maturation (Hanse et al., 2009). Ca^{2+} -permeable AMPA receptors display a higher conductance than Ca^{2+} -impermeable AMPA receptors (Swanson et al., 1997) and the insertion of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors at synapses coincides with increased EPSC amplitude in many paradigms (Clem et al., 2010; Clem and Barth, 2006; Goel et al., 2006; Liu et al., 2006; Terashima et al., 2004). AMPA receptors present at Mf-synapses were shown to be Ca^{2+} -permeable between P11 and P17 (Ho et al., 2007), but this has not been analyzed at earlier developmental stages. It is tempting to speculate that the newly inserted AMPA receptors during the critical period are Ca^{2+} -permeable and they are progressively replaced with Ca^{2+} -impermeable receptors after P14. Another hypothesis that could explain the increase in the AMPA but not NMDA component is the possibility of insertion of new release synaptic sites exempt of NMDA receptors. This hypothesis is consistent with the low NMDA/AMPA ratio (Kakegawa et al., 2004), and the finding that a significant proportion of individual Mf-synapses are devoid of NMDA receptors in organotypic slice cultures (Mori et al., 2004). Hence, maturation of Mf-CA3 synapses may either rely on the insertion of new AMPA receptors at preexisting sites, or in the addition of new sites at each Mf-synapse. It may also be possible that maturation proceeds in two overlapping steps, a step of functional maturation (insertion of AMPA receptors) followed by a step of structural modifications (addition of new synaptic sites). To explore these questions, we turned to quantitative analysis of the morphological features of Mf-synapses during postnatal development.

Morphological maturation

Hippocampal Mf-synapses display distinct structural features such as a large number of active zones and PSDs, large size and elaborate morphology (Rollenhagen et al., 2007). These specialized features appear during postnatal maturation within the first 3 weeks of life and are accompanied by marked changes in the properties of synaptic transmission (Amaral and Dent, 1981; Marchal and Mulle, 2004). We used *in vivo* lentivirus injection in new born mice for expression of a membrane fluorescent dye (YFP) in order to readdress the morphological maturation of Mf-synapses, in control mice and in the context of a mouse model of

neurodevelopmental disorder. We labeled pyramidal cells and mossy fibers terminals by injecting viruses either in the CA3 pyramidal layer or in the dentate gyrus, and used confocal microscopy on fixed hippocampal slices, followed by 3D reconstruction, for further morphometric analysis.

We observed major changes in the structural features of Mf-synapses within a short period of development, between P9 and P14. Up to P9, CA3 pyramidal cells were largely devoid of postsynaptic spines in the *stratum lucidum*. We cannot exclude that emergent structures were present because the resolution of confocal microscopy is limiting. The few spines observed at these stages were small. In contrast, at P14, CA3 pyramidal cells displayed large and complex thorny excrescences similar to those reported at mature stages (Qin et al., 2001; Rollenhagen et al., 2007). Presynaptic terminals increased in volume and became more complex starting at P6 and up to P14, preceding the appearance of thorny excrescences. Reorganization of the presynaptic pool of vesicles has been shown to occur after P28 (Rollenhagen et al., 2007), and protracted changes exist late into adulthood (Galimberti et al., 2010; Galimberti et al., 2006; Gogolla et al., 2009). Filopodial extensions, synapses arising from Mf presynaptic terminals and contacting CA3 interneurons (Acsady et al., 1998), extended between P9 and P14 suggesting that the feedforward inhibition of CA3 interneurons on CA3 cells (Mori et al., 2004) is absent during the first postnatal week.

We also used immunohistochemistry approaches to estimate the density of synaptic sites in the *stratum lucidum*. We used two different markers of PSDs that are differentially expressed during postnatal development (Sans et al., 2000): SAP102 and PSD-95, and Munc13-1. Munc13-1 is expressed from P0 in rodent brain (Augustin et al., 1999) and is localized in the cytomatrix of the active zone (Schoch and Gundelfinger, 2006). SAP102 and PSD-95 are MAGUKs proteins and are particularly enriched at PSDs (Hung and Sheng, 2002). In the hippocampus, SAP102 is present from P2 and its expression increases until P10 to reach a “plateau”. On the contrary, PSD-95 is not expressed at early stages but its level increases from P10 until adulthood (Sans et al., 2000). Importantly, the colocalization between SAP102 and Munc13-1 steadily increased, reflecting an increase of bona fide synaptic sites between P6 and P14, as indicated in early electron microscopy experiments (Amaral and Dent, 1981). The high level of puncta at early stages could be due to extrasynaptic clusters of SAP102 that are not yet associated with a presynaptic partner (Petrálie et al., 2010). Nor the number of PSD-95 puncta neither the level of colocalization of PSD-95 with Munc13-1 changed during maturation except for an increased number of puncta between P14 and P21. Hence, PSD-95 seemed not to be the best

postsynaptic marker of Mf PSDs during the first three weeks of postnatal maturation. The high density of Munc13-1 puncta at P6 could be due to the presence of presynaptic precursor vesicles (PTVs) (Zhai et al., 2001) because the majority of Munc13-1 puncta are not yet colocalized with a postsynaptic marker. When comparing control and GluK2^{-/-} mice, we found again a marked delay in the appearance of synaptic sites, as indicated by a decrease of colocalized SAP102/Munc13-1 puncta at key stages of postnatal development, consistent with a delay in functional maturation of synaptic transmission. In addition, the volume of SAP102 and Munc13-1 puncta increased during maturation to form larger puncta than in GluK2^{+/+} mice. It is unclear what the basis for this increased volume is, whether it is correlated with an increase in protein expression or it corresponds to the misorganization of synaptic sites in the mutant mice.

Structural and functional properties of synapses are intricately and reciprocally coupled. The morphology and synaptic properties of the mature hippocampal Mf-synapse fit well with its role as a detonator synapse (Bischofberger et al., 2006). At low frequency, a single Mf-synapse does not trigger sufficient depolarization to the CA3 pyramidal cell to spike (Sachidhanandam et al., 2009). However, when the rate of stimulation increases, the threshold for the activation of action potential is largely reached, and this is made possible by the coexistence in a same synapse of multiple release sites, with a high dynamic range. The complex architecture of Mf-synapses requires a precise coordination of maturation events at pre- and postsynaptic sites, which appears to be particularly sensitive to defective expression of key synaptic genes, like GluK2, in terms of proper synaptic maturation.

Acknowledgement

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Ministère de la Recherche of France, the Conseil Régional of Aquitaine, the European Commission (SYNSCAFF program, contract number LSH-2003-511995) and the Fondation pour la Recherche Médicale. We thank Audrey Lacquemant and Noëlle Grosjean for technical assistance and mouse breeding.

Figure legends

Figure 1: time course of functional synaptic maturation is delayed in GluK2^{-/-} mice.

A, schematic representation of the experimental design. Mf: mossy fiber B, summary graph of average Mf-EPSCs recorded at 0.1 Hz between P6 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. C, representative traces (30 superimposed traces in gray) recorded at 0.1 Hz in GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice at P8-9 (left) and P19-21 (right). The average Mf-EPSC is represented in black for GluK2^{+/+} and red for GluK2^{-/-}. D, summary graph of failures at 0.1 Hz between P6 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. E, summary graph of mean frequency facilitation ratio from 0.1 to 1 Hz for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. F, summary graph of average Mf-EPSC potency recorded at 0.1 Hz between P6 and P21 in GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. *p < 0.05

Figure 2: Mf-NMDA EPSCs during maturation.

A, average of 30 traces illustrating the NMDA/AMPA ratio at P8-9 and P19-21 for GluK2^{+/+} (black traces) and GluK2^{-/-} (red traces) mice. B, summary graph of the NMDA/AMPA ratio between P6 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. C, summary graph of Mf NMDA-EPSCs at 0.1 Hz between P6 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. * p < 0.05

Figure 3: morphological analysis of thorny excrescences on CA3 pyramidal cells during maturation.

A, schematic representation of the experimental procedures to infect CA3 pyramidal cells in pups. A micropipette is used to inject the lentivirus expressing mYFP. After minimum 4 days of expression, tissues were prepared for imaging (DG: dentate gyrus). B, projection of 3D-reconstructed confocal image stacks of a CA3 pyramidal cell labeled by lentivirus infection with mYFP at P21 in wild type mouse (scale bar: 50 μ m). SR: *stratum radiatum*, SL: *stratum lucidum*, SP: *stratum pyramidale*. C, example images of a z series acquisition of a thorny excrescence (scale bar: 5 μ m). D, examples of a thorny excrescence reconstructed with surface rendering (in white) with Imaris software (scale bar: 5 μ m). E, reconstructed volumes of thorny excrescences at P14 for GluK2^{+/+} (white) and GluK2^{-/-} mice (scale bar: 1.5 μ m). F, graph of thorny excrescence volume (μ m³) at P6, P9, P14 and P21 for GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice. *p < 0.001

Figure 4: increased postsynaptic markers in the *stratum lucidum* during maturation.

A, brain sections stained with antibody against the postsynaptic marker SAP102 (top left). Staining of *stratum lucidum* in CA3b is shown on snapshot of confocal stacks (top right) (scale bar: 2 μ m). Summary graph of number of SAP102 puncta per μ m³ (down left) and volume (μ m³) (down right) of these puncta at P6, P9, P14 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. *p < 0.05, ***p < 0.001 B, brain sections stained with antibody against the postsynaptic marker PSD-95 (top left). Staining of *stratum lucidum* in CA3b is shown on snapshot of confocal stacks (top right) (scale bar: 2 μ m). Summary graph of number of PSD-95 puncta per μ m³ (down left) and volume (μ m³) (down right) of these puncta at P6, P9, P14 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. SR: *stratum radiatum*, SL: *stratum lucidum*, SP: *stratum pyramidale*. ***p < 0.001

Figure 5: the presynaptic terminals of mossy fiber/CA3 synapses increase their complexity during the critical period of functional maturation.

A, schematic representation of the experimental procedures to infect dentate granule cells in pups. Like for CA3, a micropipette is used to inject the lentivirus expressing mYFP. Pictures of hippocampal granule cells infected (middle) and mossy fibers labeled with mYFP in the *stratum lucidum* (right, scale bar: 10 μ m). B, examples of presynaptic terminals reconstructed with surface rendering for GluK2^{+/+} (white) and GluK2^{-/-} (red) mice between P6 and P21 (top scale bar: 2 μ m and down scale bar: 5 μ m). C, summary graph of presynaptic terminal volume (μ m³) at P6, P9, P14 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. D, summary graph of presynaptic terminal complexity at P6, P9, P14 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. The index of complexity is calculated by dividing the volume by the area. ***p < 0.001

Figure 6: increased presynaptic markers in the *stratum lucidum* during maturation.

A, brain sections stained with antibody against the presynaptic marker Munc 13-1 (top left). Staining of *stratum lucidum* in CA3b is shown on snapshot of confocal stacks (top right) (scale bar: 2 μ m). Summary graph of number of Munc 13-1 puncta per μ m³ (down left) and volume (μ m³) (down right) of these puncta at P6, P9, P14 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. SR: *stratum radiatum*, SL: *stratum lucidum*, SP: *stratum pyramidale* **p < 0.01, ***p < 0.001 B, staining of *stratum lucidum* at P14 with Munc13-1, SAP102 and the merge images in CA3b is shown on snapshot of confocal stacks. Summary graph of colocalized voxels (%) between Munc 13-1/SAP102 and Munc 13-1/PSD-95 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. *p < 0.05, **p < 0.01

References

- Acsady, L., Kamondi, A., Sik, A., Freund, T., and Buzsaki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18, 3386-3403.
- Amaral, D.G., and Dent, J.A. (1981). Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195, 51-86.
- Augustin, I., Betz, A., Herrmann, C., Jo, T., and Brose, N. (1999). Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain. *Biochem J* 337 (Pt 3), 363-371.
- Bahn, S., Volk, B., and Wisden, W. (1994). Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J Neurosci* 14, 5525-5547.
- Bernard, A., Ferhat, L., Dessi, F., Charton, G., Represa, A., Ben-Ari, Y., and Khrestchatisky, M. (1999). Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence for independent developmental, pathological and cellular regulation. *Eur J Neurosci* 11, 604-616.
- Bischofberger, J., Engel, D., Frotscher, M., and Jonas, P. (2006). Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network. *Pflugers Arch* 453, 361-372.
- Boda, B., Dubos, A., and Muller, D. (2010). Signaling mechanisms regulating synapse formation and function in mental retardation. *Current opinion in neurobiology*, 1-9.
- Bourne, J.N., and Harris, K.M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31, 47-67.
- Caiati, M.D., Sivakumaran, S., and Cherubini, E. (2010). In the developing rat hippocampus, endogenous activation of presynaptic kainate receptors reduces GABA release from mossy fiber terminals. *J Neurosci* 30, 1750-1759.
- Clem, R.L., Anggono, V., and Huganir, R.L. (2010). PICK1 regulates incorporation of calcium-permeable AMPA receptors during cortical synaptic strengthening. *J Neurosci* 30, 6360-6366.
- Clem, R.L., and Barth, A. (2006). Pathway-specific trafficking of native AMPARs by in vivo experience. *Neuron* 49, 663-670.
- Contractor, A., Swanson, G., and Heinemann, S.F. (2001). Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 29, 209-216.
- Coussen, F., Normand, E., Marchal, C., Costet, P., Choquet, D., Lambert, M., Mège, R.M., and Mulle, C. (2002). Recruitment of the kainate receptor subunit glutamate receptor 6 by cadherin/catenin complexes. *J Neurosci* 22, 6426-6436.
- Durand, G.M., Kovalchuk, Y., and Konnerth, A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381, 71-75.
- Dutta, S., Das, S., Guhathakurta, S., Sen, B., Sinha, S., Chatterjee, A., Ghosh, S., Ahmed, S., Ghosh, S., and Usha, R. (2007). Glutamate Receptor 6 Gene (GluR6 or GRIK2) Polymorphisms in the Indian Population: A Genetic Association Study on Autism Spectrum Disorder. *Cell Mol Neurobiol* 27, 1035-1047.
- Feldmeyer, D., and Radnikow, G. (2009). Developmental alterations in the functional properties of excitatory neocortical synapses. *J Physiol* 587, 1889-1896.

Galimberti, I., Bednarek, E., Donato, F., and Caroni, P. (2010). EphA4 signaling in juveniles establishes topographic specificity of structural plasticity in the hippocampus. *Neuron* 65, 627-642.

Galimberti, I., Gogolla, N., Alberi, S., Santos, A., Muller, D., and Caroni, P. (2006). Long-Term Rearrangements of Hippocampal Mossy Fiber Terminal Connectivity in the Adult Regulated by Experience. *Neuron* 50, 749-763.

Garner, C.C., Kindler, S., and Gundelfinger, E.D. (2000). Molecular determinants of presynaptic active zones. *Current Opinion in Neurobiology* 10, 321-327.

Gasparini, S., Saviane, C., Voronin, L.L., and Cherubini, E. (2000). Silent synapses in the developing hippocampus: lack of functional AMPA receptors or low probability of glutamate release? *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9741-9746.

Goel, A., Jiang, B., Xu, L.W., Song, L., Kirkwood, A., and Lee, H.K. (2006). Cross-modal regulation of synaptic AMPA receptors in primary sensory cortices by visual experience. *Nat Neurosci* 9, 1001-1003.
Gogolla, N., Galimberti, I., Deguchi, Y., and Caroni, P. (2009). Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron* 62, 510-525.

Hanse, E., Taira, T., Lauri, S., and Groc, L. (2009). Glutamate synapse in developing brain: an integrative perspective beyond the silent state. *Trends Neurosci* 32, 532-537.

Harlow, E.G., Till, S.M., Russell, T.a., Wijetunge, L.S., Kind, P., and Contractor, A. (2010). Critical period plasticity is disrupted in the barrel cortex of FMR1 knockout mice. *Neuron* 65, 385-398.

Henze, D.A., Urban, N.N., and Barrionuevo, G. (2000). The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* 98, 407-427.

Ho, M.T., Pelkey, K.A., Topolnik, L., Petralia, R.S., Takamiya, K., Xia, J., Huganir, R., Lacaille, J.C., and McBain, C.J. (2007). Developmental expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptors underlies depolarization-induced long-term depression at mossy fiber CA3 pyramid synapses. *J Neurosci* 27, 11651-11662.

Humeau, Y., Gambino, F., Chelly, J., and Vitale, N. (2009). X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J Neurochem* 109, 1-14.

Hung, A.Y., and Sheng, M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 277, 5699-5702.

Jamain, S., Betancur, C., Quach, H., Philippe, A., Fellous, M., Giros, B., Gillberg, C., Leboyer, M., Bourgeron, T., and Study, P.A.R.I.S.P. (2002). Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol Psychiatry* 7, 302-310.

Juuri, J., Clarke, V.R., Lauri, S.E., and Taira, T. (2010). Kainate receptor induced ectopic spiking of CA3 pyramidal neurons initiates network bursts in neonatal hippocampus. *J Neurophysiol*.

Kakegawa, W., Tsuzuki, K., Yoshida, Y., Kameyama, K., and Ozawa, S. (2004). Input- and subunit-specific AMPA receptor trafficking underlying long-term potentiation at hippocampal CA3 synapses. *Eur J Neurosci* 20, 101-110.

Kesner, R.P. (2007). Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem* 14, 771-781.

- Khazipov, R., Ragozzino, D., and Bregestovski, P. (1995). Kinetics and Mg²⁺ block of N-methyl-D-aspartate receptor channels during postnatal development of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Neuroscience* 69, 1057-1065.
- Kim, S.A., Kim, J.H., Park, M., Cho, I.H., and Yoo, H.J. (2007). Family-based association study between GRIK2 polymorphisms and autism spectrum disorders in the Korean trios. *Neuroscience research* 58, 332-335.
- Lanore, F., Blanchet, C., Fejtova, A., Pinheiro, P., Richter, K., Balschun, D., Gundelfinger, E.D., and Mulle, C. (2010). Impaired development of hippocampal mossy fibre synapses in mouse mutants for the presynaptic scaffold protein Bassoon. *The Journal of physiology*.
- Lauri, S.E. (2005). Endogenous Activation of Kainate Receptors Regulates Glutamate Release and Network Activity in the Developing Hippocampus. *J Neurosci* 25, 4473-4484.
- Lauri, S.E., Vesikansa, A., Segerstrale, M., Collingridge, G.L., Isaac, J., and Taira, T. (2006). Functional Maturation of CA1 Synapses Involves Activity-Dependent Loss of Tonic Kainate Receptor-Mediated Inhibition of Glutamate Release. *Neuron* 50, 415-429.
- Liu, B., Liao, M., Mielke, J.G., Ning, K., Chen, Y., Li, L., El-Hayek, Y.H., Gomez, E., Zukin, R.S., Fehlings, M.G., and Wan, Q. (2006). Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J Neurosci* 26, 5309-5319.
- Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-872.
- Marchal, C., and Mulle, C. (2004). Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *The Journal of Physiology* 561, 27-37.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540.
- Mori-Kawakami, F., Kobayashi, K., and Takahashi, T. (2003). Developmental decrease in synaptic facilitation at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. *J Physiol* 553, 37-48.
- Mori, M., Abegg, M., Gähwiler, B., and Gerber, U. (2004). A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature* 431, 453-456.
- Motazacker, M.M., Rost, B.R., Hucho, T., Garshasbi, M., Kahrizi, K., Ullmann, R., Abedini, S.S., Nieh, S.E., Amini, S.H., Goswami, C., *et al.* (2007). A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 81, 792-798.
- Mulle, C., Sailer, A., Pérez-Otaño, I., Dickinson-Anson, H., Castillo, P.E., Bureau, I., Maron, C., Gage, F.H., Mann, J.R., Bettler, B., and Heinemann, S.F. (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 392, 601-605.
- Okabe, S., Collin, C., Auerbach, J.M., Meiri, N., Bengzon, J., Kennedy, M.B., Segal, M., and McKay, R.D. (1998). Hippocampal synaptic plasticity in mice overexpressing an embryonic subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18, 4177-4188.
- Petralia, R.S., Wang, Y.X., Hua, F., Yi, Z., Zhou, A., Ge, L., Stephenson, F.A., and Wenthold, R.J. (2010). Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* 167, 68-87.
- Pinheiro, P.S., and Mulle, C. (2006). Kainate receptors. *Cell and Tissue Research* 326, 457-482.

Pinheiro, P.S., Perrais, D., Coussen, F., Barhanin, J., Bettler, B., Mann, J.R., Malva, J.O., Heinemann, S., and Mulle, C. (2007). GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12181-12186.

Qin, L., Marrs, G.S., McKim, R., and Dailey, M.E. (2001). Hippocampal mossy fibers induce assembly and clustering of PSD95-containing postsynaptic densities independent of glutamate receptor activation. *J. Comp. Neurol.* 440, 284-298.

Ritter, L.M., Vazquez, D.M., and Meador-Woodruff, J.H. (2002). Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 139, 227-236.

Rollenhagen, A., Satzler, K., Rodriguez, E.P., Jonas, P., Frotscher, M., and Lubke, J.H. (2007). Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 27, 10434-10444.

Ruiz, A., Sachidhanandam, S., Utkiv, J.K., Coussen, F., and Mulle, C. (2005). Distinct subunits in heteromeric kainate receptors mediate ionotropic and metabotropic function at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 25, 11710-11718.

Sachidhanandam, S., Blanchet, C., Jeantet, Y., Cho, Y.H., and Mulle, C. (2009). Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 29, 5000-5008.

Safiulina, V.F., Fattorini, G., Conti, F., and Cherubini, E. (2006). GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. *J Neurosci* 26, 597-608.

Sallert, M., Malkki, H., Segerstrale, M., Taira, T., and Lauri, S.E. (2007). Effects of the kainate receptor agonist ATPA on glutamatergic synaptic transmission and plasticity during early postnatal development. *Neuropharmacology* 52, 1354-1365.

Sallert, M., Rantamaki, T., Vesikansa, A., Anthoni, H., Harju, K., Yli-Kauhaluoma, J., Taira, T., Castren, E., and Lauri, S.E. (2009). Brain-derived neurotrophic factor controls activity-dependent maturation of CA1 synapses by downregulating tonic activation of presynaptic kainate receptors. *J Neurosci* 29, 11294-11303.

Sans, N., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Blahos, J., Hell, J.W., and Wenthold, R.J. (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20, 1260-1271.

Schoch, S., and Gundelfinger, E.D. (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* 326, 379-391.

Seeburg, P.H., and Hartner, J. (2003). Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. *Curr Opin Neurobiol* 13, 279-283.

Segerstrale, M., Juuri, J., Lanore, F., Piepponen, P., Lauri, S.E., Mulle, C., and Taira, T. (2010). High firing rate of neonatal hippocampal interneurons is caused by attenuation of afterhyperpolarizing potassium currents by tonically active kainate receptors. *J Neurosci* 30, 6507-6514.

Swanson, G.T., Kamboj, S.K., and Cull-Candy, S.G. (1997). Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J Neurosci* 17, 58-69.

Terashima, A., Cotton, L., Dev, K.K., Meyer, G., Zaman, S., Duprat, F., Henley, J.M., Collingridge, G.L., and Isaac, J.T. (2004). Regulation of synaptic strength and AMPA receptor subunit composition by PICK1. *J Neurosci* 24, 5381-5390.

Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R., and Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402, 421-425.

Toro, R., Konyukh, M., Delorme, R., Leblond, C., Chaste, P., Fauchereau, F., Coleman, M., Leboyer, M., Gillberg, C., and Bourgeron, T. (2010). Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends Genet* 26, 363-372.

van Zundert, B., Zhao, J.P., and Constantine-Paton, M. (2004). Synaptic drive at developing synapses: Transient up-regulation of kainate receptors. *Dev Neurobiol*.

Vesikansa, A., Sallert, M., Taira, T., and Lauri, S.E. (2007). Activation of kainate receptors controls the number of functional glutamatergic synapses in the area CA1 of rat hippocampus. *The Journal of Physiology* 583, 145-157.

Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24, 1071-1089.

Zhai, R.G., Vardinon-Friedman, H., Cases-Langhoff, C., Becker, B., Gundelfinger, E.D., Ziv, N.E., and Garner, C.C. (2001). Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron* 29, 131-143.

Zhang, J., and Diamond, J.S. (2009). Subunit- and pathway-specific localization of NMDA receptors and scaffolding proteins at ganglion cell synapses in rat retina. *J Neurosci* 29, 4274-4286.

Figure 1

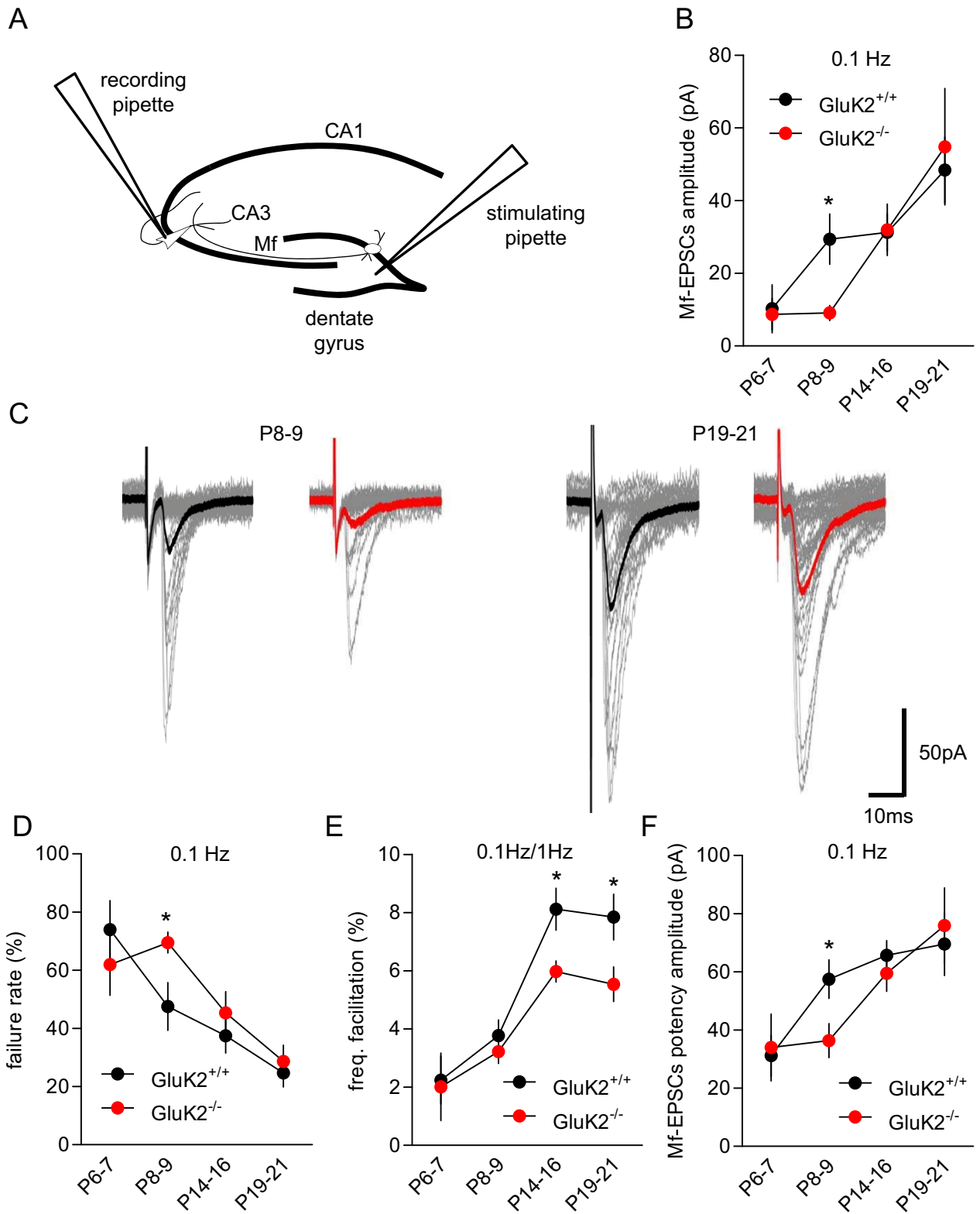


Figure 2

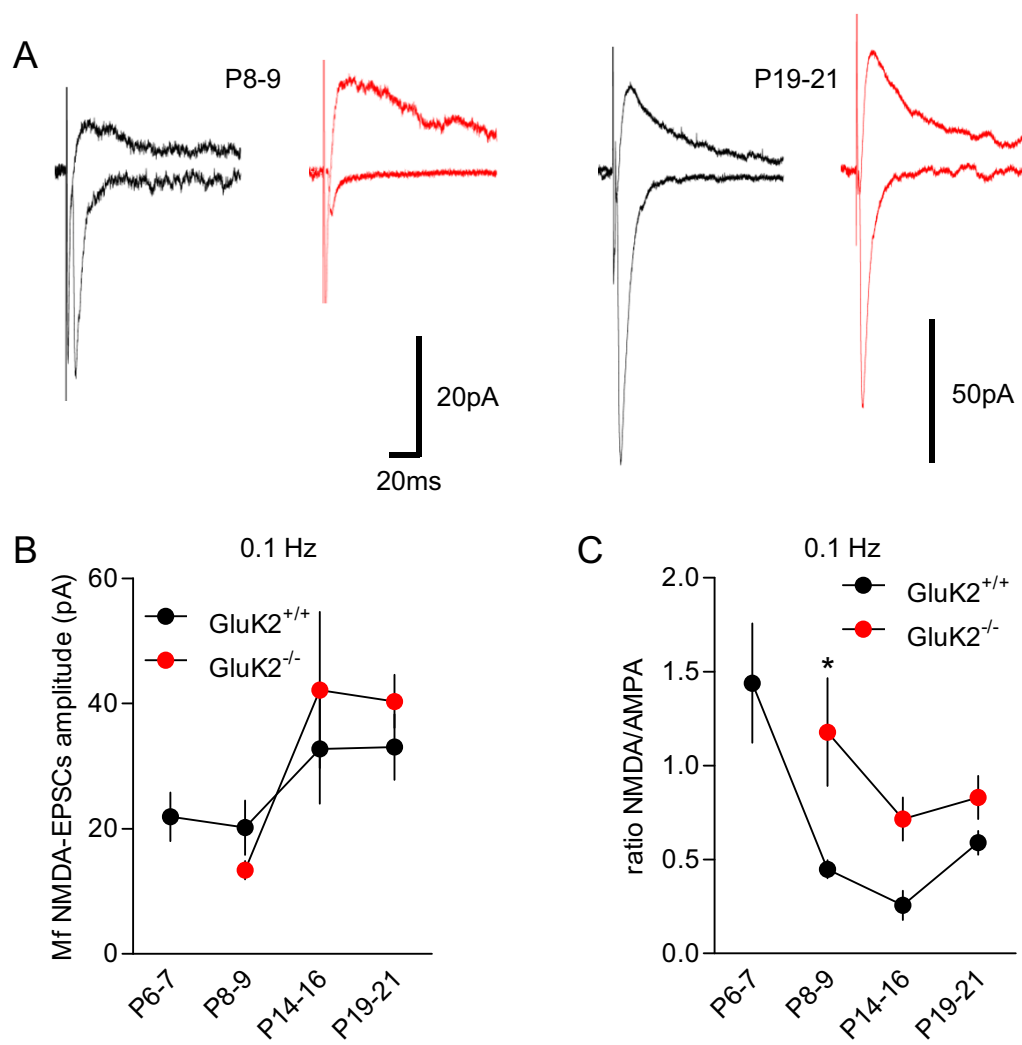


Figure 3

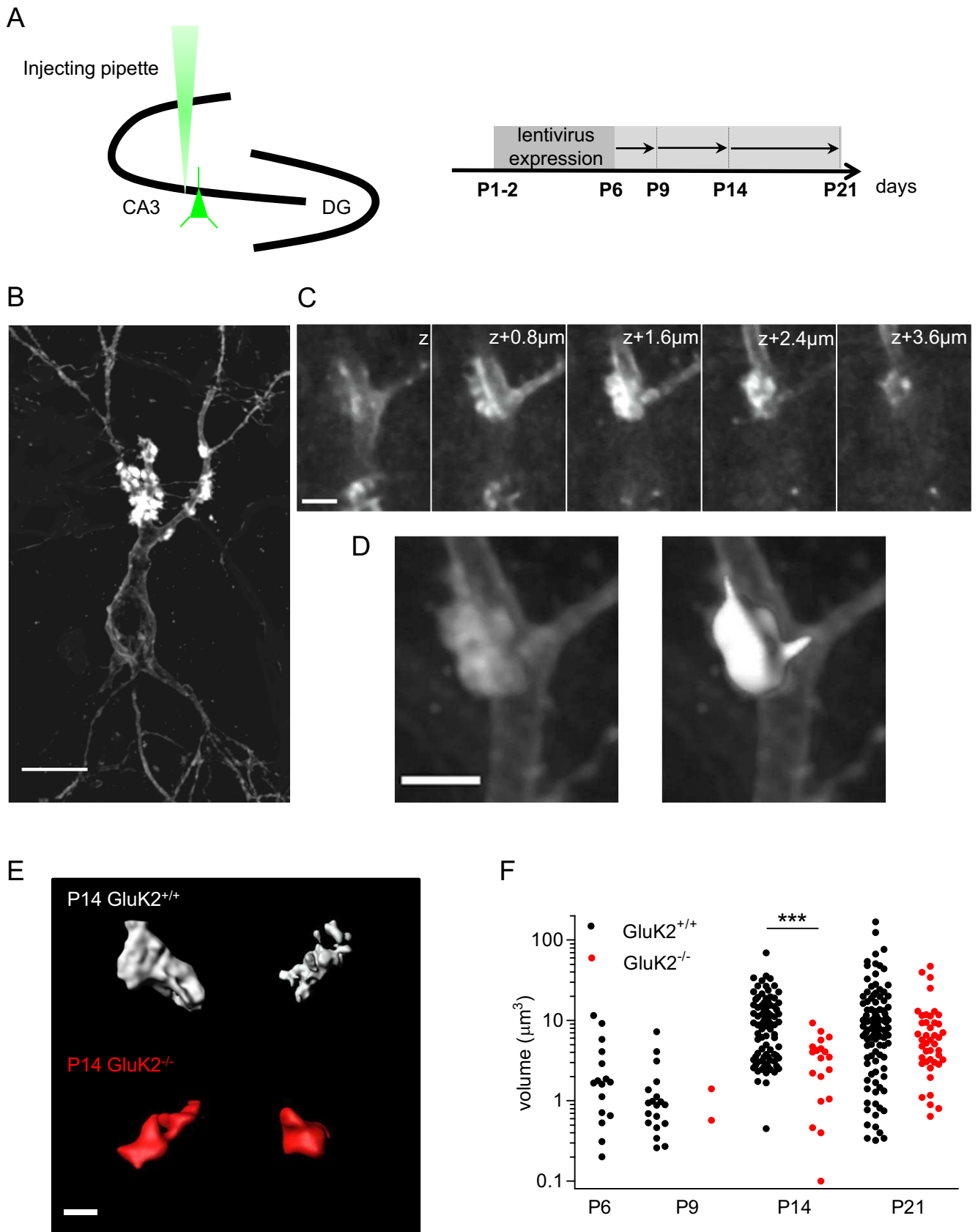
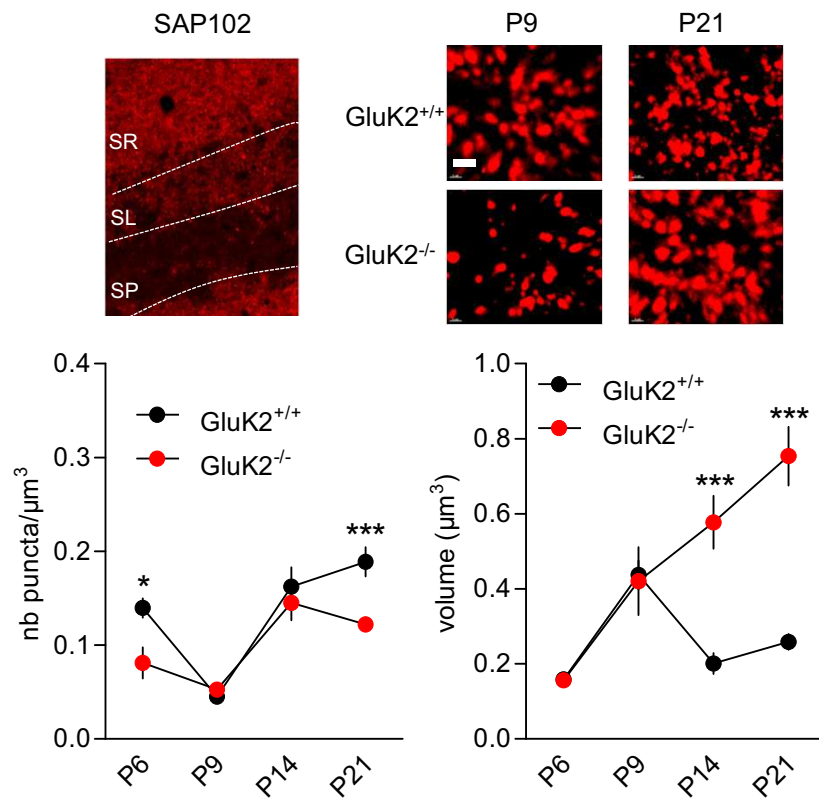


Figure 4

A



B

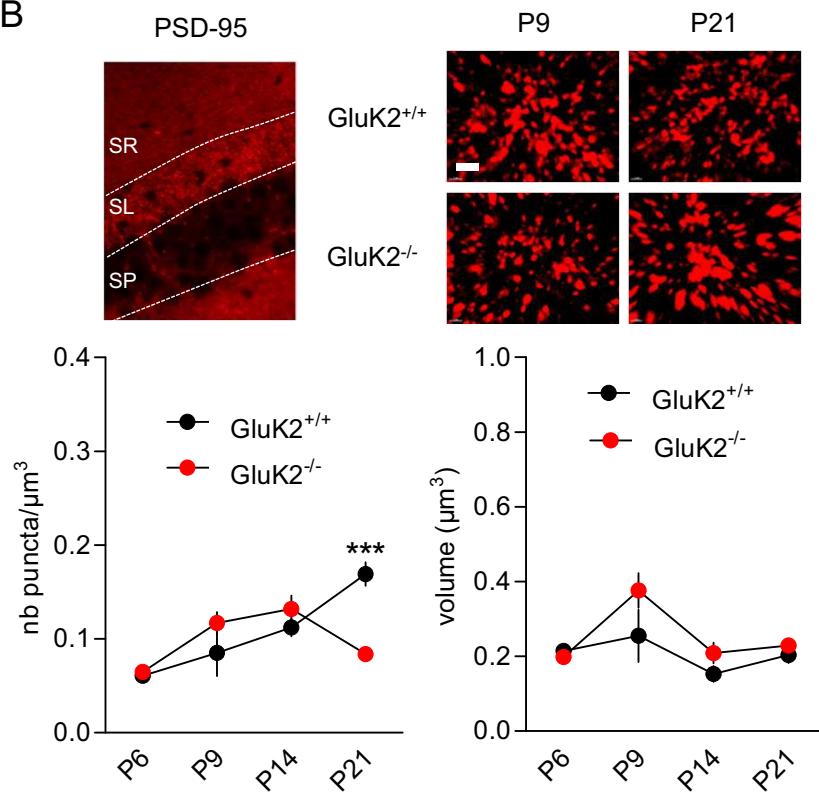


Figure 5

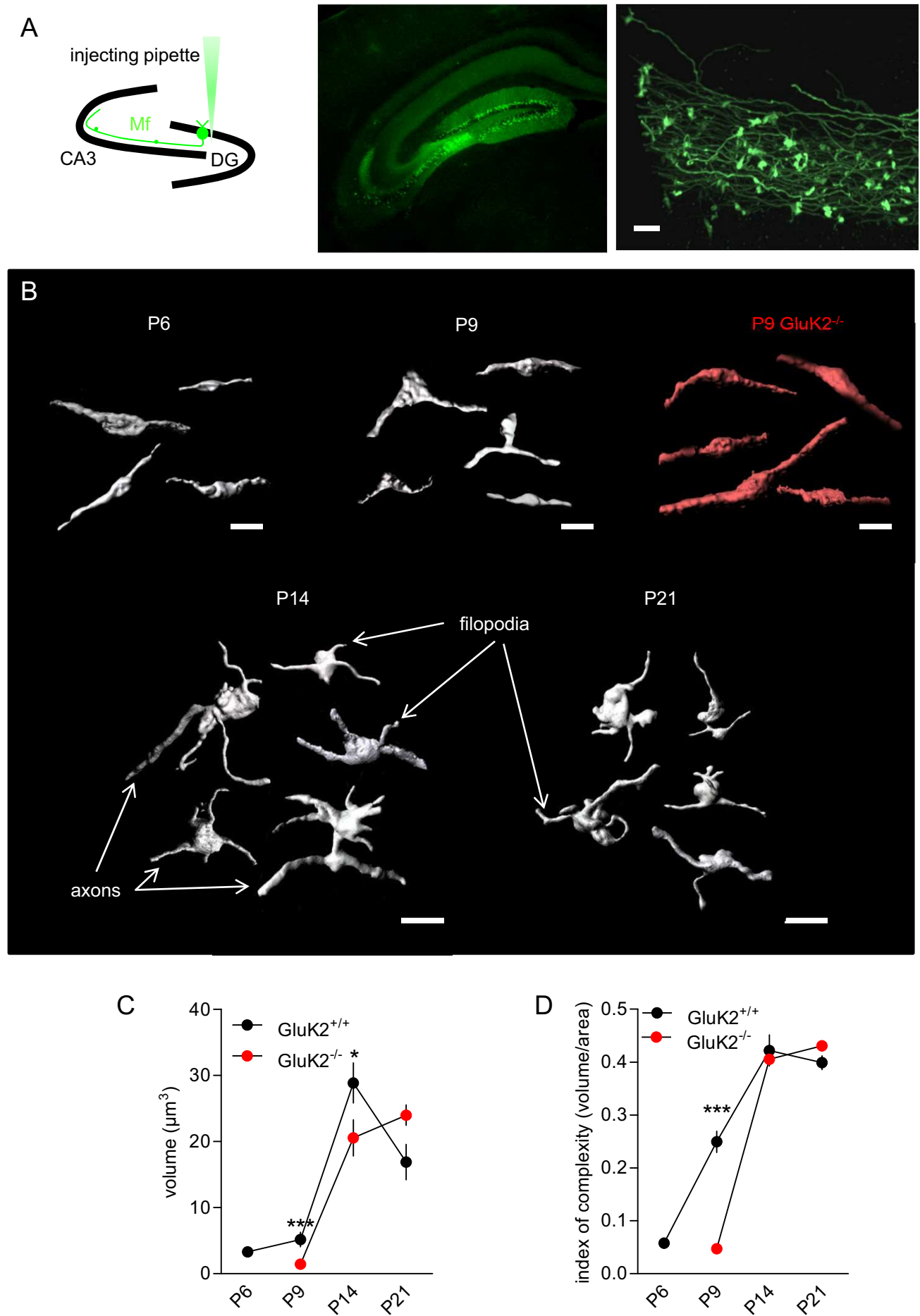
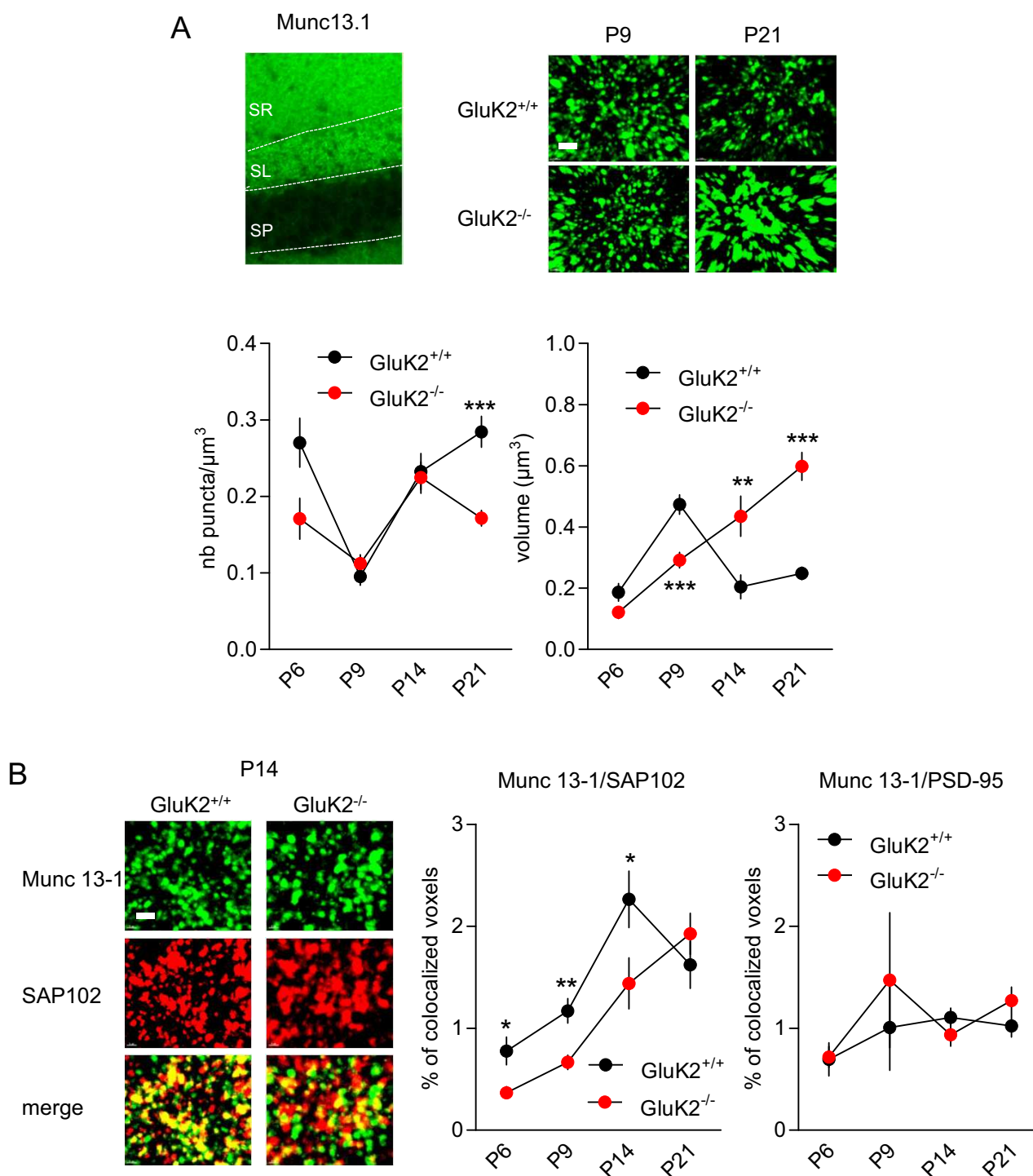
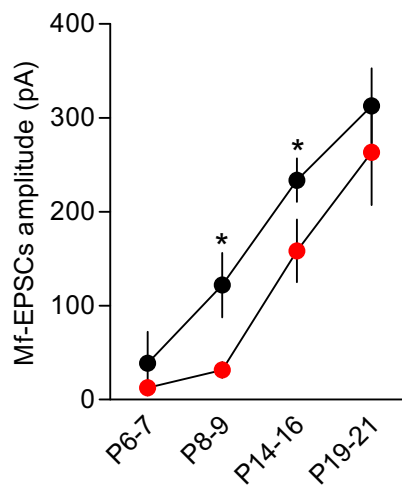


Figure 6



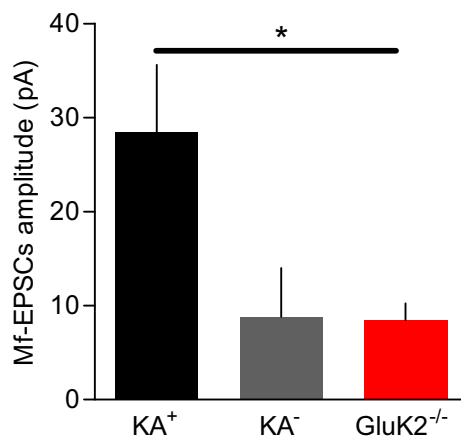
Supplementary figure 1



Supplementary figure 1: Mf-EPSC amplitude recorded at 1 Hz between P6 and P21 in GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice.

Summary graph of average Mf-EPSCs recorded at 1 Hz between P6 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice. (P6-7: GluK2^{+/+}: 38,8 ± 33,5 pA, n = 4 and GluK2^{-/-}: 12,5 ± 5,5 pA, n = 4, p > 0.05; P8-9: GluK2^{+/+}: 122 ± 34,4 pA, n = 11 and GluK2^{-/-}: 31,6 ± 2.0 pA, n = 11, p = 0.02; P14-16: GluK2^{+/+}: 233,7 ± 23,2 pA, n = 16 and GluK2^{-/-}: 158.5 ± 33,4 pA, n = 12, p = 0,02, P19-21: GluK2^{+/+}: 312,8 ± 32,8 pA, n = 12 and GluK2^{-/-}: 263,4 ± 36,3 pA, n = 9, p > 0.05). * p < 0.05

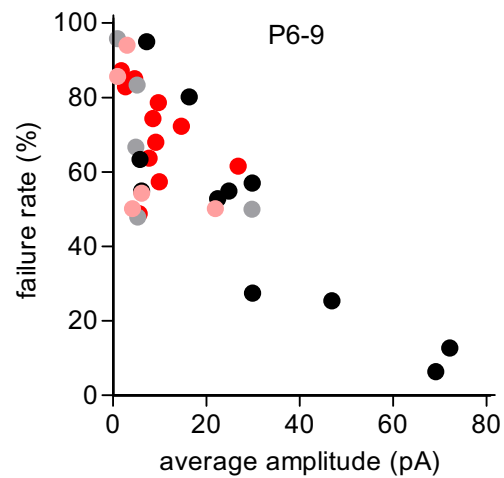
Supplementary figure 2



Supplementary figure 2: the presence of a postsynaptic kainate component is correlated with Mf-EPSCs of large amplitude.

Comparison of the average amplitude of Mf-EPSCs recorded at 0.1 Hz between P6 and P9 in GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice. KA⁺ (n = 11) display a postsynaptic kainate component at 1 Hz and KA⁻ (n = 5) are devoid of it (p = 0.05). These data were compared to Mf-EPSCs recorded at 0.1 Hz in GluK2^{-/-} mice (n = 16). * p < 0.05

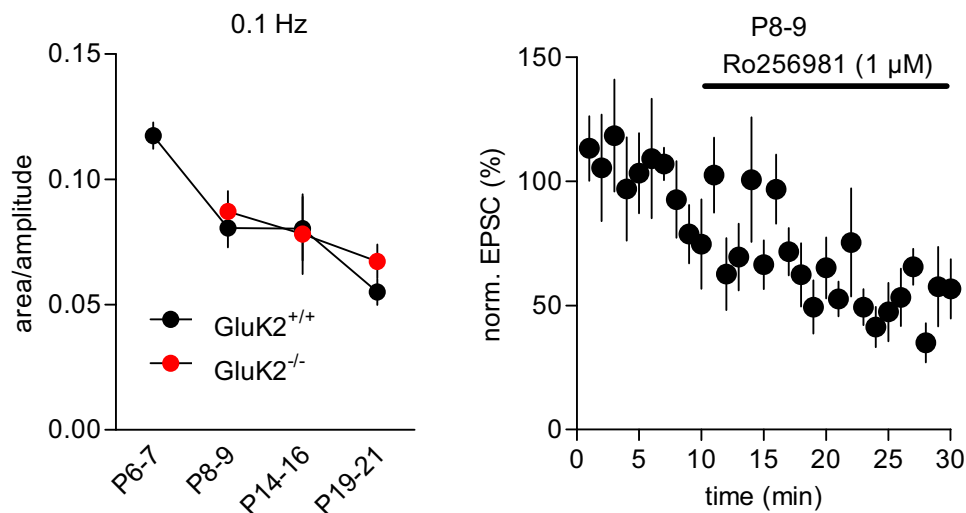
Supplemental figure 3



Supplementary figure 3: the increase in Mf-EPSCs between P6 and P9 is due to a decrease in failure rate

Plot of failure rate (%) as a function of average Mf-EPSC amplitude at 0.1 Hz for GluK2^{+/+} (P6-7: gray circles; P8-9: black circles) and GluK2^{-/-} (P6-7: pink circles; P8-9: red circles) mice.

Supplemental figure 4



Supplementary figure 4: Mf-NMDA-EPSCs are composed of GluN2B subunit at early stages of post-natal development

Summary graph (left) of area/amplitude of NMDA-EPSCs between P6 and P21 for GluK2^{+/+} (black circles) and GluK2^{-/-} (red circles) mice (P6-7: GluK2^{+/+}: 0.117 ± 0.005 s, $n = 11$; P8-9: GluK2^{+/+}: 0.080 ± 0.007 s, $n = 12$ and GluK2^{-/-}: 0.087 ± 0.008 s, $n = 9$, $p > 0.05$; P14-16: GluK2^{+/+}: 0.08 ± 0.01 s, $n = 2$ and GluK2^{-/-}: 0.07 ± 0.01 s, $n = 4$, $p > 0.05$, P19-21: GluK2^{+/+}: 0.055 ± 0.005 s, $n = 12$ and GluK2^{-/-}: 0.067 ± 0.006 s, $n = 17$, $p > 0.05$). Time course of Mf-EPSC inhibition (right) by Ro25-6981 (1 μM) at P8-9 for GluK2^{+/+} mice ($n = 9$).

C. Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous avons montré que la maturation de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 entre P6 et P21 présente des étapes bien définies d'un point de vue morphologique et fonctionnel. L'augmentation de la transmission synaptique entre P6 et P9 précède la complexification des éléments pré- et postsynaptique. De plus, nous avons montré que la perte de GluK2 entraînait un délai dans l'augmentation de l'amplitude la transmission synaptique mais également dans l'établissement de la structure synaptique.

Au niveau fonctionnel, nous avons confirmé que la présence de la composante kaïnate postsynaptique est corrélée à l'augmentation de la transmission synaptique à la fibre moussue (Marchal and Mulle, 2004). Nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de la transmission synaptique était due à une augmentation du nombre de sites de libération accompagnée d'une diminution de la probabilité de libération entre P6 et P9. Cependant, durant cette période, l'amplitude de la composante NMDA reste stable suggérant donc que l'augmentation de la transmission synaptique est causée par une augmentation du nombre de récepteurs AMPA postsynaptiques ou de leur conductance unitaire. Nous allons donc caractériser l'amplitude du quantum et également déterminer la conductance des récepteurs AMPA entre P6 et P9.

De plus, la cinétique de la composante NMDA change de façon importante durant cette période. Ces récepteurs sont composés de la sous-unité GluN2B et leur cinétique s'accélère au cours de la maturation. Il semblerait donc que l'apparition de la composante kaïnate postsynaptique coïncide avec une diminution de l'expression synaptique de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA. A un stade mature, il est intéressant de noter que la sous-unité GluN2B est totalement exclue du *stratum lucidum* contrairement à la sous-unité GluK2 (Watanabe et al., 1998). Quels sont les mécanismes moléculaires permettant la mise en place de ces deux sous-unités ? Existe-t-il un lien entre le recrutement synaptique des deux sous-unités ?

Nous avons mis en parallèle nos données électrophysiologiques et morphologiques et nous avons ainsi montré que l'augmentation de la transmission synaptique et de la plasticité à court terme précédait la complexification des compartiments pré- et postsynaptiques. De plus, la maturation de la présynapse précède celle de la postsynapse. Ces expériences ne permettent pas de corréler directement morphologie et fonction. Nous allons donc, grâce au marquage des cellules pyramidales de CA3 par infection lentivirale de mYFP et d'imagerie calcique postsynaptique (Reid et al., 2001; Ho et al., 2007),

enregistrer les paramètres fonctionnels (amplitude, plasticité à court terme) et réaliser une analyse morphologique d'une même synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3.

Nous avons également montré que la maturation morphologique et fonctionnelle de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 était retardée chez les souris déficientes pour la sous-unité GluK2 des récepteurs kaïnate. Ce délai de maturation est accompagné d'une réorganisation des densités postsynaptiques et des sites de libération que nous avons mis en évidence par immunomarquage. Cependant, l'imagerie confocale ne nous permet pas d'avoir une résolution suffisante pour pouvoir identifier de façon individuelle les PSD. Nous prévoyons donc d'observer ces synapses en microscopie électronique afin de déterminer l'organisation des PSD et des sites de libération au niveau ultrastructural.

Quels rôles jouent les récepteurs kaïnate contenant la sous-unité GluK2 à un stade précoce de développement post-natal ? De nombreuses études rapportent un rôle des récepteurs kaïnate contenant la sous-unité GluK1 dans la régulation de l'activité de réseau chez la souris nouveau-née (Lauri, 2005; Lauri et al., 2006; Sallert et al., 2007; Vesikansa et al., 2007; Sallert et al., 2009; Sivakumaran et al., 2009; Caiati et al., 2010b; Juuri et al., 2010; Segerstrale et al., 2010) mais pas de la sous-unité GluK2. Cette sous-unité est présente à la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3, au niveau pré- et postsynaptique, entre P14 et P21 (Contractor et al., 2001; Pinheiro et al., 2007; Sachidhanandam et al., 2009) et sa présence au niveau postsynaptique entre P6 et P9 est corrélée avec une augmentation de l'amplitude des EPSC AMPA (Marchal and Mulle, 2004). L'activation de cette sous-unité régule-t-elle l'activité nécessaire à la maturation de cette synapse ou sa présence physique est-elle suffisante ? De même, quels sont les récepteurs kaïnate nécessaires à la maturation de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 ? Les récepteurs présynaptiques, postsynaptiques ou les deux ? Pour répondre à cette question plusieurs approches peuvent être envisagées. Nous pourrions réexprimer, chez les souris $\text{GluK2}^{-/-}$, la sous-unité GluK2 spécifiquement dans les cellules pyramidales de CA3 ou dans les cellules granulaires du gyrus dentelé grâce aux infections lentivirales que nous avons mis en place chez le souriceau. Nous envisageons également d'étudier la maturation fonctionnelle chez les souris $\text{GluK3}^{-/-}$ car cette sous-unité est exprimée, dans l'hippocampe, uniquement au niveau des cellules granulaires et est responsable du rôle des récepteurs kaïnate au niveau présynaptique (Pinheiro et al., 2007). Il serait également intéressant d'étudier la maturation fonctionnelle et morphologique d'autres synapses n'exprimant pas la sous-unité GluK2 au niveau pré- et postsynaptique comme les synapses glutamatergiques des cellules pyramidales de CA3 recevant les afférences des fibres associatives/commissurales ou des cellules pyramidales de CA1.

Ainsi, nous pourrions déterminer si le rôle de GluK2 est spécifique de la fibre moussue ou plus généralement au niveau de la régulation de l'activité de réseau.

Quelles sont les conséquences au niveau cognitif de la perte de la sous-unité GluK2 ? Plusieurs études, chez l'homme, ont mis en évidence un lien entre retard mental et mutation dans le gène *GR/K2* codant pour cette sous-unité (Jamain et al., 2002; Dutta et al., 2007; Kim et al., 2007; Motazacker et al., 2007). Des tests comportementaux permettant la caractérisation de souris mutées pour des gènes associés aux retards mentaux ont été mis au point (Silverman et al., 2010) et il serait donc intéressant de déterminer le phénotype de ces souris.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la maturation synaptique et plus particulièrement à la mise en place de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 dans l'hippocampe. En associant des techniques d'électrophysiologie, d'immunohistochimie et d'imagerie confocale, nous avons pu décrire les différentes étapes de maturation de cette synapse. De plus, nous avons mis en évidence l'implication de la protéine présynaptique Bassoon et des récepteurs kainate contenant la sous-unité GluK2 dans ce processus.

Nous avons pu mettre en évidence d'importants changements fonctionnels entre P6 et P9, aussi bien au niveau pré- que postsynaptique. Nous avons également développé une technique nous permettant d'infecter des neurones hippocampiques chez le souriceau. Nous avons ainsi pu décrire la maturation morphologique de la synapse fibre moussue/cellule pyramidale de CA3 et montrer que la mise en place de la synapse semble succéder la maturation fonctionnelle. Cette étude met donc en avant la relation coordonnée et dynamique qui existe entre maturation pré- et postsynaptique au niveau fonctionnel et morphologique. Cette étude peut s'appliquer à d'autres étapes de synaptogenèse des fibres moussues notamment lors de la mise en place des fibres moussues récurrentes lors de crises d'épilepsie (Sutula et al., 1988) mais également au cours de la neurogenèse hippocampique chez l'adulte (Toni et al., 2008) ainsi qu'à d'autres modèles de retard mental.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamsson T, Gustafsson B, Hanse E (2007) Reversible synaptic depression in developing rat CA3 CA1 synapses explained by a novel cycle of AMPA silencing-unsilencing. *J Neurophysiol* 98:2604-2611.
- Abrahamsson T, Gustafsson B, Hanse E (2008) AMPA silencing is a prerequisite for developmental long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurophysiol* 100:2605-2614.
- Acsady L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsaki G (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18:3386-3403.
- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3:445-451.
- Ali AB (2003) Involvement of post-synaptic kainate receptors during synaptic transmission between unitary connections in rat neocortex. *Eur J Neurosci* 17:2344-2350.
- Alt A (2004) Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology* 46:793-806.
- Alt a, Weiss B, Ogden aM, Knauss JL, Oler J, Ho K, Large TH, Bleakman D (2004) Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology* 46:793-806.
- Altrock WD et al. (2003) Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon. *Neuron* 37:787-800.
- Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195:51-86.
- Angenstein F, Hilfert L, Zuschratter W, Altrock WD, Niessen HG, Gundelfinger ED (2008) Morphological and metabolic changes in the cortex of mice lacking the functional presynaptic active zone protein bassoon: a combined 1H-NMR spectroscopy and histochemical study. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991) 18:890-897.
- Angenstein F, Niessen HG, Goldschmidt J, Lison H, Altrock WD, Gundelfinger ED, Scheich H (2007) Manganese-enhanced MRI reveals structural and functional changes in the cortex of Bassoon mutant mice. *Cereb Cortex* 17:28-36.
- Armstrong JN, Saganich MJ, Xu NJ, Henkemeyer M, Heinemann SF, Contractor A (2006) B-eprhin reverse signaling is required for NMDA-independent long-term potentiation of mossy fibers in the hippocampus. *J Neurosci* 26:3474-3481.
- Arstikaitis P, Gauthier-Campbell C, Carolina Gutierrez Herrera R, Huang K, Levinson JN, Murphy TH, Kilimann MW, Sala C, Colicos MA, El-Husseini A (2008) Paralemmin-1, a modulator of filopodia induction is required for spine maturation. *Mol Biol Cell* 19:2026-2038.
- Ascher P, Nowak L (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol* 399:247-266.
- Augustin I, Rosenmund C, Sudhof TC, Brose N (1999) Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400:457-461.
- Bahn S, Volk B, Wisden W (1994) Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J Neurosci* 14:5525-5547.
- Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Tanriover G, Abrahams BS, Duvall JA, Robbins EM, Geschwind DH, Biederer T, Gunel M, Lifton RP, State MW (2008) Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 82:165-173.
- Bannister NJ, Benke TA, Mellor J, Scott H, Gurdal E, Crabtree JW, Isaac JT (2005) Developmental changes in AMPA and kainate receptor-mediated quantal transmission at thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci* 25:5259-5271.
- Barberis A, Sachidhanandam S, Mulle C (2008) GluR6/KA2 kainate receptors mediate slow-deactivating currents. *J Neurosci* 28:6402-6406.
- Barbon A, Vallini I, Barlati S (2001) Genomic organization of the human GRIK2 gene and evidence for multiple splicing variants. *Gene* 274:187-197.
- Barria A, Malinow R (2002) Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 35:345-353.
- Barros CS, Calabrese B, Chamero P, Roberts AJ, Korzus E, Lloyd K, Stowers L, Mayford M, Halpain S, Muller U (2009) Impaired maturation of dendritic spines without disorganization of cortical cell layers in mice lacking NRG1/ErbB signaling in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4507-4512.
- Barrow SL, Constable JR, Clark E, El-Sabeawy F, McAllister AK, Washbourne P (2009) Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev* 4:17.
- Barth AL, Malenka RC (2001) NMDAR EPSC kinetics do not regulate the critical period for LTP at thalamocortical synapses. *Nat Neurosci* 4:235-236.
- Battistin T, Cherubini E (1994) Developmental shift from long-term depression to long-term potentiation at the mossy fibre synapses in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 6:1750-1755.

- Becker N, Wierenga CJ, Fonseca R, Bonhoeffer T, Nagerl UV (2008) LTD induction causes morphological changes of presynaptic boutons and reduces their contacts with spines. *Neuron* 60:590-597.
- Bekirov IH, Nagy V, Svoronos A, Huntley GW, Benson DL (2008) Cadherin-8 and N-cadherin differentially regulate pre- and postsynaptic development of the hippocampal mossy fiber pathway. *Hippocampus* 18:349-363.
- Ben-Ari Y (1997) GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *Trends in Neurosciences* 20:523-529.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* 416:303-325.
- Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (1997) GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci* 20:523-529.
- Bennett JA, Dingledine R (1995) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14:373-384.
- Benson DL, Tanaka H (1998) N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6892-6904.
- Bernard A, Ferhat L, Dessi F, Charton G, Represa A, Ben-Ari Y, Khrestchatsky M (1999) Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence for independent developmental, pathological and cellular regulation. *Eur J Neurosci* 11:604-616.
- Bettler B, Mülle C (1995) Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34:123-139.
- Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M, Heinemann S (1990) Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron* 5:583-595.
- Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Sudhof TC (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297:1525-1531.
- Bleakman D, Lodge D (1998) Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 37:1187-1204.
- Boda B, Dubos A, Muller D (2010) Signaling mechanisms regulating synapse formation and function in mental retardation. *Curr Opin Neurobiol*.
- 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.
- Boeckers TM (2006) The postsynaptic density. *Cell Tissue Res* 326:409-422.
- Bolshakov VY, Siegelbaum SA (1995) Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science* 269:1730-1734.
- Bonfardin VD, Fossat P, Theodosis DT, Oliet SH (2010) Glia-dependent switch of kainate receptor presynaptic action. *J Neurosci* 30:985-995.
- Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* 417:649-653.
- Bortolotto ZA, Clarke VR, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, Ho KH, Miu P, Brinton BT, Fantaske R (1999a) Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* 402:297-301.
- Bortolotto ZA, Clarke VR, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, Ho KH, Miu P, Brinton BT, Fantaske R, Ogden A, Gates M, Ornstein PL, Lodge D, Bleakman D, Collingridge GL (1999b) Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* 402:297-301.
- Bourgeron T (2009) A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol* 19:231-234.
- Bourne JN, Harris KM (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47-67.
- Bouwman J, Maia AS, Camoletto PG, Posthuma G, Roubos EW, Oorschot VM, Klumperman J, Verhage M (2004) Quantification of synapse formation and maintenance in vivo in the absence of synaptic release. *Neuroscience* 126:115-126.
- Bowie D (2002) External anions and cations distinguish between AMPA and kainate receptor gating mechanisms. *J Physiol* 539:725-733.
- Bowie D, Mayer ML (1995) Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 15:453-462.
- 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.
- Brandstätter JH, Fletcher EL, Garner CC, Gundelfinger ED, Wässle H (1999) Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *Eur J Neurosci* 11:3683-3693.
- Bresler T, Ramati Y, Zamorano PL, Zhai R, Garner CC, Ziv NE (2001) The dynamics of SAP90/PSD-95 recruitment to new synaptic junctions. *Mol Cell Neurosci* 18:149-167.
- Bresler T, Shapira M, Boeckers T, Dresbach T, Futter M, Garner CC, Rosenblum K, Gundelfinger E, Ziv N (2004) Postsynaptic density assembly is fundamentally different from presynaptic active zone assembly. *J Neurosci* 24:1507-1520.
- Breustedt J, Schmitz D (2004) Assessing the role of GLUK5 and GLUK6 at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 24:10093-10098.
- Breustedt J, Vogt KE, Miller RJ, Nicoll RA, Schmitz D (2003) Alpha1E-containing Ca²⁺ channels are involved in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12450-12455.

- Buran BN, Strenzke N, Neef A, Gundelfinger ED, Moser T, Liberman MC (2010) Onset coding is degraded in auditory nerve fibers from mutant mice lacking synaptic ribbons. *J Neurosci* 30:7587-7597.
- Bureau I, Bischoff S, Heinemann SF, Mulle C (1999) Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *J Neurosci* 19:653-663.
- Bureau I, Dieudonne S, Coussen F, Mulle C (2000) Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6838-6843.
- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* 485 (Pt 2):403-418.
- Caiati MD, Sivakumaran S, Cherubini E (2010) In the developing rat hippocampus, endogenous activation of presynaptic kainate receptors reduces GABA release from mossy fiber terminals. *J Neurosci* 30:1750-1759.
- Canitano R (2007) Epilepsy in autism spectrum disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 16:61-66.
- Carmignoto G, Vicini S (1992) Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex. *Science* 258:1007-1011.
- Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Appeltauer U, Takei K, Kindler S, Veh RW, De Camilli P, Gundelfinger ED, Garner CC (1996) Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur J Cell Biol* 69:214-223.
- Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA (1997a) Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388:182-186.
- Castillo PE, Schoch S, Schmitz F, Sudhof TC, Malenka RC (2002) RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature* 415:327-330.
- Castillo PE, Janz R, Sudhof TC, Tzounopoulos T, Malenka RC, Nicoll RA (1997b) Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 388:590-593.
- Chadman KK, Gong S, Scattoni ML, Boltuck SE, Gandhi SU, Heintz N, Crawley JN (2008) Minimal aberrant behavioral phenotypes of neuroligin-3 R451C knockin mice. *Autism Res* 1:147-158.
- Chang S, De Camilli P (2001) Glutamate regulates actin-based motility in axonal filopodia. *Nat Neurosci* 4:787-793.
- Chattarji S, Stanton PK, Sejnowski TJ (1989) Commissural synapses, but not mossy fiber synapses, in hippocampal field CA3 exhibit associative long-term potentiation and depression. *Brain Res* 495:145-150.
- Chavis P, Westbrook G (2001) Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411:317-321.
- Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307:1324-1328.
- Chih B, Afridi SK, Clark L, Scheiffele P (2004) Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Hum Mol Genet* 13:1471-1477.
- Cho K, Francis JC, Hirbec H, Dev K, Brown MW, Henley JM, Bashir ZI (2003) Regulation of kainate receptors by protein kinase C and metabotropic glutamate receptors. *J Physiol* 548:723-730.
- Choquet D, Heine M, Thoumine O, Mondin M (2008) recruitment of functional AMPA receptors at neurexin / neuroligin contacts. *PNAS* 105:20947-20952.
- Christensen J (2004) A Mosaic of Functional Kainate Receptors in Hippocampal Interneurons. *J Neurosci* 24:8986-8993.
- Clarke VR, Ballyk BA, Hoo KH, Mandelzys A, Pellizzari A, Bath CP, Thomas J, Sharpe EF, Davies CH, Ornstein PL, Schoepp DD, Kamboj RK, Collingridge GL, Lodge D, Bleakman D (1997) A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature* 389:599-603.
- Clarke VRJ, Collingridge GL (2004) Characterisation of the effects of ATPA, a GLU(K5) kainate receptor agonist, on GABAergic synaptic transmission in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 47:363-372.
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M (2009) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56:2-5.
- Colonnese MT, Shi J, Constantine-Paton M (2003a) Chronic NMDA receptor blockade from birth delays the maturation of NMDA currents, but does not affect AMPA/kainate currents. *J Neurophysiol* 89:57-68.
- Colonnese MT, Shi J, Constantine-Paton M (2003b) Chronic NMDA receptor blockade from birth delays the maturation of NMDA currents, but does not affect AMPA/kainate currents. *Journal of neurophysiology* 89:57-68.
- 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.
- Contractor A, Rogers C, Maron C, Henkemeyer M, Swanson GT, Heinemann S (2002) Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science* 296:1864-1869.
- Contractor A, Sailer AW, Darstein M, Maron C, Xu J, Swanson GT, Heinemann S (2003) Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation of mossy-fiber synapses in KA2-/- mice. *J Neurosci* 23:422-429.
- Corson J, Nahmani M, Lubarsky K, Badr N, Wright C, Erisir A (2009) Sensory activity differentially modulates N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A and 2B in cortical layers. *Neuroscience* 163:920-932.
- Cossart R, Esclapez M, Hirsch JC, Bernard C, Ben-Ari Y (1998) GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 1:470-478.
- Cossart R, Epsztein J, Tyzio R, Becq H, Hirsch J, Ben-Ari Y, Crepel V (2002) Quantal release of glutamate generates pure kainate and mixed AMPA/kainate EPSCs in hippocampal neurons. *Neuron* 35:147-159.
- Coussen F, Normand E, Marchal C, Costet P, Choquet D, Lambert M, Mège RM, Mulle C (2002) Recruitment of the kainate receptor subunit glutamate receptor 6 by cadherin/catenin complexes. *J Neurosci* 22:6426-6436.

- Coussen F, Perrais D, Jaskolski F, Sachidhanandam S, Normand E, Bockaert J, Marin P, Mulle C (2005) Coassembly of Two GluR6 Kainate Receptor Splice Variants within a Functional Protein Complex. *Neuron* 47:555-566.
- Crair MC, Malenka RC (1995) A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375:325-328.
- Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A (1997) NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 8:323-335.
- Cremer H, Chazal G, Carleton A, Goridis C, Vincent JD, Lledo PM (1998) Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13242-13247.
- Crepel F, Delhay-Bouchaud N, Guastavino JM, Sampaio I (1980) Multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres in staggerer mutant mouse. *Nature* 283:483-484.
- Crépel V, Aronov D, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R (2007) A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron* 54:105-120.
- Cui C, Mayer ML (1999) Heteromeric kainate receptors formed by the coassembly of GluR5, GluR6, and GluR7. *J Neurosci* 19:8281-8291.
- Dailey ME, Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16:2983-2994.
- Dailey ME, Buchanan J, Bergles DE, Smith SJ (1994) Mossy fiber growth and synaptogenesis in rat hippocampal slices in vitro. *J Neurosci* 14:1060-1078.
- Dalva MB, McClelland AC, Kayser MS (2007) Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci* 8:206-220.
- Danzer SC, He X, Loepke AW, McNamara JO (2010) Structural plasticity of dentate granule cell mossy fibers during the development of limbic epilepsy. *Hippocampus* 20:113-124.
- Dargan SL, Clarke VR, Alushin GM, Sherwood JL, Nistico R, Bortolotto ZA, Ogden AM, Bleakman D, Doherty AJ, Lodge D, Mayer ML, Fitzjohn SM, Jane DE, Collingridge GL (2009) ACET is a highly potent and specific kainate receptor antagonist: characterisation and effects on hippocampal mossy fibre function. *Neuropharmacology* 56:121-130.
- De Paola V, Arber S, Caroni P (2003) AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks. *Nat Neurosci*:10.
- De Roo M, Klausner P, Muller D (2008a) LTP promotes a selective long-term stabilization and clustering of dendritic spines. *Plos Biol* 6:e219.
- De Roo M, Klausner P, Mendez P, Poglia L, Muller D (2008b) Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cereb Cortex* 18:151-161.
- Delaney AJ, Jahr CE (2002) Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron* 36:475-482.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.
- DeVries SH, Schwartz EA (1999) Kainate receptors mediate synaptic transmission between cones and 'Off' bipolar cells in a mammalian retina. *Nature* 397:157-160.
- Dick O, Hack I, Altmann WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2001) Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon. *J Comp Neurol* 439:224-234.
- Dick O, Tom Dieck S, Altmann WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger E, Brandstätter J (2003) The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 37:775-786.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dolman NP, Troop HM, More JC, Alt A, Knauss JL, Nistico R, Jack S, Morley RM, Bortolotto ZA, Roberts PJ, Bleakman D, Collingridge GL, Jane DE (2005) Synthesis and pharmacology of willardiine derivatives acting as antagonists of kainate receptors. *J Med Chem* 48:7867-7881.
- Domenici MR, Berretta N, Cherubini E (1998) Two distinct forms of long-term depression coexist at the mossy fiber-CA3 synapse in the hippocampus during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8310-8315.
- Dondzillo A, Satzler K, Horstmann H, Altmann WD, Gundelfinger ED, Kuner T (2010) Targeted three-dimensional immunohistochemistry reveals localization of presynaptic proteins Bassoon and Piccolo in the rat calyx of Held before and after the onset of hearing. *J Comp Neurol* 518:1008-1029.
- Dresbach T (2003) Functional regions of the presynaptic cytomatrix protein bassoon: significance for synaptic targeting and cytomatrix anchoring. *Molecular and Cellular Neuroscience* 23:279-291.
- Dresbach T, Qualmann B, Kessels MM, Garner CC, Gundelfinger ED (2001) The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol Life Sci* 58:94-116.
- Dresbach T, Torres V, Wittenmayer N, Altmann WD, Zamorano P, Zuschratter W, Nawrotzki R, Ziv NE, Garner CC, Gundelfinger ED (2006) Assembly of active zone precursor vesicles: obligatory trafficking of presynaptic cytomatrix proteins Bassoon and Piccolo via a trans-Golgi compartment. *J Biol Chem* 281:6038-6047.
- Durand CM et al. (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 39:25-27.
- Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A (1996) Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381:71-75.

- Dutta S, Das S, Guhathakurta S, Sen B, Sinha S, Chatterjee A, Ghosh S, Ahmed S, Ghosh S, Usha R (2007) Glutamate Receptor 6 Gene (GluR6 or GRIK2) Polymorphisms in the Indian Population: A Genetic Association Study on Autism Spectrum Disorder. *Cell Mol Neurobiol* 27:1035-1047.
- Eder M, Becker K, Rammes G, Schierloh A, Azad SC, Zieglgansberger W, Dodt HU (2003) Distribution and properties of functional postsynaptic kainate receptors on neocortical layer V pyramidal neurons. *J Neurosci* 23:6660-6670.
- Egebjerg J, Bettler B, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann S (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* 351:745-748.
- Ehrlich I, Klein M, Rumpel S, Malinow R (2007) PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4176-4181.
- Elmariah SB, Crumling MA, Parsons TD, Balice-Gordon RJ (2004) Postsynaptic TrkB-mediated signaling modulates excitatory and inhibitory neurotransmitter receptor clustering at hippocampal synapses. *J Neurosci* 24:2380-2393.
- Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399:66-70.
- Epszstein J, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Crepel V (2005) Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *J Neurosci* 25:8229-8239.
- Epszstein J, Sola E, Represa A, Ben-Ari Y, Crepel V (2010) A selective interplay between aberrant EPSPKA and INaP reduces spike timing precision in dentate granule cells of epileptic rats. *Cereb Cortex* 20:898-911.
- Erisir A, Harris JL (2003) Decline of the critical period of visual plasticity is concurrent with the reduction of NR2B subunit of the synaptic NMDA receptor in layer 4. *J Neurosci* 23:5208-5218.
- Ethell IM, Yamaguchi Y (1999) Cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 induces the maturation of dendritic spines in rat hippocampal neurons. *J Cell Biol* 144:575-586.
- Everts I, Villmann C, Hollmann M (1997) N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol* 52:861-873.
- Fay AM, Bowie D (2006) Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. *J Physiol* 572:201-213.
- Fazzari P, Paternain AV, Valiente M, Pla R, Lujan R, Lloyd K, Lerma J, Marin O, Rico B (2010) Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature* 464:1376-1380.
- Fejtova A, Davydova D, Bischof F, Lazarevic V, Altmann WD, Romorini S, Schöne C, Zuschratter W, Kreutz MR, Garner CC, Ziv NE, Gundelfinger ED (2009) Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of Bassoon. *The Journal of Cell Biology* 185:341-355.
- Feldmeyer D, Radnikow G (2009) Developmental alterations in the functional properties of excitatory neocortical synapses. *J Physiol* 587:1889-1896.
- Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempf U, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC (2000) Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* 25:203-214.
- Fernandes HB, Catches JS, Petralia RS, Copits BA, Xu J, Russell TA, Swanson GT, Contractor A (2009) High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron* 63:818-829.
- Fernandez-Alfonso T, Ryan TA (2008) A heterogeneous "resting" pool of synaptic vesicles that is dynamically interchanged across boutons in mammalian CNS synapses. *Brain Cell Biol* 36:87-100.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18:8900-8911.
- Fisahn A, Heinemann S, McBain CJ (2005) The kainate receptor subunit GluR6 mediates metabotropic regulation of the slow and medium AHP currents in mouse hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* 562:199-203.
- Flavell SW, Cowan CW, Kim TK, Greer PL, Lin Y, Paradis S, Griffith EC, Hu LS, Chen C, Greenberg ME (2006) Activity-dependent regulation of MEF2 transcription factors suppresses excitatory synapse number. *Science* 311:1008-1012.
- Flint AC, Maisch US, Weishaupt JH, Kriegstein AR, Monyer H (1997) NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J Neurosci* 17:2469-2476.
- Frerking M (1998) Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nat Neurosci* 1:479-486.
- Frerking M, Ohliger-Frerking P (2002) AMPA receptors and kainate receptors encode different features of afferent activity. *J Neurosci* 22:7434-7443.
- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* 27:57-69.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D (1998) Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 390:194-210.
- Fukushima T, Shingai R, Ogurusu T, Ichinose M (2003) Inhibition of willardiine-induced currents through rat GluR6/KA-2 kainate receptor channels by Zinc and other divalent cations. *Neurosci Lett* 349:107-110.
- Galimberti I, Bednarek E, Donato F, Caroni P (2010) EphA4 signaling in juveniles establishes topographic specificity of structural plasticity in the hippocampus. *Neuron* 65:627-642.
- Galimberti I, Gogolla N, Alberi S, Santos A, Muller D, Caroni P (2006) Long-Term Rearrangements of Hippocampal Mossy Fiber Terminal Connectivity in the Adult Regulated by Experience. *Neuron* 50:749-763.
- Gallyas F, Jr., Ball SM, Molnar E (2003) Assembly and cell surface expression of KA-2 subunit-containing kainate receptors. *J Neurochem* 86:1414-1427.

- Garcia EP, Mehta S, Blair LA, Wells DG, Shang J, Fukushima T, Fallon JR, Garner CC, Marshall J (1998) SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron* 21:727-739.
- Garner CC, Kindler S, Gundelfinger ED (2000) Molecular determinants of presynaptic active zones. *Current Opinion in Neurobiology* 10:321-327.
- Garner CC, Zhai RG, Gundelfinger E, Ziv N (2002) Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends in Neurosciences* 25:243-251.
- Gasparini S, Saviane C, Voronin LL, Cherubini E (2000) Silent synapses in the developing hippocampus: lack of functional AMPA receptors or low probability of glutamate release? *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9741-9746.
- Gerrow K, Romorini S, Nabi SM, Colicos MA, Sala C, El-Husseini A (2006) A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron* 49:547-562.
- Ghiglieri V, Picconi B, Sgobio C, Bagetta V, Barone I, Paillé V, Di Filippo M, Polli F, Gardoni F, Altrock WD, Gundelfinger E, De Sarro G, Bernardi G, Ammassari-Teule M, Di Luca M, Calabresi P (2009) Epilepsy-induced abnormal striatal plasticity in Bassoon mutant mice. *Eur J Neurosci* 29:1979-1993.
- Gibson JR, Bartley AF, Hays SA, Huber KM (2008) Imbalance of neocortical excitation and inhibition and altered UP states reflect network hyperexcitability in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol* 100:2615-2626.
- Goda Y, Davis GW (2003) Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 40:243-264.
- Gogolla N, Galimberti I, Deguchi Y, Caroni P (2009) Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron* 62:510-525.
- Goldin M, Epsztein J, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Crepel V, Cossart R (2007) Synaptic kainate receptors tune oriens-lacunosum moleculare interneurons to operate at theta frequency. *J Neurosci* 27:9560-9572.
- Gomes RA, Hampton C, El-Sabeawy F, Sabo SL, McAllister AK (2006) The dynamic distribution of TrkB receptors before, during, and after synapse formation between cortical neurons. *J Neurosci* 26:11487-11500.
- Gonzales RB, DeLeon Galvan CJ, Rangel YM, Claiborne BJ (2001) Distribution of thorny excrescences on CA3 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 430:357-368.
- Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119:1013-1026.
- Gregor P, O'Hara BF, Yang X, Uhl GR (1993) Expression and novel subunit isoforms of glutamate receptor genes GluR5 and GluR6. *Neuroreport* 4:1343-1346.
- Groc L, Gustafsson B, Hanse E (2006) AMPA signalling in nascent glutamatergic synapses: there and not there! *Trends in Neurosciences* 29:132-139.
- Groc L, Choquet D, Stephenson F, Verrier D, Manzoni O, Chavis P (2007) NMDA Receptor Surface Trafficking and Synaptic Subunit Composition Are Developmentally Regulated by the Extracellular Matrix Protein Reelin. *J Neurosci* 27:10165-10175.
- Gundelfinger A, Breustedt J, Sullivan D, Schmitz D (2010) Natural spike trains trigger short- and long-lasting dynamics at hippocampal mossy fiber synapses in rodents. *PLoS One* 5:e9961.
- Hall AC, Lucas FR, Salinas PC (2000) Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100:525-535.
- Hall B, Ripley B, Ghosh A (2007) NR2B Signaling Regulates the Development of Synaptic AMPA Receptor Current. *J Neurosci* 27:13446-13456.
- Hashimoto K, Kano M (2003) Functional differentiation of multiple climbing fiber inputs during synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 38:785-796.
- Hayashi ML, Choi SY, Rao BS, Jung HY, Lee HK, Zhang D, Chattarji S, Kirkwood A, Tonegawa S (2004) Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron* 42:773-787.
- Hayes DM, Braud S, Hurtado DE, McCallum J, Standley S, Isaac JT, Roche KW (2003) Trafficking and surface expression of the glutamate receptor subunit, KA2. *Biochem Biophys Res Commun* 310:8-13.
- Heine M, Thoumine O, Mondin M, Tessier B, Giannone G, Choquet D (2008) Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroligin contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20947-20952.
- Henkemeyer M, Itkis OS, Ngo M, Hickmott PW, Ethell IM (2003) Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol* 163:1313-1326.
- Henze DA, Urban NN, Barrionuevo G (2000) The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* 98:407-427.
- Henze DA, Wittner L, Buzsaki G (2002) Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat Neurosci* 5:790-795.
- Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH (1992) The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* 8:775-785.
- Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2:880-888.
- Heuss C, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U (1999) G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 2:1070-1077.

- Hida Y, Ohtsuka T (2010) CAST and ELKS Proteins: Structural and Functional Determinants of the Presynaptic Active Zone. *J Biochem*.
- Hirbec H, Francis JC, Lauri SE, Braithwaite SP, Coussen F, Mulle C, Dev KK, Coutinho V, Meyer G, Isaac JT, Collingridge GL, Henley J, Couthino V (2003) Rapid and differential regulation of AMPA and kainate receptors at hippocampal mossy fibre synapses by PICK1 and GRIP. *Neuron* 37:625-638.
- Ho MT, Ho TM, Pelkey KA, Pelletier JG, Huganir RL, Lacaille J-C, McBain CJ (2009) Burst firing induces postsynaptic LTD at developing mossy fibre-CA3 pyramid synapses. *The Journal of physiology* 587:4441-4454.
- Ho MT, Pelkey KA, Topolnik L, Petralia RS, Takamiya K, Xia J, Huganir R, Lacaille JC, McBain CJ (2007) Developmental expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptors underlies depolarization-induced long-term depression at mossy fiber CA3 pyramid synapses. *J Neurosci* 27:11651-11662.
- Hoffmann H, Gremme T, Hatt H, Gottmann K (2000) Synaptic activity-dependent developmental regulation of NMDA receptor subunit expression in cultured neocortical neurons. *J Neurochem* 75:1590-1599.
- Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott GW, Welker E, Svoboda K (2006) Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* 441:979-983.
- Honda T, Sakisaka T, Yamada T, Kumazawa N, Hoshino T, Kajita M, Kayahara T, Ishizaki H, Tanaka-Okamoto M, Mizoguchi A, Manabe T, Miyoshi J, Takai Y (2006) Involvement of nectins in the formation of puncta adherentia junctions and the mossy fiber trajectory in the mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 31:315-325.
- Howe JR (1996) Homomeric and heteromeric ion channels formed from the kainate-type subunits GluR6 and KA2 have very small, but different, unitary conductances. *J Neurophysiol* 76:510-519.
- Hu H, Qin Y, Bochorishvili G, Zhu Y, van Aelst L, Zhu JJ (2008) Ras signaling mechanisms underlying impaired GluR1-dependent plasticity associated with fragile X syndrome. *J Neurosci* 28:7847-7862.
- Huang CC, Chen YL, Liang YC, Hsu KS (2002) Role for cAMP and protein phosphatase in the presynaptic expression of mouse hippocampal mossy fibre depotentiation. *J Physiol* 543:767-778.
- Huang YH, Dykes-Hoberg M, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE (2004) Climbing fiber activation of EAAT4 transporters and kainate receptors in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 24:103-111.
- Huettnner JE, Stack E, Wilding TJ (1998) Antagonism of neuronal kainate receptors by lanthanum and gadolinium. *Neuropharmacology* 37:1239-1247.
- Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253:1028-1031.
- Humeau Y, Gambino F, Chelly J, Vitale N (2009) X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J Neurochem* 109:1-14.
- Hung AY, Futai K, Sala C, Valtschanoff JG, Ryu J, Woodworth MA, Kidd FL, Sung CC, Miyakawa T, Bear MF, Weinberg RJ, Sheng M (2008) Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *J Neurosci* 28:1697-1708.
- Ibi D, Nitta A, Ishige K, Cen X, Ohtakara T, Nabeshima T, Ito Y (2010) Piccolo knockdown-induced impairments of spatial learning and long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neurochemistry International* 56:77-83.
- Isaac JT, Crair MC, Nicoll RA, Malenka RC (1997) Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron* 18:269-280.
- Jamain S, Betancur C, Quach H, Philippe A, Fellous M, Giros B, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T, Study PARISP (2002) Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol Psychiatry* 7:302-310.
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34:27-29.
- Jamain S, Radyushkin K, Hammerschmidt K, Granon S, Boretius S, Varoqueaux F, Ramanantsoa N, Gallego J, Ronnenberg A, Winter D, Frahm J, Fischer J, Bourgeron T, Ehrenreich H, Brose N (2008) Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:1710-1715.
- Jaskolski F, Coussen F, Mulle C (2005) Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 26:20-26.
- Jaskolski F, Coussen F, Nagarajan N, Normand E, Rosenmund C, Mulle C (2004) Subunit composition and alternative splicing regulate membrane delivery of kainate receptors. *J Neurosci* 24:2506-2515.
- Jiang L, Xu J, Nedergaard M, Kang J (2001) A kainate receptor increases the efficacy of GABAergic synapses. *Neuron* 30:503-513.
- Jonas P, Major G, Sakmann B (1993) Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *The Journal of Physiology* 472:615-663.
- Jourdain P, Fukunaga K, Muller D (2003) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to activity-dependent filopodia growth and spine formation. *J Neurosci* 23:10645-10649.
- Jung MW, McNaughton BL (1993) Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus* 3:165-182.
- Juuri J, Clarke VR, Lauri SE, Taira T (2010) Kainate receptor induced ectopic spiking of CA3 pyramidal neurons initiates network bursts in neonatal hippocampus. *J Neurophysiol*.

- Takegawa W, Tsuzuki K, Yoshida Y, Kameyama K, Ozawa S (2004) Input- and subunit-specific AMPA receptor trafficking underlying long-term potentiation at hippocampal CA3 synapses. *Eur J Neurosci* 20:101-110.
- Takegawa W, Yamada N, Iino M, Kameyama K, Umeda T, Tsuzuki K, Ozawa S (2002) Postsynaptic expression of a new calcium pathway in hippocampal CA3 neurons and its influence on mossy fiber long-term potentiation. *J Neurosci* 22:4312-4320.
- Kalla S, Stern M, Basu J, Varoqueaux F, Reim K, Rosenmund C, Ziv NE, Brose N (2006) Molecular dynamics of a presynaptic active zone protein studied in Munc13-1-enhanced yellow fluorescent protein knock-in mutant mice. *J Neurosci* 26:13054-13066.
- Kamiya H, Shinozaki H, Yamamoto C (1996) Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *J Physiol* 493 (Pt 2):447-455.
- Kamiya H, Ozawa S, Manabe T (2002) Kainate receptor-dependent short-term plasticity of presynaptic Ca²⁺ influx at the hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 22:9237-9243.
- Kapur A, Yeckel M, Johnston D (2001) Hippocampal mossy fiber activity evokes Ca²⁺ release in CA3 pyramidal neurons via a metabotropic glutamate receptor pathway. *Neuroscience* 107:59-69.
- Kapur A, Yeckel MF, Gray R, Johnston D (1998) L-Type calcium channels are required for one form of hippocampal mossy fiber LTP. *J Neurophysiol* 79:2181-2190.
- Kasyanov AM, Safiulina VF, Voronin LL, Cherubini E (2004) GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3967-3972.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-1138.
- Kayser MS, Nolt MJ, Dalva MB (2008) EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron* 59:56-69.
- Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290:750-754.
- Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp JA (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J Neurosci* 18:1935-1943.
- Khazipov R, Ragozzino D, Bregestovski P (1995) Kinetics and Mg²⁺ block of N-methyl-D-aspartate receptor channels during postnatal development of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Neuroscience* 69:1057-1065.
- Khazipov R, Leinekugel X, Khalilov I, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1997) Synchronization of GABAergic interneuronal network in CA3 subfield of neonatal rat hippocampal slices. *The Journal of Physiology* 498 (Pt 3):763-772.
- Khelfaoui M, Denis C, van Galen E, de Bock F, Schmitt A, Houbon C, Morice E, Giros B, Ramakers G, Fagni L, Chelly J, Nosten-Bertrand M, Billuart P (2007) Loss of X-linked mental retardation gene oligophrenin1 in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *J Neurosci* 27:9439-9450.
- Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom Dieck S, Egner A, Gundelfinger ED, Moser T (2005) Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434:889-894.
- Kidd FL, Isaac JT (1999) Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. *Nature* 400:569-573.
- Kidd FL, Isaac JT (2001) Kinetics and activation of postsynaptic kainate receptors at thalamocortical synapses: role of glutamate clearance. *Journal of Neurophysiology* 86:1139-1148.
- Kidd FL, Coumis U, Collingridge GL, Crabtree JW, Isaac JT (2002) A presynaptic kainate receptor is involved in regulating the dynamic properties of thalamocortical synapses during development. *Neuron* 34:635-646.
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771-781.
- Kim HG et al. (2008) Disruption of neuroligin 1 associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82:199-207.
- Kim S, Burette A, Chung HS, Kwon SK, Woo J, Lee HW, Kim K, Kim H, Weinberg RJ, Kim E (2006) NGL family PSD-95-interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation. *Nat Neurosci* 9:1294-1301.
- Kim SA, Kim JH, Park M, Cho IH, Yoo HJ (2007) Family-based association study between GRIK2 polymorphisms and autism spectrum disorders in the Korean trios. *Neuroscience research* 58:332-335.
- Kirson ED, Yaari Y (1996) Synaptic NMDA receptors in developing mouse hippocampal neurones: functional properties and sensitivity to ifenprodil. *J Physiol* 497 (Pt 2):437-455.
- Kleckner NW, Dingledine R (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241:835-837.
- Ko J, Kim S, Chung HS, Kim K, Han K, Kim H, Jun H, Kaang BK, Kim E (2006) SALM synaptic cell adhesion-like molecules regulate the differentiation of excitatory synapses. *Neuron* 50:233-245.
- Kobayashi K, Manabe T, Takahashi T (1996) Presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Science* 273:648-650.
- Kobayashi K, Manabe T, Takahashi T (1999) Calcium-dependent mechanisms involved in presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fibre-CA3 synapse. *Eur J Neurosci* 11:1633-1638.
- Kohler M, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1993) Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron* 10:491-500.
- Krueger SR, Kolar A, Fitzsimonds RM (2003) The presynaptic release apparatus is functional in the absence of dendritic contact and highly mobile within isolated axons. *Neuron* 40:945-957.

- Krylova O, Herreros J, Cleverley KE, Ehler E, Henriquez JP, Hughes SM, Salinas PC (2002) WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. *Neuron* 35:1043-1056.
- Kukley M, Schwan M, Fredholm BB, Dietrich D (2005) The role of extracellular adenosine in regulating mossy fiber synaptic plasticity. *J Neurosci* 25:2832-2837.
- Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY (2005) Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25:11288-11299.
- Kutsuwada T, Sakimura K, Manabe T, Takayama C, Katakura N, Kushiya E, Natsume R, Watanabe M, Inoue Y, Yagi T, Aizawa S, Arakawa M, Takahashi T, Nakamura Y, Mori H, Mishina M (1996) Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron* 16:333-344.
- Kwon HB, Castillo PE (2008a) Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 57:108-120.
- Kwon HB, Castillo PE (2008b) Role of glutamate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 60:1082-1094.
- Laezza F, Wilding TJ, Sequeira S, Coussen F, Zhang XZ, Hill-Robinson R, Mulle C, Huettnner JE, Craig A (2007) KRIP6: a novel BTB/kelch protein regulating function of kainate receptors. *Mol Cell Neurosci* 34:539-550.
- Landis DM, Hall AK, Weinstein LA, Reese TS (1988) The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse. *Neuron* 1:201-209.
- Langnaese K, Seidenbecher C, Wex H, Seidel B, Hartung K, Appeltauer U, Garner A, Voss B, Mueller B, Garner CC, Gundelfinger ED (1996) Protein components of a rat brain synaptic junctional protein preparation. *Brain Res Mol Brain Res* 42:118-122.
- Lauri SE (2005) Endogenous Activation of Kainate Receptors Regulates Glutamate Release and Network Activity in the Developing Hippocampus. *J Neurosci* 25:4473-4484.
- Lauri SE, Vesikansa A, Segerstrale M, Collingridge GL, Isaac J, Taira T (2006) Functional Maturation of CA1 Synapses Involves Activity-Dependent Loss of Tonic Kainate Receptor-Mediated Inhibition of Glutamate Release. *Neuron* 50:415-429.
- Lauri SE, Bortolotto ZA, Bleakman D, Ornstein PL, Lodge D, Isaac JT, Collingridge GL (2001) A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Neuron* 32:697-709.
- Lauri SE, Bortolotto ZA, Nistico R, Bleakman D, Ornstein PL, Lodge D, Isaac JT, Collingridge GL (2003) A role for Ca²⁺ stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 39:327-341.
- Leal-Ortiz S, Waites C, Terry-Lorenzo R, Zamorano P, Gundelfinger E, Garner CC (2008) Piccolo modulation of Synapsin1a dynamics regulates synaptic vesicle exocytosis. *The Journal of Cell Biology* 181:831-846.
- Lei S, Pelkey KA, Topolnik L, Congar P, Lacaille JC, McBain CJ (2003) Depolarization-induced long-term depression at hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal neuron synapses. *J Neurosci* 23:9786-9795.
- Leinekugel X, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1998) Giant depolarizing potentials: the septal pole of the hippocampus paces the activity of the developing intact septohippocampal complex in vitro. *J Neurosci* 18:6349-6357.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18:243-255.
- Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K (2000) Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404:876-881.
- Jerma J (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 4:481-495.
- Jerma J, Paternain AV, Rodríguez-Moreno A, López-García JC (2001) Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol Rev* 81:971-998.
- 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 H, Rogawski MA (1998) GluR5 kainate receptor mediated synaptic transmission in rat basolateral amygdala in vitro. *Neuropharmacology* 37:1279-1286.
- Li JH, Wang YH, Wolfe BB, Krueger KE, Corsi L, Stocca G, Vicini S (1998) Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons. *Eur J Neurosci* 10:1704-1715.
- Li P, Wilding TJ, Kim SJ, Calejesan AA, Huettnner JE, Zhuo M (1999) Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature* 397:161-164.
- Lin YL, Lei YT, Hong CJ, Hsueh YP (2007) Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *J Cell Biol* 177:829-841.
- Lisman JE, Raghavachari S, Tsien RW (2007) The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nat Rev Neurosci* 8:597-609.
- Liu X, Murray KD, Jones E (2004) Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J Neurosci* 24:8885-8895.
- Lohmann C, Bonhoeffer T (2008) A role for local calcium signaling in rapid synaptic partner selection by dendritic filopodia. *Neuron* 59:253-260.
- Lomeli H, Wisden W, Kohler M, Keinänen K, Sommer B, Seeburg PH (1992) High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS Lett* 307:139-143.

- Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T, Hoyer T, Geiger JR, Kuner T, Monyer H, Higuchi M, Bach A, Seeburg PH (1994) Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science* 266:1709-1713.
- Loscher W, Lehmann H, Behl B, Seemann D, Teschendorf HJ, Hofmann HP, Lubisch W, Hoyer T, Lemaire HG, Gross G (1999) A new pyrrolyl-quinoxalinedione series of non-NMDA glutamate receptor antagonists: pharmacological characterization and comparison with NBQX and valproate in the kindling model of epilepsy. *Eur J Neurosci* 11:250-262.
- Lourenco J, Cannich A, Carta M, Coussen F, Mulle C, Marsicano G (2010) Synaptic activation of kainate receptors gates presynaptic CB(1) signaling at GABAergic synapses. *Nat Neurosci* 13:197-204.
- Lu HC, Gonzalez E, Crair MC (2001) Barrel cortex critical period plasticity is independent of changes in NMDA receptor subunit composition. *Neuron* 32:619-634.
- Maingret F (2005) Profound regulation of neonatal CA1 rat hippocampal GABAergic transmission by functionally distinct kainate receptor populations. *The Journal of Physiology* 567:131-142.
- Majima T, Ogita H, Yamada T, Amano H, Togashi H, Sakisaka T, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Miyoshi J, Takai Y (2009) Involvement of afadin in the formation and remodeling of synapses in the hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 385:539-544.
- Malenka RC, Nicoll RA (1997) Silent synapses speak up. *Neuron* 19:473-476.
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283:1923-1927.
- Marchal C, Mulle C (2004) Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *The Journal of Physiology* 561:27-37.
- Marler KJ, Becker-Barroso E, Martinez A, Llovera M, Wentzel C, Poopalasundaram S, Hindges R, Soriano E, Comella J, Drescher U (2008) A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *J Neurosci* 28:12700-12712.
- Marrs GS, Green SH, Dailey ME (2001) Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nat Neurosci* 4:1006-1013.
- Martin S, Henley J (2004) Activity-dependent endocytic sorting of kainate receptors to recycling or degradation pathways. *EMBO J* 23:4749-4759.
- Martin S, Bouschet T, Jenkins EL, Nishimune A, Henley JM (2008) Bidirectional regulation of kainate receptor surface expression in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 283:36435-36440.
- Martincic I, Peralta ME, Ngsee JK (1997) Isolation and characterization of a dual prenylated Rab and VAMP2 receptor. *J Biol Chem* 272:26991-26998.
- Martinez A, Otal R, Sieber B, Ibanez C, Soriano E (2005) Disruption of ephrin-A/EphA binding alters synaptogenesis and neural connectivity in the hippocampus. *Neuroscience* 135:451-461.
- Martinez A, Alcantara S, Borrell V, Del Rio JA, Blasi J, Otal R, Campos N, Boronat A, Barbacid M, Silos-Santiago I, Soriano E (1998) TrkB and TrkC signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections. *J Neurosci* 18:7336-7350.
- Matsuno H, Okabe S, Mishina M, Yanagida T, Mori K, Yoshihara Y (2006) Telencephalin slows spine maturation. *J Neurosci* 26:1776-1786.
- Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294:1354-1357.
- Mayer M (2006) Crystal Structures of the Kainate Receptor GluR5 Ligand Binding Core Dimer with Novel GluR5-Selective Antagonists. *J Neurosci* 26:2852-2861.
- McAuliffe JJ, Bronson SL, Hester MS, Murphy BL, Dahlquist-Topala R, Richards DA, Danzer SC (2009) Altered patterning of dentate granule cell mossy fiber inputs onto CA3 pyramidal cells in limbic epilepsy. *Hippocampus*.
- McIlhinney RA, Molnar E, Atack JR, Whiting PJ (1996) Cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1a requires the co-expression of the NR2A subunit in transfected cells. *Neuroscience* 70:989-997.
- Mei L, Xiong WC (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9:437-452.
- Mellor J, Nicoll RA (2001) Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium. *Nat Neurosci* 4:125-126.
- Mendez P, De Roo M, Poglia L, Klauser P, Muller D (2010) N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization. *J Cell Biol* 189:589-600.
- Min MY, Melyan Z, Kullmann DM (1999) Synaptically released glutamate reduces gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic inhibition in the hippocampus via kainate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9932-9937.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Mizoguchi A (2002) Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses. *The Journal of Cell Biology* 156:555-565.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Moore KA, Nicoll RA, Schmitz D (2003) Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14397-14402.
- More J (2004) Characterisation of UBP296: a novel, potent and selective kainate receptor antagonist. *Neuropharmacology* 47:46-64.

- Mori-Kawakami F, Kobayashi K, Takahashi T (2003) Developmental decrease in synaptic facilitation at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. *J Physiol* 553:37-48.
- Mori M, Abegg M, Gähwiler B, Gerber U (2004) A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature* 431:453-456.
- Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, Garshasbi M, Kahrizi K, Ullmann R, Abedini SS, Nieh SE, Amini SH, Goswami C, Tzschach A, Jensen LR, Schmitz D, Ropers HH, Najmabadi H, Kuss AW (2007) A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 81:792-798.
- Mott DD, Washburn MS, Zhang S, Dingledine RJ (2003) Subunit-dependent modulation of kainate receptors by extracellular protons and polyamines. *J Neurosci* 23:1179-1188.
- Mott DD, Rojas A, Fisher JL, Dingledine RJ, Benveniste M Subunit-specific desensitization of heteromeric kainate receptors. *J Physiol* 588:683-700.
- Mozhayeva MG, Sara Y, Liu X, Kavalali ET (2002) Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J Neurosci* 22:654-665.
- Mukherjee K, Yang X, Gerber SH, Kwon HB, Ho A, Castillo PE, Liu X, Sudhof TC (2010) Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6504-6509.
- Mulle C, Sailer A, Swanson GT, Brana C, O'Gorman S, Bettler B, Heinemann SF (2000) Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* 28:475-484.
- Mulle C, Sailer A, Pérez-Otaño I, Dickinson-Anson H, Castillo PE, Bureau I, Maron C, Gage FH, Mann JR, Bettler B, Heinemann SF (1998) Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 392:601-605.
- Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci* 6:153-160.
- Nadif Kasri N, Nakano-Kobayashi A, Malinow R, Li B, Van Aelst L (2009) The Rho-linked mental retardation protein oligophrenin-1 controls synapse maturation and plasticity by stabilizing AMPA receptors. *Genes Dev* 23:1289-1302.
- Nagerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44:759-767.
- Nam CI, Chen L (2005) Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6137-6142.
- Nasu-Nishimura Y, Jaffe H, Isaac JT, Roche KW Differential regulation of kainate receptor trafficking by phosphorylation of distinct sites on GluR6. *J Biol Chem* 285:2847-2856.
- Nasu-Nishimura Y, Hurtado D, Braud S, Tang TT, Isaac JT, Roche KW (2006) Identification of an endoplasmic reticulum-retention motif in an intracellular loop of the kainate receptor subunit KA2. *J Neurosci* 26:7014-7021.
- Ng D, Pitcher GM, Szilard RK, Sertie A, Kanisek M, Clapcote SJ, Lipina T, Kalia LV, Joo D, McKelvie C, Cortez M, Roder JC, Salter MW, McInnes RR (2009) Neto1 is a novel CUB-domain NMDA receptor-interacting protein required for synaptic plasticity and learning. *Plos Biol* 7:e41.
- Nicoll R, Schmitz D (2005) Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:863-876.
- O'Donnell WT, Warren ST (2002) A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci* 25:315-338.
- O'Neill MJ, Bond A, Ornstein PL, Ward MA, Hicks CA, Hoo K, Bleakman D, Lodge D (1998) Decahydroisoquinolines: novel competitive AMPA/kainate antagonists with neuroprotective effects in global cerebral ischaemia. *Neuropharmacology* 37:1211-1222.
- Okabe S, Miwa A, Okado H (2001a) Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci* 21:6105-6114.
- Okabe S, Urushido T, Konno D, Okado H, Sobue K (2001b) Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. *J Neurosci* 21:9561-9571.
- Otal R, Martínez A, Soriano E (2005) Lack of TrkB and TrkC signaling alters the synaptogenesis and maturation of mossy fiber terminals in the hippocampus. *Cell Tissue Res* 319:349-358.
- Pak DT, Sheng M (2003) Targeted protein degradation and synapse remodeling by an inducible protein kinase. *Science* 302:1368-1373.
- Park Y, Jo J, Isaac J, Cho K (2006) Long-Term Depression of Kainate Receptor-Mediated Synaptic Transmission. *Neuron* 49:95-106.
- Partin KM, Patneau DK, Winters CA, Mayer ML, Buonanno A (1993) Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron* 11:1069-1082.
- Passafaro M, Piech V, Sheng M (2001) Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4:917-926.
- Paternain AV, Vicente A, Nielsen EO, Lerma J (1996) Comparative antagonism of kainate-activated kainate and AMPA receptors in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 8:2129-2136.
- Paternain AV, Herrera MT, Nieto MA, Lerma J (2000) GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors. *J Neurosci* 20:196-205.
- Paternain AV, Cohen A, Stern-Bach Y, Lerma J (2003) A role for extracellular Na⁺ in the channel gating of native and recombinant kainate receptors. *J Neurosci* 23:8641-8648.

- Pedregal C, Collado I, Escribano A, Ezquerro J, Dominguez C, Mateo AI, Rubio A, Baker SR, Goldsworthy J, Kamboj RK, Ballyk BA, Hoo K, Bleakman D (2000) 4-Alkyl- and 4-cinnamylglutamic acid analogues are potent GluR5 kainate receptor agonists. *J Med Chem* 43:1958-1968.
- Perrais D, Coussen F, Mulle C (2009a) Atypical functional properties of GluK3-containing kainate receptors. *J Neurosci* 29:15499-15510.
- Perrais D, Pinheiro PS, Jane DE, Mulle C (2009b) Antagonism of recombinant and native GluK3-containing kainate receptors. *Neuropharmacology* 56:131-140.
- Petralia RS, Wenthold RJ (1999) Immunocytochemistry of NMDA receptors. *Methods Mol Biol* 128:73-92.
- Petralia RS, Sans N, Wang YX, Wenthold RJ (2005) Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 29:436-452.
- Pfeiffer BE, Zang T, Wilkerson JR, Taniguchi M, Maksimova MA, Smith LN, Cowan CW, Huber KM Fragile X mental retardation protein is required for synapse elimination by the activity-dependent transcription factor MEF2. *Neuron* 66:191-197.
- Philpot BD, Sekhar AK, Shouval HZ, Bear MF (2001) Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex. *Neuron* 29:157-169.
- Pickering DS, Taverna FA, Salter MW, Hampson DR (1995) Palmitoylation of the GluR6 kainate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12090-12094.
- Pinheiro PS, Mulle C (2006) Kainate receptors. *Cell and Tissue Research* 326:457-482.
- Pinheiro PS, Perrais D, Coussen F, Barhanin J, Bettler B, Mann JR, Malva JO, Heinemann S, Mulle C (2007) GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12181-12186.
- Plested AJ, Mayer ML (2007) Structure and mechanism of kainate receptor modulation by anions. *Neuron* 53:829-841.
- Plested AJ, Vijayan R, Biggin PC, Mayer ML (2008) Molecular basis of kainate receptor modulation by sodium. *Neuron* 58:720-735.
- Poncer JC, Malinow R (2001) Postsynaptic conversion of silent synapses during LTP affects synaptic gain and transmission dynamics. *Nat Neurosci* 4:989-996.
- Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24-32.
- Qin L, Marrs GS, McKim R, Dailey ME (2001) Hippocampal mossy fibers induce assembly and clustering of PSD95-containing postsynaptic densities independent of glutamate receptor activation. *J Comp Neurol* 440:284-298.
- Qiu S, Weeber E (2007) Reelin Signaling Facilitates Maturation of CA1 Glutamatergic Synapses. *Journal of Neurophysiology* 97:2312-2321.
- Quinlan EM, Olstein DH, Bear MF (1999a) Bidirectional, experience-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition in the rat visual cortex during postnatal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12876-12880.
- Quinlan EM, Philpot BD, Huganir RL, Bear MF (1999b) Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat Neurosci* 2:352-357.
- Quinlan EM, Lebel D, Brosh I, Barkai E (2004) A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications. *Neuron* 41:185-192.
- Ranscht B (2000) Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation. *Int J Dev Neurosci* 18:643-651.
- Rebola N, Lujan R, Cunha R, Mulle C (2008) Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron* 57:121-134.
- Rebola N, Sachidanandam S, Perrais D, Cunha R, Mulle C (2007) Short-Term Plasticity of Kainate Receptor-Mediated EPSCs Induced by NMDA Receptors at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *J Neurosci* 27:3987-3993.
- Reddy PS, Housman DE (1997) The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr Opin Cell Biol* 9:364-372.
- Regus-Leidig H, tom Dieck S, Brandstatter JH (2010) Absence of functional active zone protein Bassoon affects assembly and transport of ribbon precursors during early steps of photoreceptor synaptogenesis. *Eur J Cell Biol* 89:468-475.
- Regus-Leidig H, Tom Dieck S, Specht D, Meyer L, Brandstatter JH (2009) Early steps in the assembly of photoreceptor ribbon synapses in the mouse retina: the involvement of precursor spheres. *J Comp Neurol* 512:814-824.
- Reid CA, Fabian-Fine R, Fine A (2001) Postsynaptic calcium transients evoked by activation of individual hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 21:2206-2214.
- Ren Z (2003) Cell Surface Expression of GluR5 Kainate Receptors Is Regulated by an Endoplasmic Reticulum Retention Signal. *Journal of Biological Chemistry* 278:52700-52709.
- Ren Z, Riley NJ, Garcia EP, Sanders JM, Swanson GT, Marshall J (2003) Multiple trafficking signals regulate kainate receptor KA2 subunit surface expression. *J Neurosci* 23:6608-6616.
- Renger JJ, Egles C, Liu G (2001) A developmental switch in neurotransmitter flux enhances synaptic efficacy by affecting AMPA receptor activation. *Neuron* 29:469-484.
- Richter K, Langnaese K, Kreutz MR, Olias G, Zhai R, Scheich H, Garner CC, Gundelfinger ED (1999) Presynaptic cytomatrix protein bassoon is localized at both excitatory and inhibitory synapses of rat brain. *J Comp Neurol* 408:437-448.
- Ritter LM, Vazquez DM, Meador-Woodruff JH (2002) Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 139:227-236.
- Rivera R, Rozas JL, Lerma J (2007) PKC-dependent autoregulation of membrane kainate receptors. *EMBO J* 26:4359-4367.
- Rizzoli S, Betz W (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6:57-69.

- Rollenhagen A, Satzler K, Rodriguez EP, Jonas P, Frotscher M, Lubke JH (2007) Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 27:10434-10444.
- Rosenmund C, Sigler A, Augustin I, Reim K, Brose N, Rhee JS (2002) Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* 33:411-424.
- Rostaing P, Real E, Siksou L, Lechaire JP, Boudier T, Boeckers TM, Gertler F, Gundelfinger ED, Triller A, Marty S (2006) Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography. *Eur J Neurosci* 24:3463-3474.
- Rouach N, Byrd K, Petralia RS, Elias GM, Adesnik H, Tomita S, Karimzadegan S, Kealey C, Brecht DS, Nicoll RA (2005) TARP gamma-8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 8:1525-1533.
- Ruiz A, Sachidhanandam S, Utvik JK, Coussen F, Mulle C (2005) Distinct subunits in heteromeric kainate receptors mediate ionotropic and metabotropic function at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 25:11710-11718.
- Ruiz A, Fabian-Fine R, Scott R, Walker MC, Rusakov DA, Kullmann D (2003) GABAA receptors at hippocampal mossy fibers. *Neuron* 39:961-973.
- Rumpel S, Hatt H, Gottmann K (1998) Silent synapses in the developing rat visual cortex: evidence for postsynaptic expression of synaptic plasticity. *J Neurosci* 18:8863-8874.
- Sabo S, Gomes R, Mcallister A (2006) Formation of Presynaptic Terminals at Predefined Sites along Axons. *J Neurosci* 26:10813-10825.
- Sabo SL, McAllister AK (2003) Mobility and cycling of synaptic protein-containing vesicles in axonal growth cone filopodia. *Nat Neurosci* 6:1264-1269.
- Sachidhanandam S, Blanchet C, Jeantet Y, Cho YH, Mulle C (2009) Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 29:5000-5008.
- Safiulina VF, Cherubini E (2009) At immature mossy fibers-CA3 connections, activation of presynaptic GABA(B) receptors by endogenously released GABA contributes to synapses silencing. *Front Cell Neurosci* 3:1.
- Safiulina VF, Fattorini G, Conti F, Cherubini E (2006) GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. *J Neurosci* 26:597-608.
- Sakimura K, Morita T, Kushiya E, Mishina M (1992) Primary structure and expression of the gamma 2 subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate. *Neuron* 8:267-274.
- Salin PA, Scanziani M, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13304-13309.
- Sallert M, Malkki H, Segerstrale M, Taira T, Lauri SE (2007) Effects of the kainate receptor agonist ATPA on glutamatergic synaptic transmission and plasticity during early postnatal development. *Neuropharmacology* 52:1354-1365.
- Sallert M, Rantamaki T, Vesikansa A, Anthoni H, Harju K, Yli-Kauhalauma J, Taira T, Castren E, Lauri SE (2009) Brain-derived neurotrophic factor controls activity-dependent maturation of CA1 synapses by downregulating tonic activation of presynaptic kainate receptors. *J Neurosci* 29:11294-11303.
- Sanders JM, Ito K, Settimo L, Pentikainen OT, Shoji M, Sasaki M, Johnson MS, Sakai R, Swanson GT (2005) Divergent pharmacological activity of novel marine-derived excitatory amino acids on glutamate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 314:1068-1078.
- Sanmarti-Vila L, tom Dieck S, Richter K, Altmann W, Zhang L, Volkandt W, Zimmermann H, Garner CC, Gundelfinger ED, Dresbach T (2000) Membrane association of presynaptic cytomatrix protein bassoon. *Biochem Biophys Res Commun* 275:43-46.
- Sans N, Petralia RS, Wang YX, Blahos J, Hell JW, Wenthold RJ (2000) A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20:1260-1271.
- Sara Y (2005) Selective Capability of SynCAM and Neuroligin for Functional Synapse Assembly. *J Neurosci* 25:260-270.
- Scheiffele P (2003) Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 26:485-508.
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657-669.
- Schiffer HH, Swanson GT, Heinemann SF (1997) Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron* 19:1141-1146.
- Schmitz D, Frerking M, Nicoll RA (2000) Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 27:327-338.
- Schmitz D, Mellor J, Nicoll RA (2001) Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* 291:1972-1976.
- Schmitz D, Mellor J, Breustedt J, Nicoll R (2003) Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Nat Neurosci* 6:1058-1063.
- Schoch S, Gundelfinger ED (2006) Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* 326:379-391.
- Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, Schmitz F, Malenka RC, Sudhof TC (2002) RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* 415:321-326.
- Scott R, Rusakov DA (2006) Main determinants of presynaptic Ca²⁺ dynamics at individual mossy fiber-CA3 pyramidal cell synapses. *J Neurosci* 26:7071-7081.
- Scott R, Lalic T, Kullmann DM, Capogna M, Rusakov DA (2008) Target-cell specificity of kainate autoreceptor and Ca²⁺-store-dependent short-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 28:13139-13149.

- Segerstrale M, Juuri J, Lanore F, Piepponen P, Lauri SE, Mulle C, Taira T (2010) High firing rate of neonatal hippocampal interneurons is caused by attenuation of afterhyperpolarizing potassium currents by tonically active kainate receptors. *J Neurosci* 30:6507-6514.
- Selak S, Paternain AV, Aller MI, Pico E, Rivera R, Lerma J (2009) A role for SNAP25 in internalization of kainate receptors and synaptic plasticity. *Neuron* 63:357-371.
- Semyanov A, Kullmann DM (2001) Kainate receptor-dependent axonal depolarization and action potential initiation in interneurons. *Nat Neurosci* 4:718-723.
- Shapira M, Zhai RG, Dresbach T, Bresler T, Torres VI, Gundelfinger E, Ziv N, Garner CC (2003) Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. *Neuron* 38:237-252.
- Sheng M, Hoogenraad CC (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76:823-847.
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144-147.
- Shi J, Aamodt SM, Constantine-Paton M (1997) Temporal correlations between functional and molecular changes in NMDA receptors and GABA neurotransmission in the superior colliculus. *J Neurosci* 17:6264-6276.
- Shi J, Aamodt SM, Townsend M, Constantine-Paton M (2001) Developmental depression of glutamate neurotransmission by chronic low-level activation of NMDA receptors. *J Neurosci* 21:6233-6244.
- Siksou L, Rostaing P, Lechaire JP, Boudier T, Ohtsuka T, Fejtova A, Kao HT, Greengard P, Gundelfinger ED, Triller A, Marty S (2007) Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J Neurosci* 27:6868-6877.
- Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci* 11:490-502.
- Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN (2010) Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci* 11:490-502.
- Sivakumaran S, Mohajerani M, Cherubini E (2009) At immature mossy-fiber-CA3 synapses, correlated presynaptic and postsynaptic activity persistently enhances GABA release and network excitability via BDNF and cAMP-dependent PKA. *J Neurosci* 29:2637-2647.
- Small B, Thomas J, Kemp M, Hoo K, Ballyk B, Deverill M, Ogden AM, Rubio A, Pedregal C, Bleakman D (1998) LY339434, a GluR5 kainate receptor agonist. *Neuropharmacology* 37:1261-1267.
- Smolders I, Bortolotto Z, Clarke VR, Warre R, Khan G, O'Neill M, Ornstein P, Bleakman D, Ogden A, Weiss B, Stables J, Ho K, Ebinger G, Collingridge GL, Lodge D, Michotte Y (2002) Antagonists of GLUK5-containing kainate receptors prevent pilocarpine-induced limbic seizures. *Nat Neurosci* 5:9.
- Sommer B, Burnashev N, Verdoorn TA, Keinänen K, Sakmann B, Seeburg PH (1992) A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J* 11:1651-1656.
- Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249:1580-1585.
- Stan A, Pielarski KN, Brigadski T, Wittenmayer N, Fedorchenko O, Gohla A, Lessmann V, Dresbach T, Gottmann K (2010) Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11116-11121.
- Staras K, Branco T, Burden JJ, Pozo K, Darcy K, Marra V, Ratnayaka A, Goda Y (2010) A vesicle superpool spans multiple presynaptic terminals in hippocampal neurons. *Neuron* 66:37-44.
- Stocca G, Vicini S (1998) Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *J Physiol* 507 (Pt 1):13-24.
- Sudhof T (2004) THE SYNAPTIC VESICLE CYCLE. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.
- Sudhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474-477.
- Suto F, Tsuboi M, Kamiya H, Mizuno H, Kiyama Y, Komai S, Shimizu M, Sanbo M, Yagi T, Hiromi Y (2007) Interactions between Plexin-A2, Plexin-A4, and Semaphorin 6A Control Lamina-Restricted Projection of Hippocampal Mossy Fibers. *Neuron* 53:535-547.
- Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G (1988) Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 239:1147-1150.
- Sutula TP, Dudek FE (2007) Unmasking recurrent excitation generated by mossy fiber sprouting in the epileptic dentate gyrus: an emergent property of a complex system. *Prog Brain Res* 163:541-563.
- Swanson GT, Heinemann SF (1998) Heterogeneity of homomeric GluR5 kainate receptor desensitization expressed in HEK293 cells. *The Journal of Physiology* 513 (Pt 3):639-646.
- Swanson GT, Green T, Heinemann SF (1998) Kainate receptors exhibit differential sensitivities to (S)-5-iodowillardiine. *Mol Pharmacol* 53:942-949.
- Swanson GT, Feldmeyer D, Kaneda M, Cull-Candy SG (1996) Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J Physiol* 492 (Pt 1):129-142.
- Swanson GT, Green T, Sakai R, Contractor A, Che W, Kamiya H, Heinemann SF (2002) Differential activation of individual subunits in heteromeric kainate receptors. *Neuron* 34:589-598.
- Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Sudhof TC (2007) A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318:71-76.
- Takai Y (2003) Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *Journal of Cell Science* 116:17-27.

- Takai Y, Shimizu K, Ohtsuka T (2003) The roles of cadherins and nectins in interneuronal synapse formation. *Current Opinion in Neurobiology* 13:520-526.
- Takao-Rikitsu E (2004) Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release. *The Journal of Cell Biology* 164:301-311.
- Tamura M, Koyama R, Ikegaya Y, Matsuki N, Yamada MK (2006) K252a, an inhibitor of Trk, disturbs pathfinding of hippocampal mossy fibers. *Neuroreport* 17:481-486.
- Tamura M, Tamura N, Ikeda T, Koyama R, Ikegaya Y, Matsuki N, Yamada MK (2009) Influence of brain-derived neurotrophic factor on pathfinding of dentate granule cell axons, the hippocampal mossy fibers. *Molecular brain* 2:2.
- Tao-Cheng JH (2007) Ultrastructural localization of active zone and synaptic vesicle proteins in a preassembled multi-vesicle transport aggregate. *Neuroscience* 150:575-584.
- Tashiro A, Dunaevsky A, Blazeski R, Mason CA, Yuste R (2003) Bidirectional regulation of hippocampal mossy fiber filopodial motility by kainate receptors: a two-step model of synaptogenesis. *Neuron* 38:773-784.
- Tawarayama H, Yoshida Y, Suto F, Mitchell KJ, Fujisawa H (2010) Roles of semaphorin-6B and plexin-A2 in lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. *J Neurosci* 30:7049-7060.
- Terauchi A, Johnson-Venkatesh EM, Toth AB, Javed D, Sutton MA, Umemori H (2010) Distinct FGFs promote differentiation of excitatory and inhibitory synapses. *Nature* 465:783-787.
- Tom Dieck S (2005) Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *The Journal of Cell Biology* 168:825-836.
- Tom Dieck S, Sanmarti-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kämpf U, Fränzer JT, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *The Journal of Cell Biology* 142:499-509.
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402:421-425.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11:901-907.
- Tovar KR, Westbrook GL (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 19:4180-4188.
- Tovar KR, Sprouffske K, Westbrook GL (2000) Fast NMDA receptor-mediated synaptic currents in neurons from mice lacking the epsilon2 (NR2B) subunit. *J Neurophysiol* 83:616-620.
- 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.
- Tsuriel S, Fisher A, Wittenmayer N, Dresbach T, Garner CC, Ziv N (2009) Exchange and Redistribution Dynamics of the Cytoskeleton of the Active Zone Molecule Bassoon. *J Neurosci* 29:351-358.
- Tzounopoulos T, Janz R, Sudhof TC, Nicoll RA, Malenka RC (1998) A role for cAMP in long-term depression at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 21:837-845.
- Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol* 135:767-779.
- Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA (2004) Role for glia in synaptogenesis. *Glia* 47:209-216.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661.
- Ultanir SK, Kim JE, Hall BJ, Deerinck T, Ellisman M, Ghosh A (2007) Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:19553-19558.
- Umemori H, Linhoff MW, Ornitz DM, Sanes JR (2004) FGF22 and its close relatives are presynaptic organizing molecules in the mammalian brain. *Cell* 118:257-270.
- Urban NN, Barrionuevo G (1998) Active summation of excitatory postsynaptic potentials in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11450-11455.
- van Zundert B, Zhao JP, Constantine-Paton M (2004) Synaptic drive at developing synapses: Transient up-regulation of kainate receptors. *Dev Neurobiol*.
- van Zundert B, Zhao JP, Constantine-Paton M (2010) Synaptic drive at developing synapses: Transient up-regulation of kainate receptors. *Dev Neurobiol*.
- Varoqueaux F, Sigler A, Rhee JS, Brose N, Enk C, Reim K, Rosenmund C (2002) Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9037-9042.
- Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Sudhof TC, Brose N (2006) Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51:741-754.
- Vazquez LE, Chen HJ, Sokolova I, Knuesel I, Kennedy MB (2004) SynGAP regulates spine formation. *J Neurosci* 24:8862-8872.
- Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Sudhof TC (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287:864-869.
- Vesikansa A, Sallert M, Taira T, Lauri SE (2007) Activation of kainate receptors controls the number of functional glutamatergic synapses in the area CA1 of rat hippocampus. *The Journal of Physiology* 583:145-157.

- Vicario-Abejon C, Collin C, McKay RD, Segal M (1998) Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:7256-7271.
- Vignes M, Collingridge GL (1997) The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388:179-182.
- Villacres EC, Wong ST, Chavkin C, Storm DR (1998) Type I adenyl cyclase mutant mice have impaired mossy fiber long-term potentiation. *J Neurosci* 18:3186-3194.
- Voronin LL, Cherubini E (2004) 'Deaf, mute and whispering' silent synapses: their role in synaptic plasticity. *J Physiol* 557:3-12.
- Wadel K, Neher E, Sakaba T (2007) The coupling between synaptic vesicles and Ca²⁺ channels determines fast neurotransmitter release. *Neuron* 53:563-575.
- Walker MC, Ruiz A, Kullmann DM (2001) Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. *Neuron* 29:703-715.
- Wang CY, Chang K, Petralia RS, Wang YX, Seabold GK, Wenthold RJ (2006) A novel family of adhesion-like molecules that interacts with the NMDA receptor. *J Neurosci* 26:2174-2183.
- Wang J, Yeckel MF, Johnston D, Zucker RS (2004) Photolysis of postsynaptic caged Ca²⁺ can potentiate and depress mossy fiber synaptic responses in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 91:1596-1607.
- Wang X, Hu B, Zieba A, Neumann NG, Kasper-Sonnenberg M, Honsbein A, Hultqvist G, Conze T, Witt W, Limbach C, Geitmann M, Danielson H, Kolarow R, Niemann G, Lessmann V, Kilimann MW (2009) A protein interaction node at the neurotransmitter release site: domains of Aczonin/Piccolo, Bassoon, CAST, and rim converge on the N-terminal domain of Munc13-1. *J Neurosci* 29:12584-12596.
- Washbourne P, Bennett JE, McAllister AK (2002) Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nat Neurosci* 5:751-759.
- Watanabe M, Fukaya M, Sakimura K, Manabe T, Mishina M, Inoue Y (1998) Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fibre-recipient layer) of the mouse hippocampal CA3 subfield. *Eur J Neurosci* 10:478-487.
- Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA, Nicoll RA (1994) Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science* 265:1878-1882.
- Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 68:469-478.
- Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W, Seeburg PH (1991) Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* 351:742-744.
- Wilding T (2005) Q/R Site Editing Controls Kainate Receptor Inhibition by Membrane Fatty Acids. *J Neurosci* 25:9470-9478.
- Wilding TJ, Chai YH, Huettner JE (1998) Inhibition of rat neuronal kainate receptors by cis-unsaturated fatty acids. *J Physiol* 513 (Pt 2):331-339.
- Williams S, Johnston D (1989) Long-term potentiation of hippocampal mossy fiber synapses is blocked by postsynaptic injection of calcium chelators. *Neuron* 3:583-588.
- Wisden W, Seeburg PH (1993) A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci* 13:3582-3598.
- Wittenmayer N, Korber C, Liu H, Kremer T, Varoqueaux F, Chapman ER, Brose N, Kuner T, Dresbach T (2009) Postsynaptic Neuroligin1 regulates presynaptic maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13564-13569.
- Wondolowski J, Frerking M (2009) Subunit-Dependent Postsynaptic Expression of Kainate Receptors on Hippocampal Interneurons in Area CA1. *J Neurosci* 29:563-574.
- Wong LA, Mayer ML (1993) Differential modulation by cyclothiazide and concanavalin A of desensitization at native alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid- and kainate-preferring glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 44:504-510.
- Wong WT, Wong RO (2000) Rapid dendritic movements during synapse formation and rearrangement. *Curr Opin Neurobiol* 10:118-124.
- Wu G, Malinow R, Cline HT (1996) Maturation of a central glutamatergic synapse. *Science* 274:972-976.
- Wu LJ, Zhao MG, Toyoda H, Ko SW, Zhuo M (2005) Kainate receptor-mediated synaptic transmission in the adult anterior cingulate cortex. *J Neurophysiol* 94:1805-1813.
- Xiao M, Wasling P, Hanse E, Gustafsson B (2004) Creation of AMPA-silent synapses in the neonatal hippocampus. *Nat Neurosci* 7:236-243.
- Yamada A, Irie K, Deguchi-Tawarada M, Ohtsuka T, Takai Y (2003) Nectin-dependent localization of synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) at the puncta adherentia junctions formed between the mossy fibre terminals and the dendrites of pyramidal cells in the CA3 area of the mouse hippocampus. *Genes Cells* 8:985-994.
- Yeckel MF, Kapur A, Johnston D (1999) Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism. *Nat Neurosci* 2:625-633.
- Yokoi M, Kobayashi K, Manabe T, Takahashi T, Sakaguchi I, Katsuura G, Shigemoto R, Ohishi H, Nomura S, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M, Nakanishi S (1996) Impairment of hippocampal mossy fiber LTD in mice lacking mGluR2. *Science* 273:645-647.
- Yoshihara Y, De Roo M, Muller D (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol* 19:146-153.
- Yoshii A, Constantine-Paton M (2007) BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 10:702-711.

- Yoshii A, Constantine-Paton M (2010) Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol* 70:304-322.
- Yue KT, MacDonald JF, Pekhletski R, Hampson DR (1995) Differential effects of lectins on recombinant glutamate receptors. *Eur J Pharmacol* 291:229-235.
- Zalutsky RA, Nicoll RA (1990) Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* 248:1619-1624.
- Zhai R, Olias G, Chung WJ, Lester RA, Tom Dieck S, Langnaese K, Kreutz MR, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC (2000) Temporal appearance of the presynaptic cytomatrix protein bassoon during synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci* 15:417-428.
- Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2001) Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron* 29:131-143.
- Zhang L, Volkandt W, Gundelfinger ED, Zimmermann H (2000) A comparison of synaptic protein localization in hippocampal mossy fiber terminals and neurosecretory endings of the neurohypophysis using the cryo-immunogold technique. *J Neurocytol* 29:19-30.
- Zhang LI, Poo MM (2001) Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1207-1214.
- Zhang W, St-Gelais F, Grabner CP, Trinidad JC, Sumioka A, Morimoto-Tomita M, Kim KS, Straub C, Burlingame AL, Howe JR, Tomita S (2009) A transmembrane accessory subunit that modulates kainate-type glutamate receptors. *Neuron* 61:385-396.
- Zhen M, Jin Y (2004) Presynaptic terminal differentiation: transport and assembly. *Curr Opin Neurobiol* 14:280-287.
- Zhou LM, Gu ZQ, Costa AM, Yamada KA, Mansson PE, Giordano T, Skolnick P, Jones KA (1997) (2S,4R)-4-methylglutamic acid (SYM 2081): a selective, high-affinity ligand for kainate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 280:422-427.
- Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y, Malinow R (2000) Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3:1098-1106.
- Zito K, Scheuss V, Knott G, Hill T, Svoboda K (2009) Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron* 61:247-258.
- Ziv N, Garner CC (2004) Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci* 5:385-399.
- Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.
- Ziv NE, Garner CC (2001) Principles of glutamatergic synapse formation: seeing the forest for the trees. *Curr Opin Neurobiol* 11:536-543.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.
- Zukin RS, Bennett MV (1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 18:306-313.

ANNEXES

ANNEXE 1

“High firing rate of neonatal interneurons is due to attenuation of afterhyperpolarizing potassium currents by tonically active kainate receptors”

Segerstråle S., Juuri J., Lanore F., Piepponen P., Lauri S. E., Mulle C. and Taira T.

J Neurosci 30(19): 6507-14 (2010).

High Firing Rate of Neonatal Hippocampal Interneurons Is Caused by Attenuation of Afterhyperpolarizing Potassium Currents by Tonically Active Kainate Receptors

Mikael Segerstråle,^{1,2} Juuso Juuri,¹ Frédéric Lanore,² Petteri Piepponen,³ Sari E. Lauri,¹ Christophe Mulle,² and Tomi Taira¹

¹Neuroscience Center and Department of Biosciences, University of Helsinki, FIN-00014 Helsinki, Finland, ²Laboratoire Physiologie Cellulaire de la Synapse, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5091, Bordeaux Neuroscience Institute, Université Bordeaux 2, Bordeaux 33076, France, and ³Department of Pharmacy, Division of Pharmacology and Toxicology, University of Helsinki, FIN-00014 Helsinki, Finland

In the neonatal hippocampus, the activity of interneurons shapes early network bursts that are important for the establishment of neuronal connectivity. However, mechanisms controlling the firing of immature interneurons remain elusive. We now show that the spontaneous firing rate of CA3 stratum lucidum interneurons markedly decreases during early postnatal development because of changes in the properties of GluK1 (formerly known as GluR5) subunit-containing kainate receptors (KARs). In the neonate, activation of KARs by ambient glutamate exerts a tonic inhibition of the medium-duration afterhyperpolarization (mAHP) by a G-protein-dependent mechanism, permitting a high interneuronal firing rate. During development, the amplitude of the apamine-sensitive K^+ currents responsible for the mAHP increases dramatically because of decoupling between KAR activation and mAHP modulation, leading to decreased interneuronal firing. The developmental shift in the KAR function and its consequences on interneuronal activity are likely to have a fundamental role in the maturation of the synchronous neuronal oscillations typical for adult hippocampal circuitry.

Introduction

Neuronal excitability and the degree of neuronal synchrony are critical properties in determining the behavior of neuronal networks. Inhibitory interneurons orchestrate network activities by pacing, timing, and synchronizing neural circuits in the adult as well as in the immature brain (McBain and Fisahn, 2001; Ben-Ari et al., 2004). However, despite their vital role in neuronal functioning, surprisingly little is known about the development of intrinsic firing properties of interneurons.

In the adult hippocampus, interneuronal firing is strongly modulated by afterhyperpolarizing K^+ currents (Zhang and McBain, 1995). The action potential (AP) firing pattern of stratum radiatum interneurons in CA3 is shaped by a Ca^{2+} -dependent afterhyperpolarization of medium duration (mAHP) (Savic et al., 2001) generated by an apamine-sensitive K^+ current mediated by SK channels (I_{AHP}) (Sah, 1996; Savic et al., 2001). Reduction of the mAHP increases the interneuronal firing rate (Savic et al., 2001), and suppression of the apamine-sensitive mAHP can also contribute to hippocampal epileptogenesis (Fernández de Sevilla et al., 2006).

There is increasing evidence showing that kainate receptors (KARs) can modulate slow afterhyperpolarization and neuronal

excitability in pyramidal neurons via a metabotropic action (Melyan et al., 2002, 2004; Fisahn et al., 2005; Ruiz et al., 2005). Furthermore, this action can be triggered by synaptic release of glutamate in the CA1 (Melyan et al., 2002) and CA3 pyramidal cells (Ruiz et al., 2005). We now show that in newborn CA3 interneurons, GluK1 subunit-containing KARs markedly increase action potential firing by a tonic G-protein-dependent inhibition of the apamine-sensitive I_{AHP} . We further demonstrate that the KAR-dependent inhibition of the I_{AHP} is age dependent and disappears by the end of the second postnatal week because of a developmental decoupling between KAR activation and mAHP inhibition. Thus, our finding unravels a novel, important physiological mechanism that sets the firing properties of the CA3 hippocampal interneurons during postnatal development.

Materials and Methods

Acute hippocampal slices were prepared from the brain of neonatal [postnatal days 3–5 (P3–P5)] or young (P14–P16) C57BL/6 and GluK1^{−/−} mice (on a hybrid 129Sv × C57BL/6 background) that have been intercrossed for several generations. In addition, GluK1^{−/−} mice that had recently been backcrossed for 10 generations on a pure C57BL/6 background were also used. In these mice, the difference in AP frequency was similarly impaired as compared with wild-type (WT) controls.

Briefly, the brain was quickly dissected into ice-cold solution containing (in mM): 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 10 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 15 D-glucose, 1 CaCl₂; saturated with 5% CO₂/95% O₂. A tissue block containing the hippocampi was dissected and glued into the stage of a vibratome. Three hundred fifty-micrometer-thick slices were cut parasagittally in the above solution and stored at room-temperature in a solution containing (in mM): 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 4 MgSO₄,

Received Sept. 30, 2009; revised Feb. 23, 2010; accepted March 22, 2010.

This work was supported by the Academy of Finland (to S.E.L. and T.T.), the Sigrid Juselius Foundation (to M.S., S.E.L., and T.T.), and University of Helsinki research funds (to S.E.L.). We thank Eli Lilly and Company for providing LY 382884.

Correspondence should be addressed to Tomi Taira at the above address. E-mail: tomi.taira@helsinki.fi.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4856-09.2010

Copyright © 2010 the authors 0270-6474/10/306507-08\$15.00/0

26 NaHCO₃, 15 D-glucose, 2 CaCl₂, 5% CO₂/95% O₂. The slices were used 1–4 h after cutting.

For electrophysiological recordings, the slices were placed in a submerged recording chamber and perfused with extracellular solution containing (in mM): 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 15 D-glucose, 2 CaCl₂; bubbled with 5% CO₂/95% O₂ at 32°C. Whole-cell and on-cell recordings were made from CA3 stratum lucidum interneurons using patch electrodes (3–5 MΩ). On-cell recordings were made with pipettes containing extracellular solution. Whole-cell pipettes used for current-clamp experiments contained the following (in mM): 130 K-gluconate, 8 NaCl, 10 HEPES, 0.4 EGTA, 4 Mg-ATP, and 0.3 Na-GTP. Pipettes used to record medium afterhyperpolarizing K⁺ current (*I*_{MAHP}) contained the following (in mM): 130 K-gluconate, 10 KCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 4 Mg-ATP, and 0.3 Na-GTP. For recordings of network activity, the filling solution consisted of the following (in mM): 135 K-gluconate, 10 HEPES, 5 EGTA, 4 Mg-ATP, 0.5 Na-GTP, 2 KCl, and 2 Ca(OH)₂. The osmolarity of all intracellular solutions was adjusted to 285 mOsm and the pH to 7.25. For pharmacological blockade of AMPARs, NMDARs, GABA_ARs, and GABA_BRs, we used GYKI 53655 (50 μM), AP-5 (50 μM), picrotoxin (100 μM), and CGP 55845 (1 μM), respectively. For the blockade of the metabotropic glutamate receptors mGluR1–mGluR8a, we used 2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carboxycyclopropyl-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propanoic acid (LY 341495; 100 μM). Noradrenergic (NE) receptors were blocked by using propranolol (1 μM), corynanthine (5 μM), and yohimbine (5 μM); serotonergic (5-HT) receptors were blocked by (2R)-1-(3-hydroxyphenyl)sulfonyl-2-(4-methyl-1-piperidinyl)ethylpyrrolidine (SB-269970; 0.1 μM), ketanserin (10 μM), and N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl cyclo-hexane carboxamide trihydrochloride (WAY-100635; 1 μM); dopaminergic (DA) receptors were blocked by R(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH-23390; 10 μM) and sulpiride (20 μM); and colinergic (ACh) receptors were blocked by atropine sulfate (1 μM). SR-141716 (5 μM) was used to block CB1 cannabinoid receptors.

Interneurons were visually identified under infrared illumination combined with differential contrast imaging or Dodt gradient optics. In addition, biocytin (Sigma-Aldrich) was routinely added to the filling solution (4 mg/ml), and the cells were visualized by Alexa 568-avidin immunostaining and fluorescence microscopy. The following criteria were used: (1) localization in the CA3 stratum lucidum; and (2) multipolar or bipolar shape of the cell soma (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Apart from visualization, the following electrophysiological criteria were used to differentiate between the interneurons and pyramidal cells: (1) maximal spiking frequency in response to depolarizing step; (2) instantaneous action potential firing frequency; and (3) spike adaptation rate.

As described previously (Savic et al., 2001), interneurons in CA3 stratum lucidum were mainly multipolar and had variable shapes of soma with diameters of <20 μm. Typically, the dendritic arborizations were limited to stratum radiatum. In terms of firing properties, visually identified interneurons and pyramidal cells could be easily distinguished. The saturating number of action potentials in response to a maximal depolarizing step (500 ms) was higher in interneurons than in pyramidal cells (22.4 ± 2.2 and 8.7 ± 5, respectively; *n* = 8 and 9; *p* < 0.005; P3–P5). Furthermore, the instantaneous frequency of action potentials in interneurons was 95 ± 9.2 Hz, whereas in pyramidal cells it was much lower, 43.3 ± 25.2 Hz (*p* < 0.005). The spike adaptation was more prominent in pyramidal cells than in interneurons. In pyramidal cells the spiking frequency during the 500 ms depolarizing step decreased to 25.5 ± 14.7% of the initial value, and in interneurons it decreased to 46.5 ± 6.8% (*p* < 0.005).

Action potentials were detected and analyzed using the Mini Analysis Program 5.6.6. (Synaptosoft). The amplitude detection threshold was set between 10 and 15 pA (2–5 times the baseline root mean square noise level), and the detected events were verified visually. The number of spontaneous events was calculated in 60 s bins and normalized to the average baseline value before drug application. Instantaneous frequency (*if*) was calculated from the interval between the two first action potentials evoked by the maximal current step. Spike adaptation rate was quantified by measuring the *if* between the last two spikes and normalizing the value against the *if* measured for the first two spikes. Data are expressed as percentage of control (i.e., 100% = no change). Medium afterhyperpolarizing currents, *I*_{MAHP}, were evoked by applying a depolarizing 60 mV, 40 ms step. The peak amplitude, duration (from step to 10% of baseline), and decay time were calculated by using pCLAMP software. We also measured the interspike trajectory (time in milliseconds to rise 5 mV from the lowest voltage between the spikes) between the second and the third spike during the 40 pA depolarizing step to quantitate the role of AHP in setting the interspike interval.

For analysis of enzymatic activity, samples of varying glutamate concentrations (0–100 μM, volume 1 ml) were incubated with or without the enzyme glutamic-pyruvic transaminase (GPT; 5 U/ml) (Sigma-Aldrich) and pyruvate (0.3–3 mM), for 10 min at 32°C. The samples were then rapidly frozen for storage before HPLC-based analysis of glutamate concentration.

All the pooled data are given as mean ± SEM for the number of cells indicated. For statistical analysis, ANOVA following Tukey's honestly significant difference (HSD) comparison or Student's two-tailed *t* test was used. *p* < 0.05 was considered as statistically significant.

All experiments were done in accordance with the guidelines given by the ethics committee for animal research at the University of Helsinki, Helsinki, Finland.

Results

GluK1 subunit-containing KARs regulate spontaneous interneuronal firing at P3–P5 but not at P14–P16

To study the spontaneous action potential firing properties during early development, on-cell recordings were made from CA3 stratum lucidum interneurons from P3–P5 and P14–P16 mice. The firing frequency was analyzed from at least 10 min of stable recording. The mean spontaneous firing frequency of interneurons was found to be strongly downregulated during postnatal development (P3–P5: 1.9 ± 0.4 Hz, *n* = 16; P14–P16: 0.5 ± 0.0 Hz, *n* = 8, *p* < 0.05) (Fig. 1*a*).

Interestingly, the mean firing frequency of interneurons in neonatal mice lacking the GluK1 subunit (GluK1^{−/−} mice) (Mulle et al., 2000) was found to be significantly lower compared with WT mice (0.5 ± 0.1 Hz, *n* = 25, *p* < 0.05). However, at P14–P16, the spontaneous interneuronal firing rate in GluK1^{−/−} mice was similar to that of WT (0.62 ± 0.18 Hz, *n* = 10, *p* = 0.46) (Fig. 1*a*) indicating that the developmental regulation of firing rate was absent in GluK1^{−/−} mice.

We next used the specific GluK1 antagonist LY 382884 to further study the role of GluK1 in interneuronal excitability. In line with the results obtained using GluK1^{−/−} mice, in neonatal WT mice LY 382884 (10 μM) reversibly and dramatically decreased the spontaneous firing rate of interneurons (18 ± 3% of control, *n* = 10, *p* < 0.005) (Fig. 1*b–d*). As expected, LY 382884 had no effect in the GluK1^{−/−} mice (105 ± 12% of control, *n* = 8, *p* = 0.65) (Fig. 1*b–d*) or WT mice at P14–P16 (97 ± 9% of control, *n* = 3; data not shown). The excitability of CA3 pyramidal neurons has been previously shown to be regulated by KARs containing the high-affinity GluK5 (formerly known as KA2) subunit (Ruiz et al., 2005). However, we found that the spontaneous firing frequency of interneurons was not different between wild-type and GLUK5^{−/−} mice at P3–P5 (1.9 ± 0.4 Hz, *n* = 16; 2.1 ± 0.4 Hz, *n* = 8; data not shown).

These data demonstrate that tonic activation of KARs containing the GluK1 subunit controls the activity of interneurons in the hippocampus in a developmentally restricted manner.

KARs regulate interneuronal excitability and mAHP at P3–P5

The simplest explanation for an effect of tonic GluK1 activation on interneuron firing is a direct depolarization of the neuronal

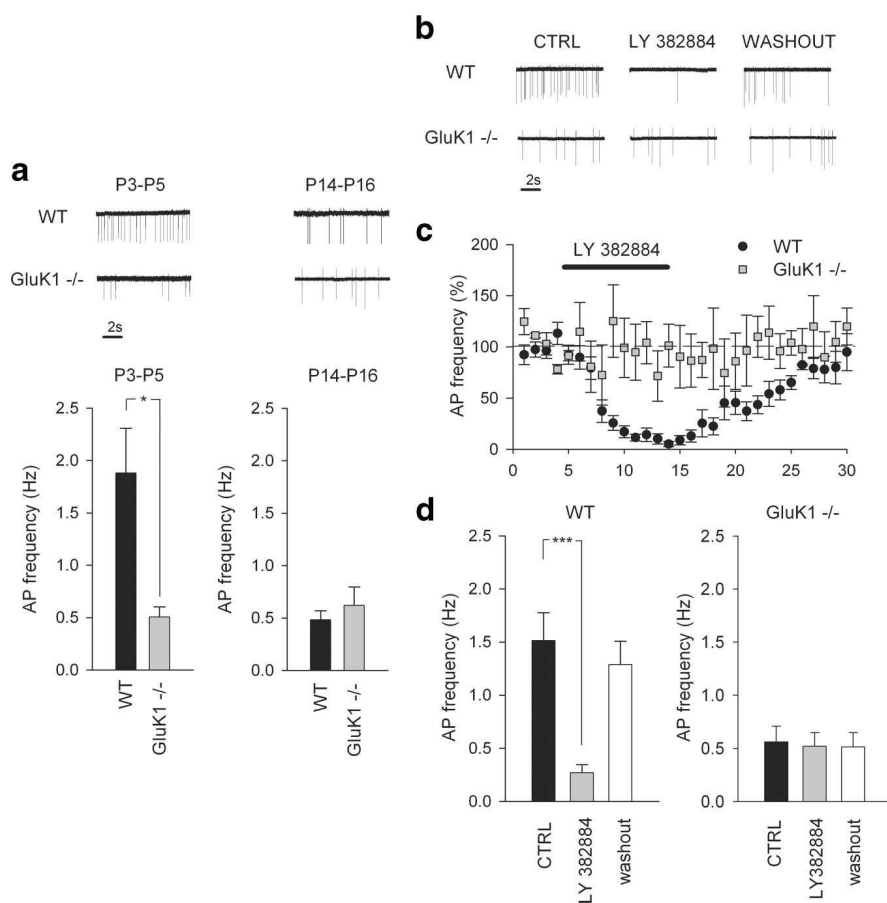


Figure 1. GluK1 KARs regulate spontaneous interneuronal firing frequency in CA3 at P3–P5 but not at P14–P16. **a**, Left, Data from on-cell recordings in interneurons show that the mean AP firing frequency of interneurons in P3–P5 GluK1^{-/-} mice ($n = 25$), was significantly lower than that of wild types ($p < 0.05$, $n = 16$). Sample traces from WT and GluK1^{-/-} mice and summary statistics for the P3–P5 data are shown. Right, Corresponding data from P14–P16 animals, showing that there was no difference in AP firing rate between WT ($n = 8$) and GluK1^{-/-} ($n = 10$) mice at this age. **b**, **c**, Sample traces (**b**) and summary plot (**c**) (black, WT; gray, GluK1^{-/-}) showing dramatic attenuation of AP firing rate in P3–P5 WT ($p = 0.0007$, $n = 10$) but not in GluK1^{-/-} mice ($n = 8$, $p = 0.65$) upon application of the GluK1 antagonist, LY 382884. **d**, Summary statistics for the effect of LY 382884 on interneuronal firing rate in WT (left) and GluK1^{-/-} mice (right). * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$.

membrane by activation of an inward current. However, recordings from interneurons in the whole-cell current-clamp configuration revealed no significant difference in the resting membrane potential between wild-type (-63 ± 2 mV, $n = 13$) and GluK1^{-/-} mice (-66 ± 1 mV, $n = 17$). Furthermore, no tonic inward current was revealed in any of the recorded interneurons upon application of LY 382884 in voltage-clamp mode (data not shown).

We next examined whether the activation of GluK1 KARs changed the excitability of CA3 interneurons as previously demonstrated for CA1 and CA3 pyramidal cells (Melyan et al., 2002; Ruiz et al., 2005). Depolarizing steps of 20–100 pA (500–1000 ms, $I = 20$ pA) were applied under the current-clamp mode to evoke a train of APs in CA3 interneurons in P3–P5 mice (Fig. 2a). We found that the firing frequency was significantly lower in GluK1^{-/-} mice compared with WT mice at all depolarizing steps ($F = 27.4$; Tukey's HSD, $p < 0.001$; $n = 40$ and 36 for GluK1^{-/-} and WT, respectively) (Fig. 2a–c). Interestingly, a distinct afterhyperpolarization was observed after the depolarizing step in GluK1^{-/-} mice but not in wild-type mice (sample recordings and data following a 80 pA depolarizing step; afterhyperpolarization amplitude 1.3 ± 1.6 mV and 6.5 ± 4.3 mV in WT and knock-out mice, respectively; $p < 0.005$) (Fig. 2b, arrow). Fur-

thermore, the interspike trajectory, analyzed between the second and third spike (40 pA step), was significantly longer in P3–P5 GluK1^{-/-} interneurons than in wild-type interneurons (45.8 ± 2.5 ms, $n = 40$ and 26.1 ± 1.6 ms, $n = 36$, respectively; $p < 0.005$) (Fig. 2c).

Consistent with the GluK1^{-/-} data, the GluK1 antagonist LY 382884 decreased the firing evoked by 20–100 pA depolarizing current steps in neonatal WT interneurons ($F = 27.4$; Tukey's HSD, $p < 0.001$; $n = 8$) (Fig. 2a–c), increased the amplitude of afterhyperpolarization (sample recordings and data following a 80 pA depolarizing step; afterhyperpolarization amplitude, $466 \pm 52\%$ of control), and prolonged the interspike trajectory from 25.6 ± 1.8 ms to 42.0 ± 6.6 ms, $p < 0.05$. At P14–P16, LY 382884 had no effect on depolarization-induced interneuronal firing (Fig. 2d–e). Together with the data on spontaneous firing rate (see Fig. 1), these data strongly suggest that the developmental attenuation of interneuronal activity is regulated by GluK1-containing KARs.

We then went on to directly test whether KARs regulate the currents responsible for the afterhyperpolarization in interneurons. Intracellular depolarizing pulses in the voltage-clamp mode (duration, 40 ms; amplitude, 60 mV; every 20 s) in CA3 interneurons at P3–P5 evoked an outward current with the characteristics of I_{mAHP} (Aoki and Baraban, 2000). Under control conditions, the outward current had an average amplitude of 103.5 ± 30.0 pA and an average duration of 167 ± 29 ms (decay time constant, 16.7 ± 3.1 ms; time to peak, 4.2 ± 0.4 ms; $n = 67$). The current was partially inhibited by apamin (100 nM, $69.12 \pm 6.7\%$ of control, $n = 5$, $p < 0.005$) suggesting a contribution by the Ca^{2+} -mediated K^{+} current previously described in adult CA3 interneurons (Fig. 3a,d) (Savic et al., 2001).

The afterhyperpolarizing K^{+} current in the neonatal interneurons was sensitive to both GluK1 KAR antagonists and agonists. Upon application of LY 382884 (10 μM), the I_{mAHP} amplitude was significantly and reversibly increased ($128 \pm 5\%$ of control, $p < 0.05$, $n = 18$) (Fig. 3b,d), while the GluK1 KAR agonist (RS)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-*tert*-butylisoxazol-4-yl) propanoic acid (ATPA; 1 μM) strongly and irreversibly decreased I_{mAHP} amplitude in most of, and, on average, all of the recorded interneurons ($58.6 \pm 12.6\%$ of control, $p < 0.005$, $n = 14$) (Fig. 3c,d). Moreover, ATPA had no effect on the I_{mAHP} in GluK1^{-/-} mice ($94.25 \pm 12.96\%$ of control, not significant, $n = 7$). No apparent correlation between the pharmacological sensitivity and the membrane properties or morphology of the interneurons was detected (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). The effect of apamin on the I_{mAHP} was fully occluded in the presence of ATPA ($99.45 \pm 3.70\%$, $n = 5$) (Fig. 3d) and, conversely, ATPA had no effect on I_{mAHP} amplitude in the presence of apamin ($96.5 \pm 5.3\%$, $n = 4$). Fur-

thermore, after application of LY 382884, apamin decreased the I_{mAHP} amplitude to $44.1 \pm 4.0\%$ ($n = 4$, $p < 0.01$), the effect thus being bigger than under control conditions ($69.1 \pm 6.7\%$, $p < 0.05$). These data confirm that the GluK1 selective pharmacological agents indeed modulated the apamin-sensitive current in the neonatal CA3 interneurons (Fig. 3*d*). Interestingly, irreversible effects of ATPA on GluR5/GluK1-linked neuronal function have been reported previously (Li et al., 2001; Sallert et al. 2007) (Fig. 3*c*). This may be some kind of long-term plasticity induced by strong activation of GluK1-containing KARs (Sallert et al. 2007), but the exact nature of this phenomenon is still unclear.

Developmental regulation of KAR-dependent tonic modulation of I_{mAHP}

The effects of GluK1-containing KARs on interneuron excitability were strongly downregulated during maturation of the circuitry. Therefore, we next tested whether I_{mAHP} and/or its modulation by KAR was also developmentally regulated. Interestingly, the mean amplitude of the apamin-sensitive I_{mAHP} in P14–P16 interneurons was found to be bigger than that at P3–P5 (88.1 ± 14.8 pA, $n = 8$ and 37.3 ± 4.7 pA, $n = 7$, respectively; $p < 0.05$) (Fig. 3*e*).

Neither ATPA nor LY 382884 had any effect on the I_{mAHP} amplitude in P14–P16 mice (100 ± 5 and $94 \pm 3\%$ of control, respectively, $n = 4$), while apamin still attenuated the current ($50 \pm 10\%$ of control, $p < 0.005$, $n = 4$) at this developmental stage (Fig. 3*f,g*). These developmental changes might be caused by an overall decrease in GluK1-containing KARs expressed in interneurons. However, a prominent inward current of similar amplitude was seen in response to ATPA application in interneurons at both P3–P5 and P14–P16 (43 ± 5 and 45 ± 5 pA, respectively). Thus, GluK1-containing KARs are expressed and depolarize interneurons at both developmental stages. Since the GluK1-dependent regulation of I_{mAHP} was lost during maturation, albeit with a conserved ionotropic function, it is unlikely that the ionotropic depolarizing action of KARs has a role in the regulation of I_{mAHP} .

Mechanism for the KAR-dependent tonic modulation of I_{mAHP}

The afterhyperpolarizing K^+ currents can be modulated by NE, 5-HT, DA, ACh, metabotropic glutamate, and cannabinoid receptors (Vogalis et al., 2001; Sah and Faber, 2002). Thus, KARs could modulate the I_{mAHP} indirectly by activating release of these transmitters in the hippocampus. To test this possibility, we used a cocktail of antagonists to block AMPA, NMDA, GABA_A, GABA_B, and metabotropic glutamate receptors as well as nor-adrenalin, serotonin, dopamine, acetylcholine, and cannabinoid receptors (see Materials and Methods).

In the presence of these antagonists ATPA still decreased the I_{mAHP} amplitude in P3–P5 interneurons to $73.8 \pm 4.4\%$ ($n = 6$,

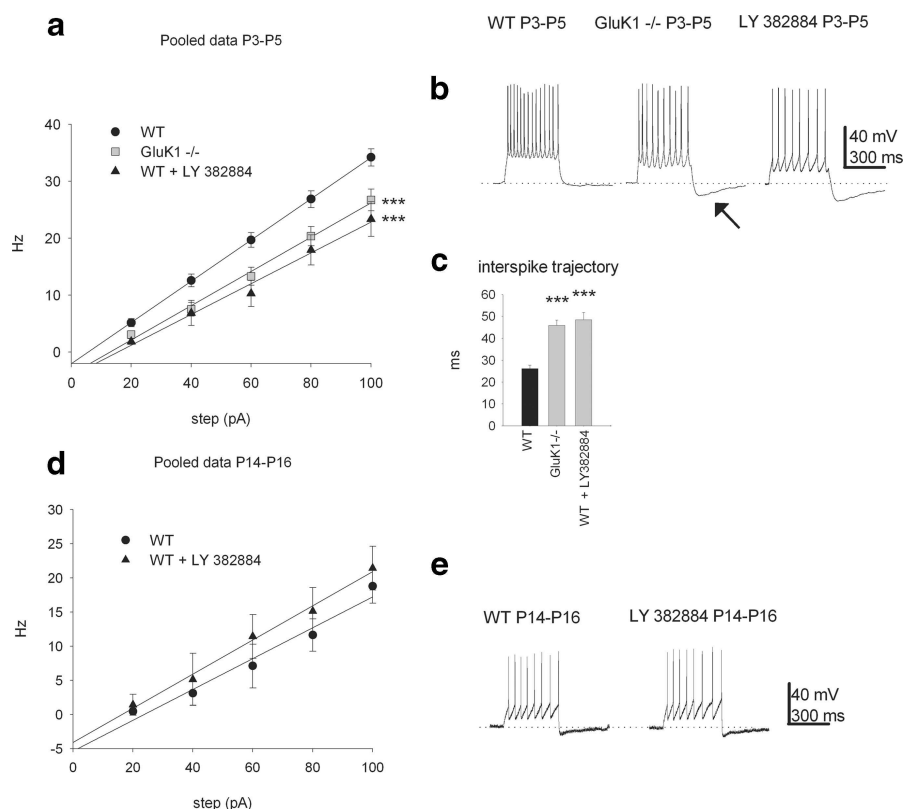


Figure 2. KARs regulate interneuronal excitability and mAHP at P3–P5. **a**, Pooled data from current-clamp experiments showing the firing of P3–P5 interneurons at depolarizing steps of varying amplitude (500–1000 ms, $\Delta I = 20$ pA). In WT (black circles, $n = 36$), the firing is attenuated by the GluK1 antagonist LY 382884 (black triangles, $n = 8$). In GluK1^{-/-} mice the firing is significantly lower compared with WT (gray squares with solid line, $n = 40$). **b**, Representative traces from current-clamp experiments showing firing in WT, GluK1^{-/-}, and WT + LY 382884 interneurons at a 80 pA/500 ms depolarizing step. Note the prominent afterhyperpolarization in GluK1^{-/-}. **c**, Summary statistics for the interspike trajectory. **d**, Pooled data from current-clamp experiments showing the firing of P14–P16 interneurons at depolarizing steps of varying amplitude (500–1000 ms, $\Delta I = 20$ pA). There are no significant differences between the firing rates in WT (black circles, $n = 5$) and WT + LY 382884 mice (black triangles, $n = 7$). **e**, Representative traces from current-clamp experiments showing firing in WT and WT + LY 382884 interneurons at a 80 pA/500 ms depolarizing step. *** $p < 0.001$.

$p < 0.05$) (Fig. 4*a*). Finally, in the presence of TTX ($1 \mu\text{M}$) ATPA still decreased the mAHP amplitude to $59.4 \pm 13\%$ of control, $p < 0.05$, $n = 5$. These data strongly suggest that KARs do not modulate the function of apamin-sensitive K^+ current in the neonatal CA3 interneurons through the release of a neuromodulatory substance, but rather act directly.

Ambient levels of extracellular glutamate have been previously shown to activate KARs in the immature hippocampus (Lauri et al., 2005). To test whether ambient glutamate could account for the tonic downregulation of I_{mAHP} in the neonatal hippocampal interneurons, we used an enzymatic glutamate scavenger (GPT plus pyruvate) to decrease the extracellular glutamate concentration (Lauri et al., 2005). The efficacy of the scavenger to decrease the extracellular glutamate concentration was verified by HPLC analysis of the artificial CSF (ACSF). The enzymatic treatment reduced the ACSF glutamate concentration to $9.1 \pm 2\%$ of control ($p < 0.005$, $n = 12$). To isolate the effect from the activity of other glutamate receptors, we also added antagonists for mGluRs and AMPA and NMDA receptors (LY 341495, $100 \mu\text{M}$; GYKI 53655, $50 \mu\text{M}$; and AP-5, $100 \mu\text{M}$, respectively). We found that the I_{mAHP} is highly sensitive to a decrease in the extracellular glutamate concentration at P3–P5. The scavenger caused a significant increase in the I_{mAHP} amplitude ($141.7 \pm 12.9\%$, $p < 0.01$, $n = 6$) that was very similar to that seen in response to application of a GluK1 antagonist (Fig. 4*b*). Also,

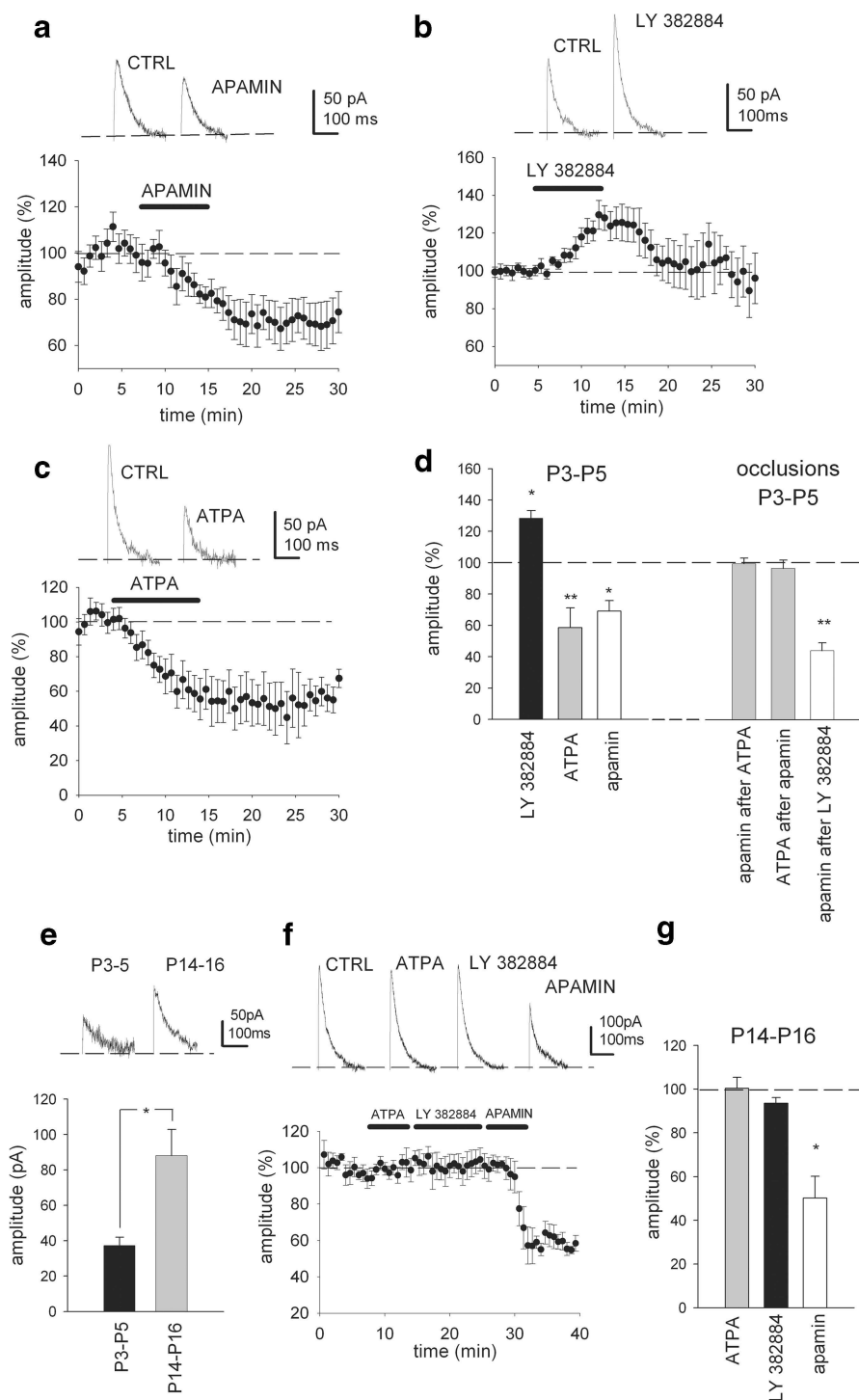


Figure 3. Tonic activity of KAR downregulates apamin-sensitive component of I_{mAHP} at P3–P5 but not at P14–P16. **a**, Whole-cell voltage-clamp data showing sample I_{mAHP} traces before and after wash-in of apamin and summary plot for the effect of apamin on the afterhyperpolarizing current in P3–P5 interneurons ($n = 5$, $p < 0.005$). **b**, Representative traces and summary plot for the effect of LY 382884 on the afterhyperpolarizing current at P3–P5 ($n = 18$, $p < 0.005$). **c**, Example traces and pooled data showing that ATPA decreases the I_{mAHP} in P3–P5 interneurons ($n = 14$, $p < 0.005$). **d**, Summary data showing the combined effects of LY 382884, ATPA, and apamin on the I_{mAHP} in P3–P5 interneurons. Note that the effect of apamin on the I_{mAHP} is bigger after application of LY 382884 and that the effects of ATPA and apamin are mutually occlusive (ATPA + apamin, $n = 5$; apamin + ATPA, $n = 4$; LY 382884 + apamin, $n = 4$). **e**, Pooled data showing the developmental regulation of the apamin-sensitive component of the I_{mAHP} (P3–P5, $n = 8$; P14–P16, $n = 7$; $p < 0.05$). Data and traces have been obtained by subtracting the I_{mAHP} in the presence of apamin from control current before application of the drug. **f**, Data showing that in young adult mice (P14–P16) neither GluK1 agonist ATPA nor the antagonist LY 382884 affects the I_{mAHP} amplitude, while apamin still strongly depresses the current ($n = 4$; $p < 0.005$). **g**, Summary data showing the effects of LY 382884, ATPA, and apamin on the I_{mAHP} in P14–P16 interneurons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

application of the glutamate scavenger fully occluded the effect of the GluK1 antagonist LY 382884 on the I_{mAHP} (Fig. 4b) but had no effect on I_{mAHP} in P14–P16 mice ($94 \pm 8\%$, $n = 5$) (Fig. 4c). Finally, the glutamate scavenger had no effect on the I_{mAHP} amplitude in P3–P5 GluK1^{−/−} mice (current amplitude $102.8 \pm 8.8\%$ of control, not significant, $n = 9$). These results strongly suggest that ambient glutamate at P3–P5 is involved in the tonic regulation of the I_{mAHP} .

To test whether the signaling between GluK1 KARs and K^+ channels is G-protein dependent, we used GDP β S (0.3 mM) in the patch-pipette filling solution. We found that intracellular perfusion of GDP β S was associated with a strong increase in the I_{mAHP} amplitude in the neonate ($165.3 \pm 24.1\%$ of control, $p < 0.005$, $n = 4$) (Fig. 4d). Interestingly, application of ATPA in the presence of GDP β S had no further effect on the I_{mAHP} ($166.9 \pm 13.4\%$ of control, $n = 4$) (Fig. 4d), although the inward current was still present (47 ± 7 pA). The finding thus suggests that KARs regulate I_{mAHP} via a G-protein-dependent mechanism. We found that application of apamin in the presence of GDP β S resulted in an attenuation of the I_{mAHP} , its effect being bigger in the absence of tonic inhibition (37.8 ± 6.7 vs $69.1 \pm 6.7\%$, $p < 0.005$). However, if the neurons were exposed to apamin before they were perfused with GDP β S, no change in the I_{mAHP} amplitude was seen ($99.0 \pm 3.7\%$, $n = 4$) (data not shown). In contrast to the neonates, in P14–P16 mice GDP β S caused a slight but nonsignificant decrease in the I_{mAHP} amplitude ($78.5 \pm 12\%$ of control, $n = 5$) indicating a developmental switch in the mechanisms by which G-proteins regulate the I_{mAHP} in CA3 interneurons (Fig. 4e). These results indicate that tonically active, GluK1-containing KARs depress apamin-sensitive I_{mAHP} early in development, but the coupling between GluK1-containing KARs and K^+ channels is developmentally downregulated.

PKC may be involved in the regulation of the current underlying slow AHP in pyramidal neurons (Melyan et al., 2002). To test for the possible role of PKC activation in the KAR-dependent modulation of I_{mAHP} , we included bisindolylmaleimide VIII acetate (BIS; $1 \mu\text{M}$), a selective inhibitor for PKC (Toullec et al., 1991), in the patch-pipette filling solution. However, this treatment had no detectable effect on interneuronal I_{mAHP} ($92.1 \pm 15.4\%$, $n = 9$) (Fig. 4f). Moreover, in the presence of BIS, ATPA still attenuated the I_{mAHP} to

$72.9 \pm 4.9\%$ of the control value ($p < 0.005$, $n = 6$) (Fig. 4f). These data thus demonstrate that PKC activation is not involved in the KAR-mediated inhibition of the I_{mAHP} .

I_{mAHP} regulates the physiological activity patterns in the immature hippocampus

Finally, we studied whether the endogenous modulation of I_{mAHP} participates in the regulation of the characteristic synchronous network activity seen in the neonatal but not in the adult hippocampus (Ben-Ari et al., 2004; Lauri et al., 2005). Selective inhibition of the I_{mAHP} by apamin increased the occurrence of spontaneous network bursts recorded in P3–P5 neurons to $202.1 \pm 33.9\%$ of the control frequency ($p < 0.05$, $n = 8$) (Fig. 5a). This effect was associated with an increase in the spontaneous firing frequency of interneurons ($124.1 \pm 16.3\%$ of control, $n = 8$) (Fig. 5b). Consistent with the idea of GluK1-mediated tonic inhibition of the I_{mAHP} in the neonatal interneurons, the effect of apamin on the firing frequency was more prominent in the GluK1^{-/-} mice ($190.54 \pm 10.6\%$, $p < 0.01$ compared with WT, $n = 6$) (Fig. 5b). In P14–P16, the apamin-induced increase in the firing frequency was more robust ($287.6 \pm 127.8\%$, $n = 6$ and $314.5 \pm 94.4\%$, $n = 6$ in WT and GluK1^{-/-}, respectively) (Fig. 5c), but there was no longer a difference between the genotypes. Again, the finding is fully consistent with the idea that the firing activity of neonatal WT but not GluK1^{-/-} interneurons is tonically inhibited by their strong I_{mAHP} , and that the difference between the genotypes in interneuronal firing disappears during the course of development as GluK1-mediated signaling is decoupled from the I_{mAHP} -regulating mechanism.

Discussion

Our present study provides two fundamental, novel features of interneuronal function. First, we show that the firing activity of CA3 interneurons is dramatically downregulated during early postnatal development. Both spontaneous action potential firing as well as firing in response to a depolarizing step are strongly attenuated during the first postnatal weeks. Second, we show that the developmental shift in the interneuronal output is caused by a decrease in tonic GluK1 and G-protein-dependent inhibition of the apamin-sensitive component of I_{mAHP} . This previously uncharacterized KAR mechanism strongly and tonically de-

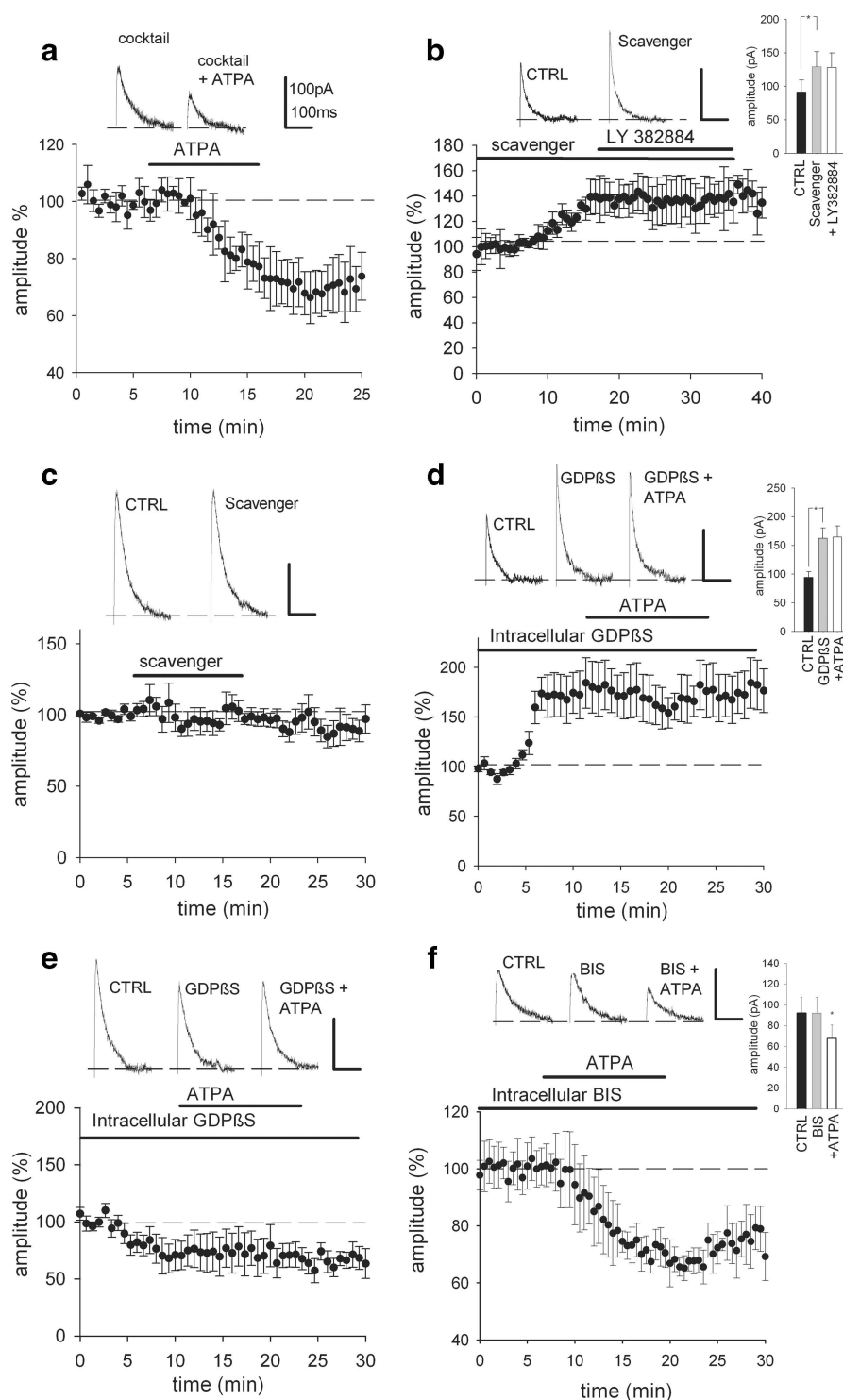


Figure 4. Mechanism for tonic regulation of the mAHP. **a**, Representative traces and summary plot for the effect of ATPA after blockade of AMPAR, NMDAR, GABA_A, metabotropic glutamate, 5-HT, NE, DA, ACh, and CB1 receptors ($n = 6$, $p < 0.05$). **b**, Representative traces and summary plot for the effect of glutamate scavenger and LY 382884 on the afterhyperpolarizing current in P3–P5 interneurons. ($n = 6$, $p < 0.01$). **c**, Representative traces and summary plot for the lack of effect of the glutamate scavenger on the afterhyperpolarizing current at P14–P16 ($n = 5$, $p > 0.05$). Recordings (**a** and **b**) were done in the presence of antagonists for AMPA, NMDA, mGlu, GABA_A, and GABA_B receptors. **d**, Example traces and pooled data from P3–P5 mice showing that inhibition of G-protein-mediated signaling by intracellular application of GDPβS accentuates I_{mAHP} ($n = 4$, $p < 0.05$). GDPβS occludes the effect of ATPA on the afterhyperpolarizing current. **e**, Sample traces and summary statistics demonstrating the lack of effect of GDPβS and ATPA on I_{mAHP} in P14–P16 mice ($n = 5$). **f**, Representative traces and summary plot for the lack of effect of PKC inhibitor BIS on the afterhyperpolarizing current in P3–P5 interneurons ($n = 9$) and the effect of ATPA after BIS ($p < 0.05$, $n = 6$).

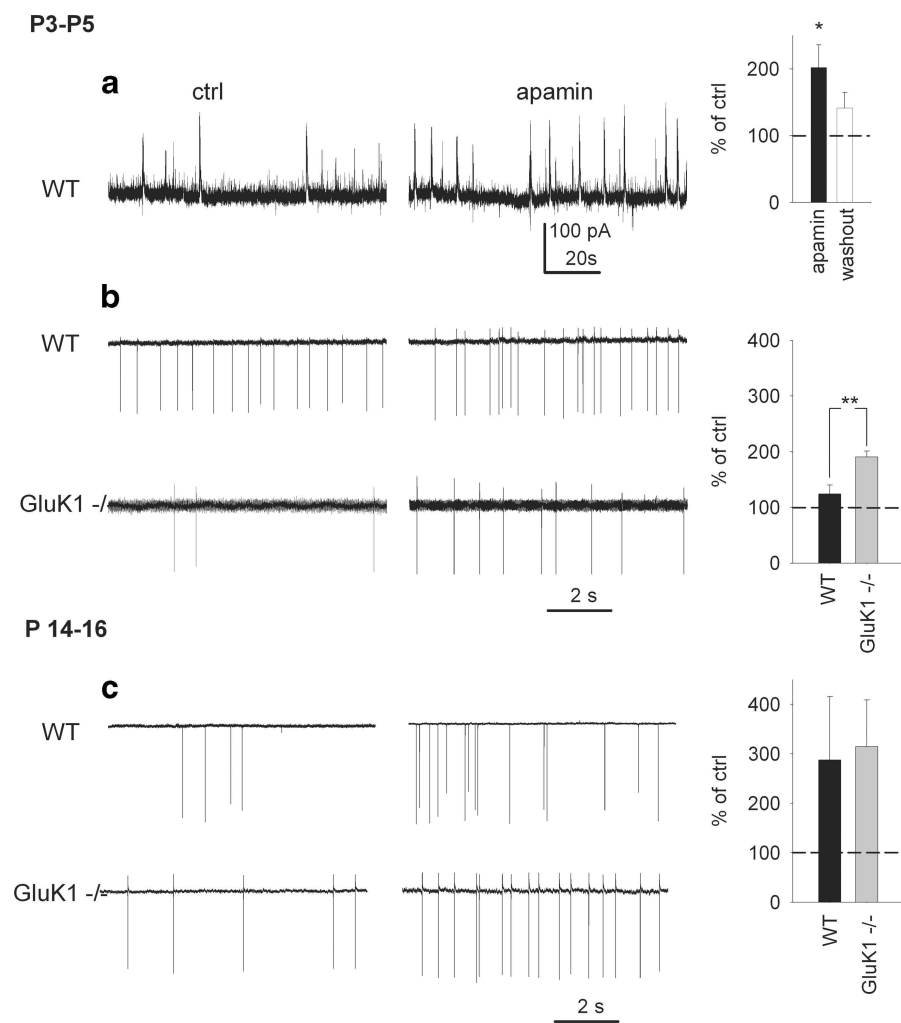


Figure 5. The effect of apamin on network activity and interneuronal firing. **a**, Sample traces and summary plot of whole-cell current-clamp recordings showing that apamin increases the occurrence of synchronous network bursts recorded in P3–P5 interneurons ($p < 0.05$, $n = 8$). **b**, Data from on-cell recordings in P3–P5 interneurons showing the effect of apamin on spontaneous AP firing frequency in WT ($n = 8$) and GluK1^{−/−} mice ($n = 6$). Summary graph on the right shows that the effect of apamin on mean firing frequency was significantly ($p < 0.01$) bigger in GluK1^{−/−} interneurons. **c**, Data from on-cell recordings in P14–P16 interneurons, showing the effect of apamin on spontaneous AP firing frequency in WT ($n = 6$) and GluK1^{−/−} mice ($n = 6$). Summary graph on the right shows the effect of apamin on mean firing frequency.

presses the apamin-sensitive K⁺ current, allowing high firing rates in the neonatal interneurons. The relief of this inhibitory mechanism explains the attenuation of action potential firing during the course of development caused by the emergence of a prominent I_{mAHP}. Moreover, this mechanism likely contributes to the developmental erosion of the spontaneous network bursts involved in the maturation of hippocampal synaptic circuitry (Lauri et al., 2003, 2005; Ben-Ari et al., 2004).

The interneuronal current mediating the mAHP in the newborn interneurons had the electrophysiological and pharmacological characteristics previously reported in the adult CA3 interneurons (Savic et al., 2001). Several neurotransmitter systems, including NE, 5-HT, DA, ACh, and glutamate receptors (Vogalis et al., 2001; Sah and Faber, 2002; Ruiz et al., 2005) have been shown to modulate the afterhyperpolarizing K⁺ currents in other cell types. However, to the best of our knowledge, endogenous modulation of the apamin-sensitive interneuronal I_{mAHP} has not been described previously. In particular, the results from the experiments using the GluK1 antagonist or the glutamate scavenger strongly argue that interneuronal KARs in the new-

born CA3 are continuously activated by endogenous glutamate and that under physiological conditions they exert an inhibitory action on I_{mAHP}. The amplitude of the I_{mAHP} increased from P3 to P14. In parallel, the sensitivity of I_{mAHP} to the KAR antagonist and agonist was lost, although functional GluK1 receptors were expressed in the interneurons also at this developmental stage. These GluRs mediate the conventional, pharmacologically induced ionotropic effect of GluK1 activation at P14. This ionotropic effect is responsible for the GluK1 activation-induced depolarization. We want to emphasize that this nondevelopmentally regulated effect is only seen in response to pharmacological activation, e.g., by ATPA, which is a strong agonist on GluK1-Rs. Thus, during the course of development, the KAR-mediated signaling is decoupled from the I_{mAHP}-regulating mechanism.

Activation of KARs can induce both ionotropic and metabotropic actions in the target neurons (Rodríguez-Moreno and Lerma, 1998; Melyan et al., 2002; Rozas et al., 2003; Lauri et al., 2005). In particular, G-protein-dependent mechanisms have been shown to regulate AHPs and action potential firing in pyramidal cells (Melyan et al., 2002, 2004; Ruiz et al., 2005). In the adult hippocampal pyramidal neurons, slow afterhyperpolarization (sAHP) and mAHP currents (I_{sAHP} and I_{mAHP}, respectively) can be suppressed by activation of GluK2 (formerly known as GluR6), but not by GluK1-containing KARs; this results in a prominent increase in the action potential firing frequency (Fisahn et al., 2005). Furthermore, endogenous activation of KARs by glutamate can inhibit the I_{sAHP} in pyramidal neurons

in a G-protein-dependent manner, yet this requires the presence of the high-affinity GluK5 subunit (Ruiz et al., 2005). GluK5 subunits could coassemble with GluK1 in interneurons. However, we found no difference in the firing frequency of interneurons between the WT and GluK5^{−/−} mice. It thus appears that the metabotropic regulation of K⁺ channels in the neonatal interneurons relies on GluK1, as it does for Ca²⁺ channels in dorsal root ganglion cells (Rozas et al., 2003). The molecular mechanisms for the metabotropic coupling between GluK1 and K⁺ channels, as well as its developmental uncoupling, remain to be understood.

Our findings that inhibition of G-protein-dependent signaling postsynaptically reproduces the effect of the GluK1 KAR antagonist on I_{mAHP}, fully occludes the effect of the KAR agonist, and has no effect on I_{mAHP} at P14 reveal a novel type of metabotropic, developmentally regulated, KAR-dependent mechanism. We have described a similar KAR-dependent mechanism that inhibits glutamate release in the newborn CA3–CA1 pyramidal cell synapses (Lauri et al., 2005, 2006). The mechanism is GluK1 KAR dependent, tonically active, G-protein dependent, and

erodes by the end of the second postnatal week, thus bearing intriguing phenomenological similarity to the mechanism characterized here. Thus, it appears that metabotropic signaling induced by endogenous activation of GluK1 KARs is intimately involved in the presynaptic, postsynaptic, and interneuronal development of hippocampal circuitry. We have previously shown that the presynaptic GluK1 KAR is involved in the regulation of early network activity in the hippocampus. KARs regulate glutamate release at both pyramidal cell and interneuronal synapses (Lauri et al. 2005). By virtue of this, KARs can set the level of excitation in these neurons, thus modulating the behavior of the hippocampal network. Here, we were particularly interested in how KAR modulation of interneuronal excitability contributes to the spontaneous hippocampal network bursts or giant depolarizing potentials. Direct inhibition of the $I_{m\text{AHP}}$ current by apamin provided a clear demonstration for the idea that the mechanism described here can critically contribute to the genesis and synchronization of early hippocampal network activities.

Although not addressed in this study, it is interesting to speculate whether the developmental change in the GluK1-mediated regulation of interneuronal firing pattern is also activity dependent, as is the case for the presynaptic mechanism regulating glutamate release and short-term plasticity in CA3-CA1 (Lauri et al., 2006; Sallert et al. 2009). Interestingly, it has been shown in the developing thalamocortex that long-term potentiation induction results in an increase in the timing precision of evoked action potentials in pyramidal neurons; this was suggested to be an important developmental mechanism for improving cortical information processing (Daw et al., 2006). Since interneurons are the key players in setting the temporal coherence critical for synaptic plasticity and neuronal network oscillations, a mechanism that could switch the interneuronal firing pattern from “newborn” to “adult” type would have a privileged role in the activity-dependent maturation of the brain. There are several reports demonstrating the critical role of early hippocampal network bursts in guiding synaptic maturation (Lauri et al., 2003; Huupponen et al., 2007) and the instrumental role of interneurons in synchronizing this activity (Lamsa et al. 2000; Palva et al., 2000; Ben-Ari et al. 2004). Thus, our findings disclose a critical endogenous mechanism controlling the level of interneuronal output during development that can be of vital importance in the development of functional synaptic circuits in the hippocampus.

References

- Aoki T, Baraban SC (2000) Properties of a calcium-activated K^{+} current on interneurons in the developing rat hippocampus. *J Neurophysiol* 83:3453–3461.
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Represa A, Gozlan H (2004) Interneurons set the tune of developing networks. *Trends Neurosci* 27:422–427.
- Daw MI, Bannister NV, Isaac JT (2006) Rapid, activity-dependent plasticity in timing precision in neonatal barrel cortex. *J Neurosci* 26:4178–4187.
- Fernández de Sevilla D, Garduño J, Galván E, Buño W (2006) Calcium-activated afterhyperpolarizations regulate synchronization and timing of epileptiform bursts in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 96:3028–3041.
- Fisahn A, Heinemann SF, McBain CJ (2005) The kainate receptor subunit GluR6 mediates metabotropic regulation of the slow and medium AHP currents in mouse hippocampal neurons. *J Physiol* 562:199–203.
- Huupponen J, Molchanova S, Taira T, Lauri SE (2007) Susceptibility for homeostatic plasticity is downregulated in parallel with maturation of the hippocampal synaptic circuitry. *J Physiol* 581:2505–514.
- Lamsa K, Palva M, Ruusuvuori E, Kaila K, Taira T (2000) Synaptic GABAA activation inhibits AMPA/kainate receptor-mediated bursting in the newborn (P0–P2) rat hippocampus. *J Neurophysiol* 83:359–366.
- Lauri SE, Lamsa K, Pavlov I, Riekkki R, Johnston B, Molnar E, Rauvala H, Taira T (2003) Activity blockade induces formation of functional synapses in the newborn rat hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 22:107–117.
- Lauri SE, Segerstråle M, Vesikansa A, Maingret F, Mulle C, Collingridge GL, Isaac JTR, Taira T (2005) Endogenous activation of kainate receptors regulate glutamate release and network activity in the developing hippocampus. *J Neurosci* 25:4473–4484.
- Lauri SE, Vesikansa A, Segerstråle M, Collingridge GL, Isaac JTR, Taira T (2006) Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. *Neuron* 50:415–429.
- Li H, Chen A, Xing G, Wei M-L, Rogawski MA (2001) Kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation in the amygdala. *Nat Neurosci* 4:612–620.
- McBain CJ, Fisahn A (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2:11–23.
- Melyan Z, Wheal HV, Lancaster B (2002) Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of $I_{s\text{AHP}}$ and excitability in pyramidal cells. *Neuron* 34:107–114.
- Melyan Z, Wheal HV, Lancaster B (2004) Metabotropic regulation of intrinsic excitability by synaptic activation of kainate receptors. *J Neurosci* 24:4530–4534.
- Mulle C, Sailer A, Swanson GT, Brana C, O’Gorman S, Bettler B, Heinemann SF (2000) Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* 28:475–484.
- Palva M, Lamsa K, Lauri SE, Rauvala H, Kaila K, Taira T (2000) Fast network oscillations in the newborn rat hippocampus in vitro. *J Neurosci* 20:1170–1178.
- Rodríguez-Moreno A, Lerma J (1998) Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron* 20:1211–1218.
- Rozas TL, Paternain AV, Lerma J (2003) Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors. *Neuron* 39:543–553.
- Ruiz A, Sachidhanandam S, Utvik JK, Coussen F, Mulle C (2005) Distinct subunits in heteromeric kainate receptors mediate ionotropic and metabotropic function at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 25:11710–11718.
- Sah P (1996) Ca^{2+} -activated K^{+} currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 19:150–154.
- Sah P, Faber ES (2002) Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol* 66:345–353.
- Sallert M, Malkki H, Segerstråle M, Taira T, Lauri SE (2007) Effects of the kainate receptor agonist ATPA on glutamatergic synaptic transmission and plasticity during early postnatal development. *Neuropharmacology* 52:1354–1365.
- Sallert M, Rantamäki T, Vesikansa A, Anthoni H, Harju K, Yli-Kauhaluoma J, Taira T, Castren E, Lauri SE (2009) Brain-derived neurotrophic factor controls activity-dependent maturation of CA1 synapses by down-regulating tonic activation of presynaptic kainate receptors. *J Neurosci* 29:11294–11303.
- Savic N, Pedarzani P, Sciancalepore M (2001) Medium afterhyperpolarization and firing pattern modulation in interneurons of stratum radiatum in the CA3 hippocampal region. *J Neurophysiol* 85:1986–1997.
- Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovsky J (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266:15771–15781.
- Vogalis F, Furness JB, Kunze WAA (2001) Afterhyperpolarization current in myenteric neurons of the guinea pig duodenum. *J Neurophysiol* 85:1941–1951.
- Zhang L, McBain CJ (1995) Potassium conductances underlying repolarization and after-hyperpolarization in rat CA1 hippocampal interneurons. *J Physiol* 488:661–672.

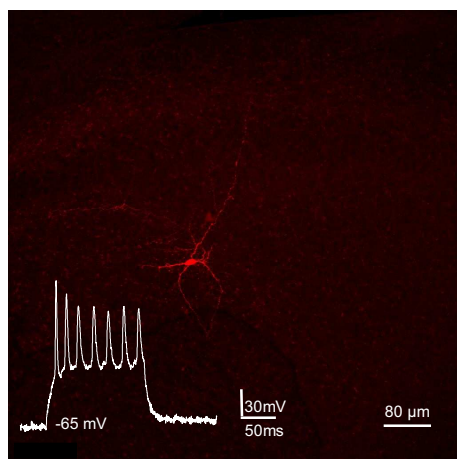
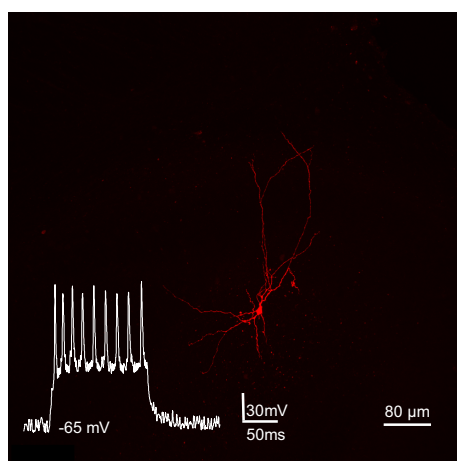
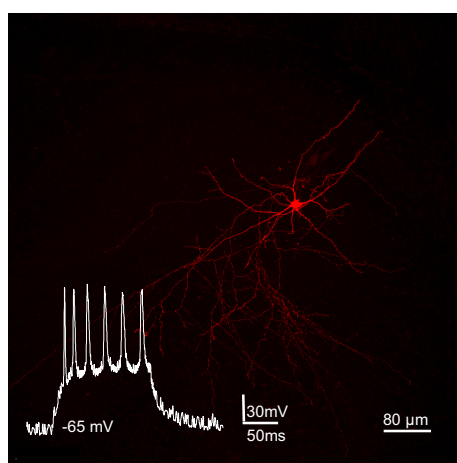
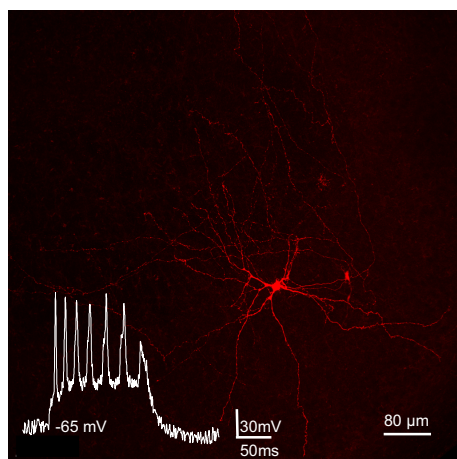
Supplementary data

The data shows that the effectiveness of the GluK1 antagonist LY382884 on interneuronal $I_{m\text{AHP}}$ is not dependent on the electrical properties of the neurons

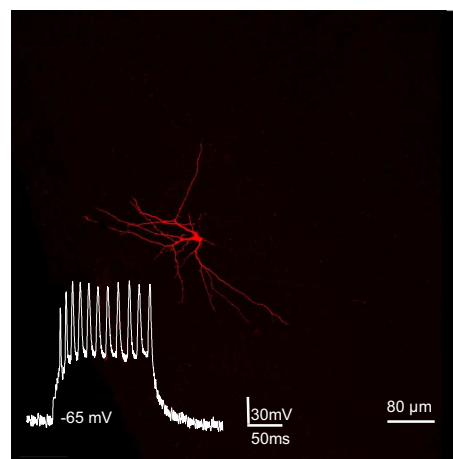
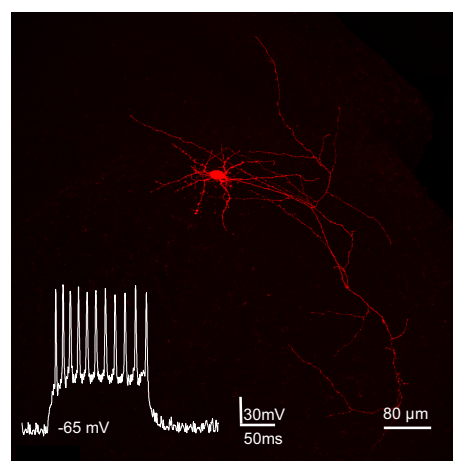
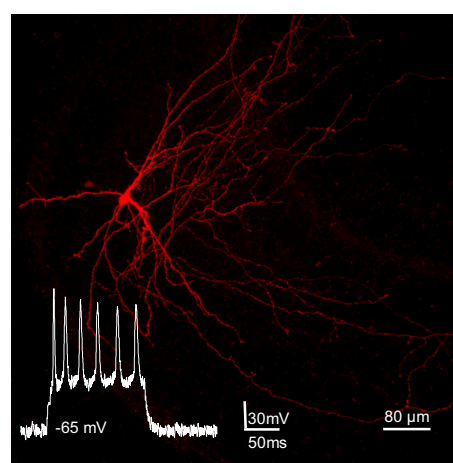
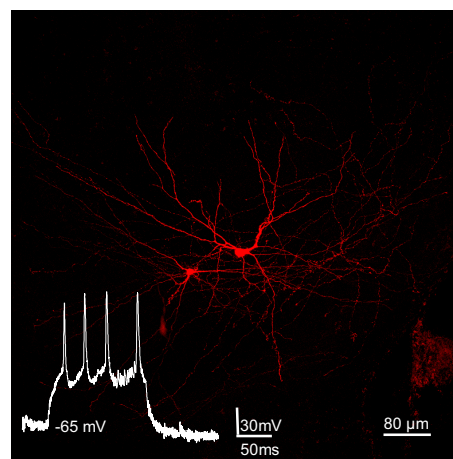
Effect of LY382884 on $I_{m\text{AHP}}$	<25% (n=4)	>25% (n=4)
input resistance	$202.79 \pm 53 \text{ M}\Omega$	$194.78 \pm 34.78 \text{ M}\Omega$
cell capacitance	$56.58 \pm 6.54 \text{ pF}$	$65.83 \pm 10.56 \text{ pF}$
spike width	$1.79 \pm 0.07 \text{ ms}$	$1.76 \pm 0.13 \text{ ms}$
Spike frequency (80 pA step)	$17.6 \pm 1.94 \text{ Hz}$	$15.6 \pm 2.04 \text{ Hz}$
Instantaneous frequency	$98.01 \pm 8.86 \text{ Hz}$	$94.13 \pm 6.36 \text{ Hz}$

Below: Sample images and voltage traces from neurons classified on the basis of the effect of the GluK1 antagonist LY382884 on $I_{m\text{AHP}}$ (see the methods for details in voltage-clamp recordings). For current clamp recordings a bias current was (when needed) injected to obtain a membrane potential of -65 mV. A depolarizing step (125ms, 80pA) was injected to elicit spiking. Input resistance and cell capacitance were obtained by injecting a test pulse (2mV). Spike half-width was defined as a spike's duration at half-spike amplitude, measured from threshold voltage.

Effect of LY382884 on I_{mAHP}
<25%



Effect of LY382884 on I_{mAHP}
>25%



ANNEXE 2

“Role of postsynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses”

Pinheiro P., Lanore F., Veran J., Blanchet B., Perrais D. and Mulle C.

Submitted

Journal section: cellular/molecular

Role of Postsynaptic Kainate Receptors at Hippocampal Mossy Fiber Synapses

Abbreviated title: Antagonism of postsynaptic KARs at mf-CA3 synapses

Paulo S. Pinheiro¹, Frédéric Lanore, Julien Veran, Christophe Blanchet, David Perrais, Christophe Mulle[#]

Laboratoire "Physiologie Cellulaire de la Synapse", CNRS, Bordeaux Neuroscience Institute, University of Bordeaux, 33077 Bordeaux Cedex, France.

¹current address: Department of Neuroscience and Pharmacology, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, 2200 Copenhagen N, Denmark.

[#] to whom correspondence should be addressed

Phone: + 33 5 57 57 40 86; Fax: + 33 5 57 57 40 82;

e-mail: mulle@u-bordeaux2.fr

Number of figures: 4

Supplemental material: supplemental text; 4 figures

Number of pages: 16

Total number of words: 4500

Keywords (6): synapse, kainate receptors, hippocampus, mossy fiber, synaptic integration, short-term plasticity

This study was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Fondation pour la Recherche Médicale, the Conseil Régional d'Aquitaine and the European Commission (EUSynapse Project, contract no. LSHM-CT-2005-019055).

ABSTRACT

Progress in understanding the roles of kainate receptors (KARs) in synaptic integration, synaptic networks and higher brain function has lagged behind other glutamate receptors mainly due to the lack of specific pharmacological tools. We identified UBP310 as a selective antagonist of recombinant GluK2/GluK5 receptors, probably the major population of KARs in the brain. We show that UBP310 blocks postsynaptic KARs at hippocampal mossy fiber (mf)-CA3 synapses, sparing AMPA and NMDA receptors. UBP310 significantly reduces the sustained depolarization during repetitive activity and impacts heterosynaptically mediated spike transmission. Our results support a role for postsynaptic KARs in synaptic integration and additionally argue against their apparent implication in the regulation of presynaptic facilitation.

INTRODUCTION

Kainate receptors (KARs) are ionotropic glutamate receptors composed of tetrameric assemblies of GluK1-5 subunits (Lerma, 2006; Pinheiro and Mulle, 2006). GluK2 and GluK5 are thought to compose postsynaptic KARs at mossy fiber to CA3 pyramidal cell synapses (mf-CA3; Contractor et al., 2003; Mulle et al., 1998), where they contribute with small amplitude, slowly decaying currents (Castillo et al., 1997; Vignes and Collingridge, 1997). Despite their small amplitude, KAR-EPSCs were proposed to be important for the integration of information because they temporally summate (Frerking and Oligo-Frerking, 2002). In addition, postsynaptic KARs are implicated in the modulation of a slow Ca^{2+} -activated K^+ current (Fisahn et al., 2005; Ruiz et al., 2005) which is abolished by genetically removing GluK5 (Ruiz et al., 2005; but see Fernandes et al., 2010). KARs are also localized presynaptically where they modulation glutamate release and greatly influence the plasticity of mf-CA3 synapses (Contractor et al., 2001; Lauri et al., 2001; Pinheiro et al., 2007; Sachidhanandam et al., 2009; Schmitz et al., 2001). This view has, however, been challenged; a recent study attributed KAR-dependent presynaptic facilitation to postsynaptic KARs driving CA3 pyramidal cell spiking, hence generating polysynaptic activity that would contribute to short-term plasticity (Kwon and Castillo, 2008). Although no consensus exists about the subunit composition of presynaptic KARs at mf-CA3 synapses, such notion contradicts the general acceptance of their existence (Pinheiro and Mulle, 2008) and requires re-examination.

The lack of selective pharmacological tools hampers clarifying the physiological relevance of postsynaptic KARs at mf-CA3 synapses. Recently, an intense effort was made to synthesize and characterize subunit-selective KAR antagonists, mainly against GluK1 (Jane et al., 2009). However, no selective antagonist of GluK2/GluK5 KARs yet exists, although they may represent a major population of KARs in the brain (Wenthold et al., 1994). In search for antagonists of KARs at mf-CA3 synapses, we re-evaluated the efficacy of willardiine derivatives (Jane et al., 2009) on native and recombinant KARs. UBP310 was originally developed as a GluK1-selective antagonist (Dolman et al., 2007) and later found to also potentially antagonize GluK3 (Perrais et al., 2009). Unexpectedly, we identified UBP310 as a potent antagonist of postsynaptic KARs at mf-CA3 synapses that spares AMPARs and NMDARs. Using this tool, we directly investigated the implication of KARs in synaptic transmission, integration and short-term plasticity.

MATERIALS AND METHODS

CA3 pyramidal cells were recorded from parasagittal brain slices of 14-21 days old C57BL/6 wildtype and GluK1 and GluK3 knockout mice in whole-cell voltage-clamp (3.5-4.5 M Ω electrodes, -70 mV holding potential) at room temperature. Slices were perfused with ACSF containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2.3 CaCl₂, 1.3 MgCl₂ and 25 glucose, saturated with 95% O₂/5% CO₂ and supplemented with bicuculline (10 μ M) and CGP55845 (1 μ M). The intracellular solution contained (in mM): 140 Cs-methanesulfonate, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 2 NaCl and 4 Na₂ATP, pH 7.3. Current-clamp recordings were made at 33°C with a solution containing (in mM): 120 K-gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 2 Na₂ATP and 0.2 Na₂GTP, pH 7.3. Mf-EPSCs/EPSPs were elicited by randomly poking the dentate hilus with a patch pipette filled with extracellular solution until synaptic responses with the characteristic features of MFs were found. The intensity of stimulation was then reduced to reach minimal stimulation conditions. The A/C pathway was stimulated with a concentric bipolar electrode placed in the stratum radiatum. Data were filtered at 2.9 KHz and digitized at 10 KHz. Series resistance was monitored throughout and recordings were discarded if it varied by >20%. Current clamp recordings were discarded if membrane resistance varied by >10%.

Recombinant receptors were recorded from HEK293 cells as described previously (Pineiro et al., 2007). Cells were co-transfected either with GluK2a and GFP (cDNA ratio of 2:1) or GluK2a, GluK5 and GFP (cDNA ratio of 1:3:2). Glutamate was applied every 20 s with a fast piezoelectric translator (Polytec PI) and UBP310 was present in control and agonist lines.

Results are presented as mean $\pm$ SEM. Groups were compared using the paired or unpaired two-tailed *t*-test, as appropriate, unless stated otherwise.

RESULTS

UBP willardiine derivatives block MF KAR-EPSCs

When studying the effects of UBP310 at mf-CA3 synapses (Perrais et al., 2009) we noticed that the slow KAR-mediated tail current, readily observed on mf-EPSCs, was abolished (see Fig 3A, B). Therefore we investigated the effects of UBP310 on pharmacologically isolated KAR-EPSCs at mf-CA3 synapses (in 50 μ M D-AP5 to block NMDA receptors and 25 μ M LY303070 to block AMPA receptors). We found that UBP310 dose-dependently blocked KAR-EPSCs with an *IC*₅₀ of ~250 nM (Fig 1A, B). The effect of UBP310 could be mediated through an action on GluK1 or GluK3 KARs that are sensitive to this compound (Dolman et al., 2007; Perrais et al., 2009). Although mouse CA3 pyramidal cells express neither GluK3 nor detectable amounts of GluK1 mRNA after postnatal day 6 (Bureau et al., 1999), we tested UBP310 in subunit-specific knockout mice. We found that

UBP310 (3 μ M, which blocks KAR-EPSCs in wildtype mice) was equally effective in GluK1- and GluK3-deficient mice (Fig 1B). We also found that UBP302 and UBP316 (2 μ M) significantly inhibited isolated KAR-EPSCs with an order of potency UBP302 < UBP316 < UBP310 (Fig 1C). Importantly, UBP310 fully spared AMPA-EPSCs (Perrais et al., 2009) and NMDA-EPSCs (Supplemental Fig. 1).

UBP310 is a GluK2/GluK5 antagonist

Our finding that UBP310 was efficient in blocking native KARs at mf-CA3 synapses, which do not contain GluK1 or GluK3, was rather surprising. However, AMPA and the GluK1-selective agonists ATPA and willardiine (from which UBP310 derives), are active on GluK2/GluK5 receptors (Alt et al., 2004) without significant activity at GluK2 alone. Because postsynaptic KARs likely contain GluK2 and GluK5, we tested the ability of UBP310 to antagonize recombinant GluK2/GluK5 heteromeric receptors. In cells transfected with GluK2 and GluK5 glutamate-activated currents (1 mM, 100 ms) were only slightly inhibited by UBP310 (Fig. 2A). However, current kinetics were markedly affected with increasing concentrations of UBP310. We tried to mimic the fast release and clearance of glutamate in synapses by applying short (1 ms) pulses of glutamate, as previously described (Barberis et al., 2008). These currents displayed slow deactivation kinetics (Fig. 2E) and UBP310 dose-dependently reduced current amplitudes with an IC_{50} of 1.3 μ M (Fig. 2H). In cells transfected with GluK2 alone glutamate (1 mM, 100 ms) generated large currents which were little affected in amplitude or kinetics by UBP310 (Fig. 2B). Similar results were obtained for short applications (Fig. 2F). Consistent with the competitive nature of UBP310, its concentration-dependent antagonism was shifted to lower concentrations when only 100 μ M glutamate was applied for 1 ms (Fig. 2G, H), lowering the IC_{50} to 0.75 μ M. Furthermore, UBP310 had a significant and concentration-dependent effect on the peak amplitude of currents activated by 100 ms pulses of 100 μ M glutamate, while markedly affecting the rise and decay kinetics (Fig. 2C, D). These experiments provide the first identification of a potent antagonist which is selective for recombinant GluK2/GluK5 receptors over homomeric GluK2.

Postsynaptic KARs and spike transmission

KARs contribute, on average, with less than 10 % to the total amplitude of mf-EPSCs (e.g. Pinheiro et al., 2007) and, although charge transfer is high due to the slow decay of their currents, their small amplitude raises doubts as to whether they may have a real impact on mf-CA3 synaptic transmission. Until now there was no way to selectively interfere with the function of postsynaptic KARs, and here we took advantage of UBP310 towards this goal. Mf-EPSCs decay significantly faster in the presence of UBP310 (Fig 3A, B) due to the loss of the slow KAR-mediated component. The effects of UBP310 are more pronounced on the EPSP waveform, and a double exponential fit reveals a significant acceleration of the slower

phase of decay (Fig 3C, D). This is somewhat expected since the fast, large-amplitude AMPAR currents will charge the membrane capacitance allowing the slow KAR-mediated component to exert a noticeable impact on membrane voltage. Our question was whether such change in mf-EPSP waveform could affect temporal summation and effectively alter mf-CA3 spike transmission. Given the effects of UBP310 on single EPSPs, blocking KARs should have the largest impact on mf-EPSP summation at frequencies around 10 Hz (Sachidhanandam et al., 2009). Contrary to our expectations, we found that blocking postsynaptic KARs with 5 μ M UBP310 had no significant impact on either the spike probability (Fig 3E) or the latency for a first spike (not shown) during a 10 Hz train. A plausible explanation is that spike transmission at mf-CA3 is mainly governed by the prominent presynaptic facilitation induced by repetitive trains, since mf-EPSCs can reach several hundred pA in the first few stimulations. However, UBP310 modified the sustained depolarization throughout the train, measured as the average depolarization underneath the last 10 EPSPs (11.2 ± 1.1 mV in control and 8.9 ± 0.8 mV in UBP310; $p = 0.005$; Fig. 3F, G), without any effect on cell excitability (Supplemental Fig. 2). We reasoned that such change in membrane voltage, although small, may nevertheless affect spike transmission triggered by co-stimulation of weaker glutamatergic inputs impinging on CA3 pyramidal cells. Indeed, when a stimulation of associational/commissural (A/C) fibers was applied following a train of 5 stimulations to mf-CA3 synapses, its probability to trigger a spike was significantly reduced by UBP310 (Fig 3H, I).

Postsynaptic KARs and short-term synaptic plasticity

Through both pharmacological and genetic approaches it was demonstrated that presynaptic KARs contribute to the large dynamic range of mf-CA3 synapses (e.g. Contractor et al., 2001; Schmitz et al., 2001; Pinheiro et al., 2007). This view was recently challenged by invoking the recruitment of polysynaptic activity, much of which was attributed to the activation of postsynaptic KARs (Kwon and Castillo, 2008). Because UBP310 selectively blocks postsynaptic KARs and spares other glutamate receptors and presynaptic KARs at mf-CA3 synapses (Perrais et al., 2009) it can be used to directly evaluate this possibility. Our first reasoning was that, if indeed polysynaptic activity plagued most recordings from mf-CA3 synapses, we would also observe large EPSC rise times, as reported (Kwon and Castillo, 2008). However, in recording from mouse slices in minimal stimulation conditions, the average rise time (20-80%) of mf-EPSCs at 3 Hz was only 1.11 ± 0.07 ms (Fig 4A). Moreover, when strongly minimizing polysynaptic activity in the presence of 5 μ M UBP310 and 250 nM NBQX to partially block AMPA receptors ($74.4 \pm 5.0\%$ reduction in EPSC amplitude), the mean rise time was similar to the paired controls (1.04 ± 0.06 ms; Fig 4A). Additionally, both the paired-pulse ratio (Fig 4B, C) and frequency

facilitation at 3 Hz (Fig 4D, E) were unaffected by such experimental manipulation (see also Perrais et al., 2009). We also recorded pharmacologically isolated KAR-EPSPs during long 25 Hz trains and found that, although it is possible to reach CA3 pyramidal cell firing through KAR activation alone, this can only occur after a high number of stimuli (>10) and is completely prevented by UBP310 (Fig. 4F). Most importantly, large presynaptic short-term facilitation was still observed when monitoring isolated KAR-EPSCs but was significantly reduced in GluK3-deficient mice (Supplemental Fig. 3). Finally, we found that UBP310 affects neither the EPSCs recorded from CA3 pyramidal cells upon stimulation of the A/C pathway, consistent with the lack on KARs, nor the frequency of spontaneous EPSCs (corresponding to all glutamatergic synaptic inputs to CA3 pyramidal cells; Supplemental Fig. 4).

DISCUSSION

This study identifies a first potent antagonist of heteromeric GluK2/GluK5 and of postsynaptic KARs at mf-CA3 synapses which spares AMPARs and NMDARs. With this tool in hand, it is now possible to dissect the functional role of postsynaptic KARs in major neuronal populations, such as CA3 pyramidal cells. In addition, we can directly exclude the participation of postsynaptic KARs to plasticity mechanisms attributed to presynaptic KARs at mf-CA3 synapses.

Identification of an antagonist for a major population of KARs in the brain

GluK2/GluK5 receptors are known to constitute a major population of KARs in the brain: both subunits are abundantly co-expressed in the cerebellum, neocortex, striatum, amygdala and hippocampus, at higher levels than other KAR subunits (e.g. Bureau et al., 1999). We identified GluK2/GluK5 as a possible target for the action of UBP310 at mf-CA3 synapses by analyzing the effects of this compound in recombinantly expressed receptors. Interestingly, UBP310 acted on GluK2/GluK5 with similar potency than on native postsynaptic KARs (750 vs 250 nM, respectively), but was much less active on homomeric GluK2. The antagonistic action of UBP310 on GluK2/K5 receptors was best observed when short, "synaptic-like", pulses of glutamate were used, which induce slow decaying currents (Barberis et al., 2008). With longer pulses of glutamate, which induce fast receptor desensitization, UBP310 largely increased current rise and decay times. This might explain why UBP310 was not identified in previous high-throughput screening for antagonists (Alt et al., 2004). Finally, the strong activity of UBP302 and UBP316 at blocking postsynaptic KARs at mf-CA3 synapses suggests that all UBP compounds could behave similarly, questioning whether UBP-sensitive physiological processes (Huxter et al., 2007; Wondolowski and Frerking, 2009) are mediated only by GluK1-containing KARs.

Postsynaptic kainate receptors and synaptic integration

Simulations led to the proposal that postsynaptic KARs might have a strong influence on membrane potential and that AMPARs and KARs differ in their ability to encode temporal information (Frerking and Ohliger-Frerking, 2002). This was directly demonstrated in hippocampal interneurons (Goldin et al., 2007; Yang et al., 2007) where GluK1 is likely a major player (Cossart et al., 1998; Frerking et al., 1998; Mülle et al., 2000). The role of KAR-EPSCs in synaptic integration and plasticity in CA3 pyramidal cells has, however, remained speculative due to the lack of tools to selectively interfere with their function. In addition, KARs play a major role in presynaptic short-term plasticity at mf-CA3 synapses which might be difficult to disentangle from postsynaptic KARs (see below). Here, we directly tested the physiological role of postsynaptic KARs by acutely blocking their contribution to mf-EPSPs. Consistent with the original assumptions, we found that postsynaptic KARs contribute a prolonged depolarization to mf-EPSPs. However, we found no significant effect of UBP310 on spike transfer at mf-CA3 synapses. This was rather unexpected, considering that we used frequencies which should maximize the effects of KARs on the EPSP waveform. The ionotropic action of postsynaptic KARs plays little direct role in spike transmission at mf-CA3 synapse likely because it is overcome by the powerful presynaptic short-term facilitation. Nevertheless, we demonstrate that the sustained depolarization mediated by postsynaptic KARs plays a role in heterosynaptic facilitation of spike transmission through additional inputs, such as those from Associational/Commissural pathway. In addition, postsynaptic KARs may play a role in heterosynaptic long-term plasticity (Kobayashi and Poo, 2004; Sachidhanandam et al., 2009).

Pre- vs postsynaptic KARs at hippocampal MF synapses

Many studies showed, through both pharmacological and genetic approaches, that presynaptic KARs significantly contribute to the large dynamic range of short-term plasticity at mf-CA3 synapses (Contractor et al., 2001; Lauri et al., 2001; Pinheiro et al., 2007; Schmitz et al., 2003; Schmitz et al., 2001). However, a recent study has questioned this view by dismissing a mechanism mediated by presynaptic KARs in favor of polysynaptic activity generated, to a great extent, by postsynaptic KARs (Kwon and Castillo, 2008). Our study provides strong experimental evidence to directly counter such claims. We demonstrate that blocking postsynaptic KARs with UBP310 has no effect on presynaptic facilitation (see also Perrais et al, 2009), and does not affect the frequency of spontaneous EPSCs. Furthermore, when using minimal stimulation conditions, isolated postsynaptic KARs only elicit CA3 cell firing when stimulating with long trains at high frequency. These observations strikingly differ from what was reported by Kwon and Castillo (2008) suggesting their recording conditions maximize polysynaptic activity, possibly due to strong stimulation. In support of this, their

reported mf-EPSC rise time is much larger (~4 ms) than what we observe using minimal stimulation (1 ms; see also Jonas et al., 1993). Furthermore, we found no effect of UBP310 on mf-EPSC rise time. Therefore, although postsynaptic KARs may participate in polysynaptic activity in certain experimental conditions, this does not dismiss a role for presynaptic KARs. Finally, a major argument in favour of presynaptic KARs at mf-CA3 synapses is the fact that presynaptic facilitation is markedly decreased in GluK3-deficient mice, a subunit that does not participate to postsynaptic KARs at mf-CA3 synapses (Pinheiro et al., 2007). Importantly, the decreased facilitation in GluK3^{-/-} mice is also observed when monitoring pharmacologically isolated KAR-EPSCs, a condition that excludes polysynaptic contamination by associative/commissural EPSCs because they lack a KAR-mediated component. Thus, our results decisively argue against the implication of postsynaptic KARs, and/or polysynaptic activity generated through their activation, in presynaptic facilitation at mf-CA3 synapses.

Overall, the identification of UBP310 as an antagonist of postsynaptic KARs and of recombinant GluK2/GluK5 likely represents a decisive step in the development of compounds to delineate the physiological roles of KARs in the regulation of synaptic networks and higher brain function.

REFERENCES

- Alt, A., Weiss, B., Ogden, A.M., Knauss, J.L., Oler, J., Ho, K., Large, T.H., and Bleakman, D. (2004). Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology* 46, 793-806.
- Barberis, A., Sachidhanandam, S., and Mulle, C. (2008). GluR6/KA2 kainate receptors mediate slow-deactivating currents. *J Neurosci* 28, 6402-6406.
- Bureau, I., Bischoff, S., Heinemann, S.F., and Mulle, C. (1999). Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *J Neurosci* 19, 653-663.
- Castillo, P.E., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388, 182-186.
- Contractor, A., Sailer, A.W., Darstein, M., Maron, C., Xu, J., Swanson, G.T., and Heinemann, S.F. (2003). Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation of mossy-fiber synapses in KA2-/- mice. *J Neurosci* 23, 422-429.
- Contractor, A., Swanson, G., and Heinemann, S.F. (2001). Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 29, 209-216.
- Cossart, R., Esclapez, M., Hirsch, J.C., Bernard, C., and Ben-Ari, Y. (1998). GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 1, 470-478.
- Dolman, N.P., More, J.C., Alt, A., Knauss, J.L., Pentikainen, O.T., Glasser, C.R., Bleakman, D., Mayer, M.L., Collingridge, G.L., and Jane, D.E. (2007). Synthesis and pharmacological characterization of N3-substituted willardiine derivatives: role of the substituent at the 5-position of the uracil ring in the development of highly potent and selective GLUK5 kainate receptor antagonists. *J Med Chem* 50, 1558-1570.
- Fernandes, H.B., Catches, J.S., Petralia, R.S., Copits, B.A., Xu, J., Russell, T.A., Swanson, G.T., and Contractor, A. (2009). High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron* 63, 818-29.
- Fisahn, A., Heinemann, S.F., and McBain, C.J. (2005). The kainate receptor subunit GluR6 mediates metabotropic regulation of the slow and medium AHP currents in mouse hippocampal neurones. *J Physiol* 562, 199-203.
- Frerking, M., Malenka, R., and Nicoll, R. (1998). Synaptic activation of KARs on hippocampal interneurons. *Nature Neuroscience* 1, 479-486.
- Frerking, M., and Ohliger-Frerking, P. (2002). AMPA receptors and kainate receptors encode different features of afferent activity. *J Neurosci* 22, 7434-7443.
- Goldin, M., Epsztein, J., Jorquera, I., Represa, A., Ben-Ari, Y., Crepel, V., and Cossart, R.

- (2007). Synaptic kainate receptors tune oriens-lacunosum moleculare interneurons to operate at theta frequency. *J Neurosci* 27, 9560-9572.
- Huxter, J.R., Zinyuk, L.E., Roloff, E.L., Clarke, V.R., Dolman, N.P., More, J.C., Jane, D.E., Collingridge, G.L., and Muller, R.U. (2007). Inhibition of kainate receptors reduces the frequency of hippocampal theta oscillations. *J Neurosci* 27, 2212-2223.
- Jane, D.E., Lodge, D., and Collingridge, G.L. (2009). Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology* 56, 90-113.
- Jonas, P., Major, G., and Sakmann, B. (1993). Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J Physiol* 472, 615-663.
- Kobayashi, K., and Poo, M.M. (2004). Spike train timing-dependent associative modification of hippocampal CA3 recurrent synapses by mossy fibers. *Neuron* 41, 445-454.
- Kwon, H.B., and Castillo, P.E. (2008). Role of glutamate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 60, 1082-1094.
- Lauri, S.E., Bortolotto, Z.A., Bleakman, D., Ornstein, P.L., Lodge, D., Isaac, J.T., and Collingridge, G.L. (2001). A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Neuron* 32, 697-709.
- Lerma, J. (2006). Kainate receptor physiology. *Curr Opin Pharmacol* 6, 89-97.
- Mulle, C., Sailer, A., Perez-Otano, I., Dickinson-Anson, H., Castillo, P.E., Bureau, I., Maron, C., Gage, F.H., Mann, J.R., Bettler, B., *et al.* (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 392, 601-605.
- Mulle, C., Sailer, A., Swanson, G.T., Brana, C., O'Gorman, S., Bettler, B., and Heinemann, S.F. (2000). Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* 28, 475-484.
- Perrais, D., Pinheiro, P.S., Jane, D.E., and Mulle, C. (2009). Antagonism of recombinant and native GluK3-containing kainate receptors. *Neuropharmacology* 56, 131-140.
- Pinheiro, P., and Mulle, C. (2006). Kainate receptors. *Cell Tissue Res* 326, 457-482.
- Pinheiro, P.S., and Mulle, C. (2008). Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci* 9, 423-436.
- Pinheiro, P.S., Perrais, D., Coussen, F., Barhanin, J., Bettler, B., Mann, J.R., Malva, J.O., Heinemann, S.F., and Mulle, C. (2007). GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12181-12186.
- Ruiz, A., Sachidhanandam, S., Utvik, J.K., Coussen, F., and Mulle, C. (2005). Distinct subunits in heteromeric kainate receptors mediate ionotropic and metabotropic function at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 25, 11710-11718.

- Sachidhanandam, S., Blanchet, C., Jeantet, Y., Cho, Y.H., and Mulle, C. (2009). Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 29, 5000-5008.
- Schmitz, D., Mellor, J., Breustedt, J., and Nicoll, R.A. (2003). Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Nat Neurosci* 6, 1058-1063.
- Schmitz, D., Mellor, J., and Nicoll, R.A. (2001). Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* 291, 1972-1976.
- Vignes, M., and Collingridge, G.L. (1997). The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388, 179-182.
- Wentholt, R.J., Trumpy, V.A., Zhu, W.S., and Petralia, R.S. (1994). Biochemical and assembly properties of GluR6 and KA2, two members of the kainate receptor family, determined with subunit-specific antibodies. *J Biol Chem* 269, 1332-1339.
- Wondolowski, J., and Frerking, M. (2009). Subunit-dependent postsynaptic expression of kainate receptors on hippocampal interneurons in area CA1. *J Neurosci* 29, 563-574.
- Yang, E.J., Harris, A.Z., and Pettit, D.L. (2007). Synaptic kainate currents reset interneuron firing phase. *J Physiol* 578, 259-273.

FIGURE 1

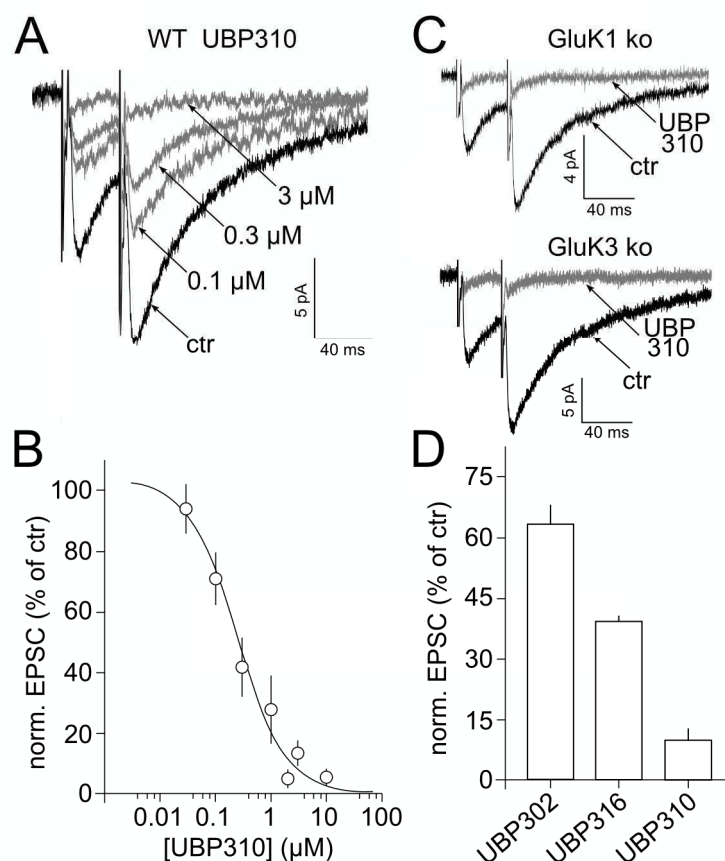


Figure 1. UBP310 is an antagonist of KARs at mf-CA3 synapses. (A) Representative traces showing the effect of various concentrations of UBP310 on pharmacologically isolated KAR-EPSCs at mf-CA3 synapses. (B) Summary graph of the concentration-dependent block of KAR-EPSC by UBP310 ($n = 4-6$ cells for each concentration). (C) Averages of 60 traces, obtained for paired stimulations at a frequency of 1 Hz, showing that UBP310 (3 μ M) is also effective at blocking KAR-EPSCs recorded from slices of GluK1 and GluK3 knockout mice. (D) Effect of other willardiine derivatives of the UBP series, UBP302 ($n = 5$), UBP316 ($n = 3$) and UBP310 ($n = 5$) on KAR-EPSCs (all tested at 2 μ M).

FIGURE 2

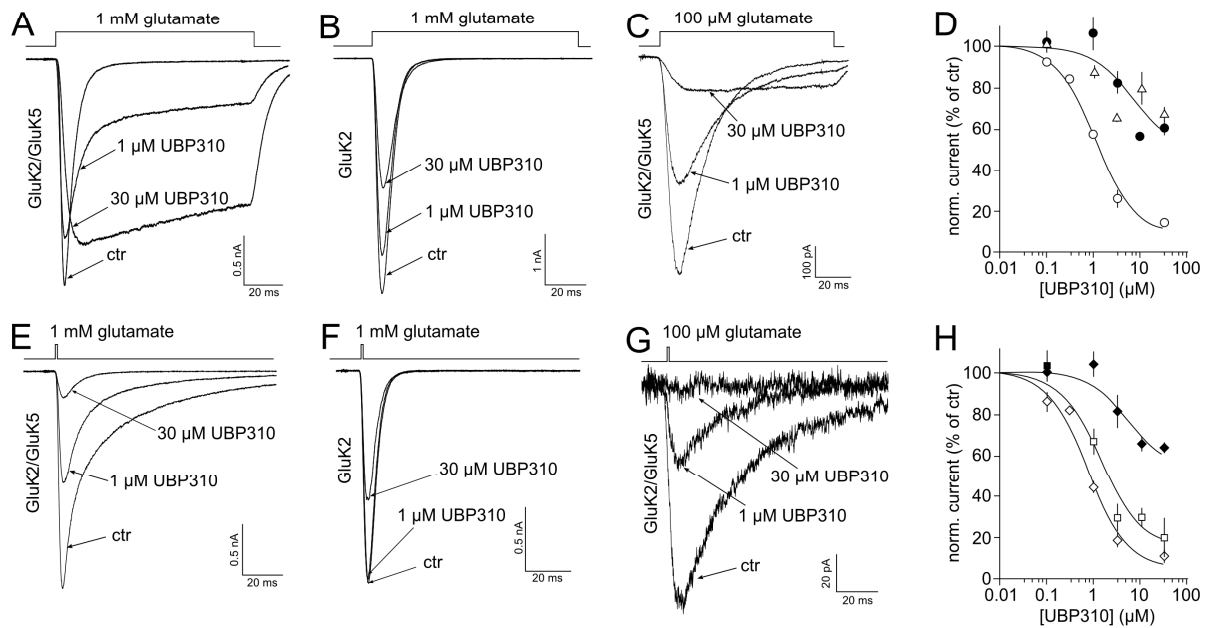


Figure 2. UBP310 is an antagonist of recombinant GluK2/GluK5 KARs. (A-C) representative traces of the effects of UBP310 on currents recorded from HEK 293 cells transfected with GluK2/GluK5 (A, C) or GluK2 alone (B) for long (100 ms) glutamate applications. Note the large changes in current kinetics for GluK2/GluK5 receptors. (D) Summary graph of the concentration-dependent effects of UBP310 depicted in A-C. White circles, GluK2/GluK5 (100 μ M glutamate for 100 ms); white triangles, GluK2/GluK5 (1 mM glutamate for 100 ms; not fitted); black circles, GluK2 (1 mM glutamate for 100 ms). (E-G) representative traces of the effects of UBP310 on currents recorded from HEK 293 cells transfected with GluK2/GluK5 (E, G) or GluK2 alone (F) for short (1 ms) glutamate applications. (H) Summary graph of the concentration-dependent effects of UBP310 depicted in E-G. White squares, GluK2/GluK5 (1 mM glutamate for 1 ms); white diamonds, GluK2/GluK5 (100 μ M glutamate for 1 ms); black diamonds, GluK2 (1 mM glutamate for 1 ms).

FIGURE 3

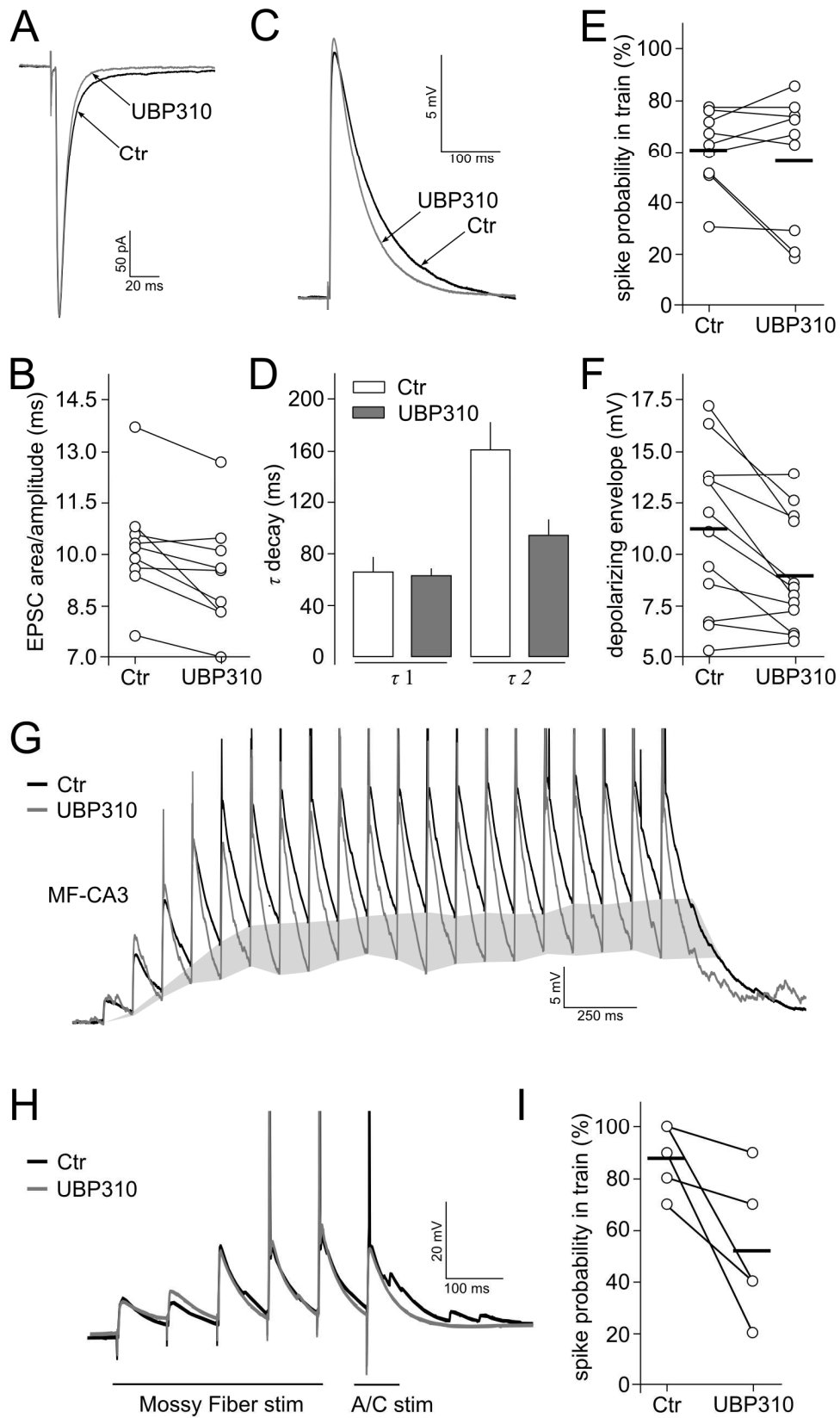


Figure 3. Participation of postsynaptic KARs to mf-CA3 synaptic transmission. (A) Averaged traces of mf-EPSCs (1 Hz) showing the change in kinetics caused by 5 μ M UBP310. (B) UBP310 significantly reduces the duration of mf-EPSCs ($n = 9$, $P = 0.01$; paired t -test). (C) Averaged traces of mf-EPSPs (1 Hz) showing the change in kinetics caused by 5 μ M UBP310. (D) A double exponential fit to the decay phase of mf-EPSPs reveals a significant acceleration of the slower time constant (τ_2 : from 160.2 ± 22.1 ms to 94.3 ± 11.6 ms; $n = 11$, $P = 0.017$; paired t -test), with no change in the faster time constant (τ_1 : 65.5 ± 11.9 ms to 62.7 ± 5.6 ms; $n = 11$, $P = 0.7$; paired t -test), as expected from the slow kinetics of KAR-EPSCs. (E) UBP310 (5 μ M) has no significant impact on spike transmission at mf-CA3 synapses during a train of 20 stimulations at 10 Hz ($n = 9$, $P = 0.45$; paired t -test). (F) UBP310 (5 μ M) significantly reduced the depolarizing envelope, measured between the last 10 mf-EPSPs and the voltage before stimulation, from 11.2 ± 1.1 mV to 8.9 ± 0.8 mV ($n = 9$, $P = 0.005$; paired t -test). (G) Averaged traces illustrating the effect of UBP310 on the depolarizing envelope (shaded area). Spikes were truncated. (H) Sample traces of EPSPs recorded from a CA3 pyramidal cell elicited by a stimulation of the A/C pathway 100 ms after a conditioning train to mF-CA3 synapses. UBP310 (grey) significantly reduced the spike probability in the train. (I) Summary graph of the experiments in (H).

FIGURE 4

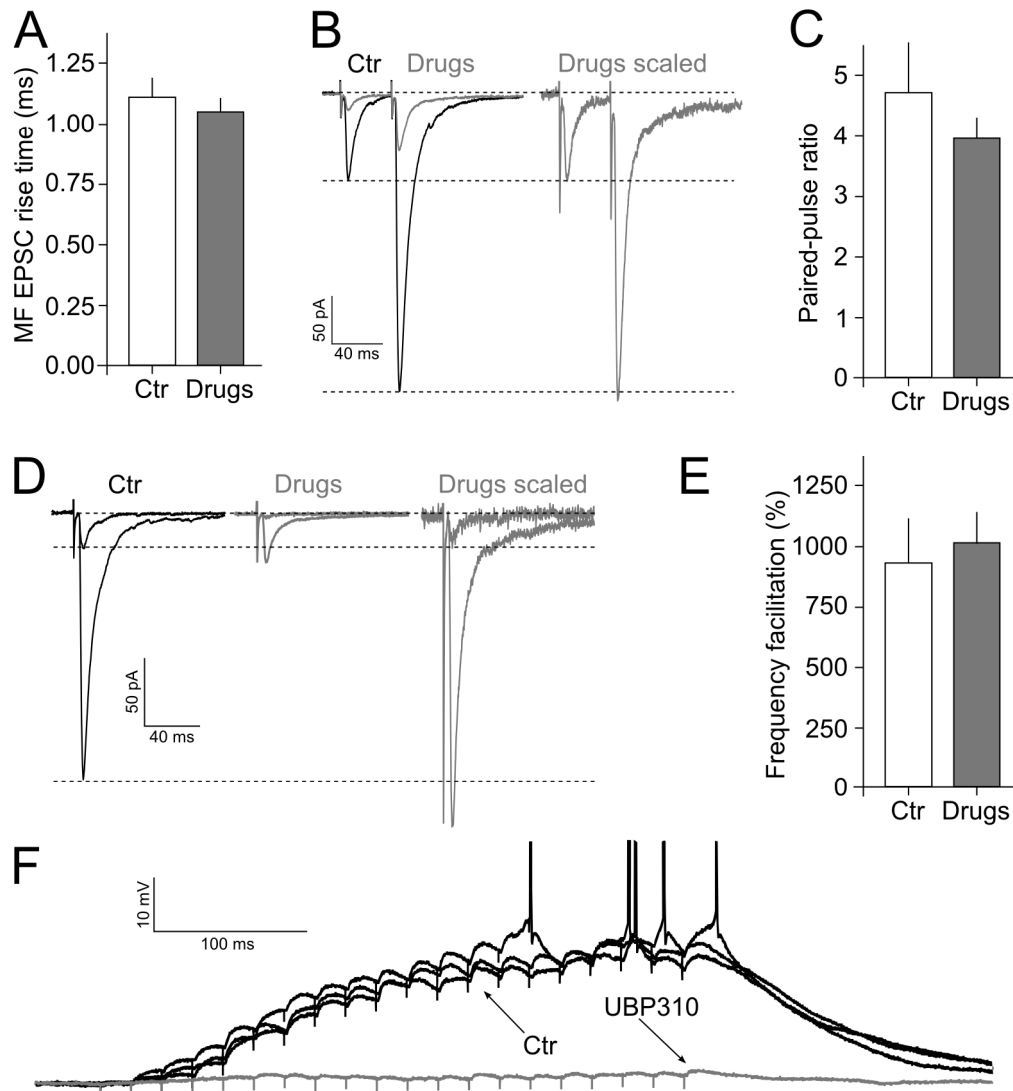
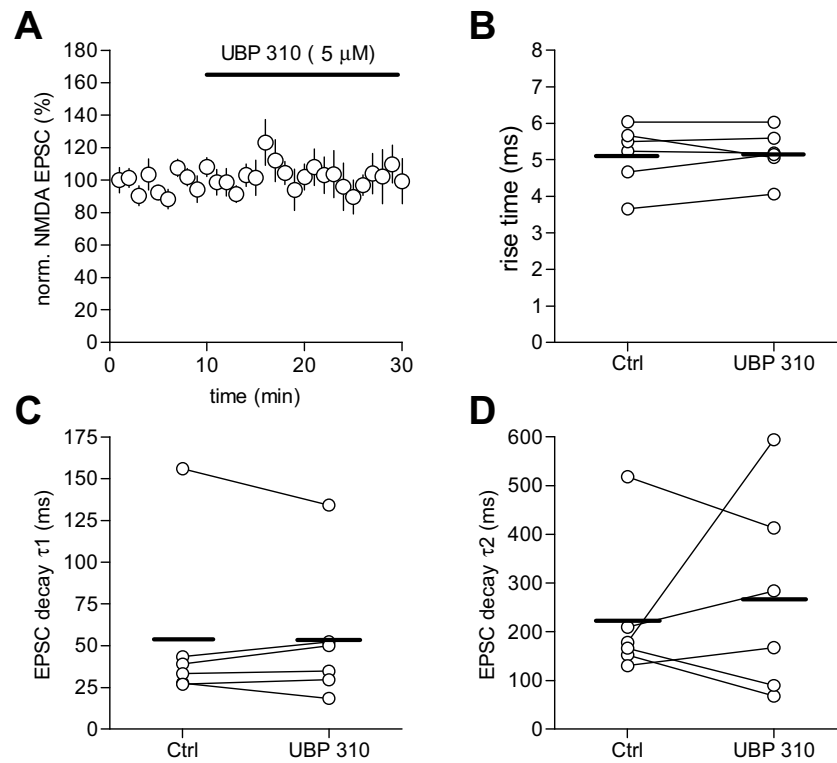


Figure 4. Role of postsynaptic KARs on spike generation and mf-CA3 synaptic plasticity. (A) In standard recording conditions mf-EPSC rise times were short (1.11 ± 0.07 ms; $n = 11$) and were not significantly affected by blocking KARs with 5 μ M UBP310 and 250 nM NBQX (Drugs) to dampen excitability (1.04 ± 0.06 ms; $n = 11$). (B, C) Such experimental manipulation did not affect the paired-pulse ratio of mf-EPSCs ($n = 8$, $P = 0.4$; paired t -test). (D, E) Frequency facilitation was similarly unaffected by these experimental conditions ($n = 11$, $P = 0.5$; paired t -test). (F) Examples of KAR-EPSPs at mf-CA3 synapses elicited at 25 Hz (black) inhibited by UBP310 (5 μ M; grey). Note that action potentials can be evoked only after more than 10 stimulations.

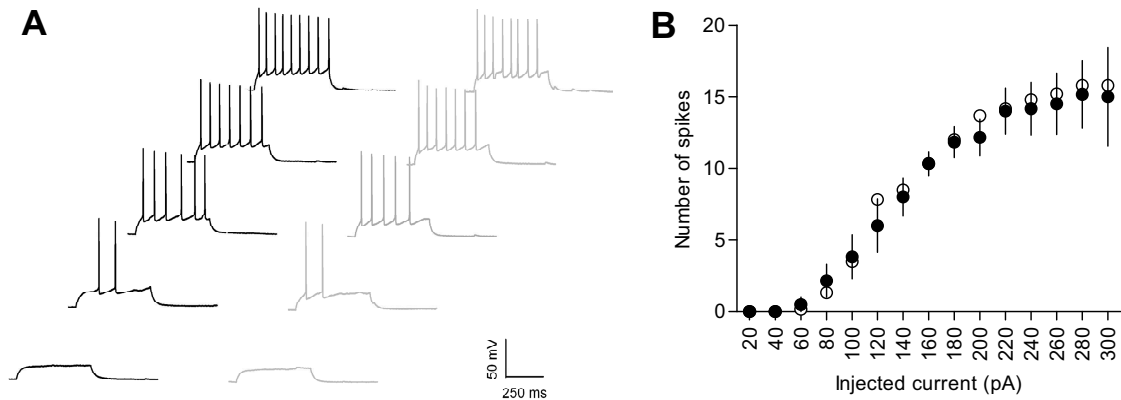
Supplemental Text and Figures

Supplemental Fig 1



Supplemental Fig. 1. UBP310 has no effect on NMDAR EPSCs. (A) Timecourse of the effect of UBP310 application (5 μ M) on pharmacologically isolated NMDAR EPSCs in the presence of NBQX (20 μ M) at +30 mV. UBP310 had no noticeable effect on the NMDAR EPSC amplitude, measured between 15 and 20 min of UBP application (98 ± 12 % of control). (B) UBP310 was without noticeable effect on NMDAR EPSC rise time. (C and D) A double exponential fit to the NMDAR EPSC decay phase shows no effect of UBP310 on either the fast (C) or slower (D) components.

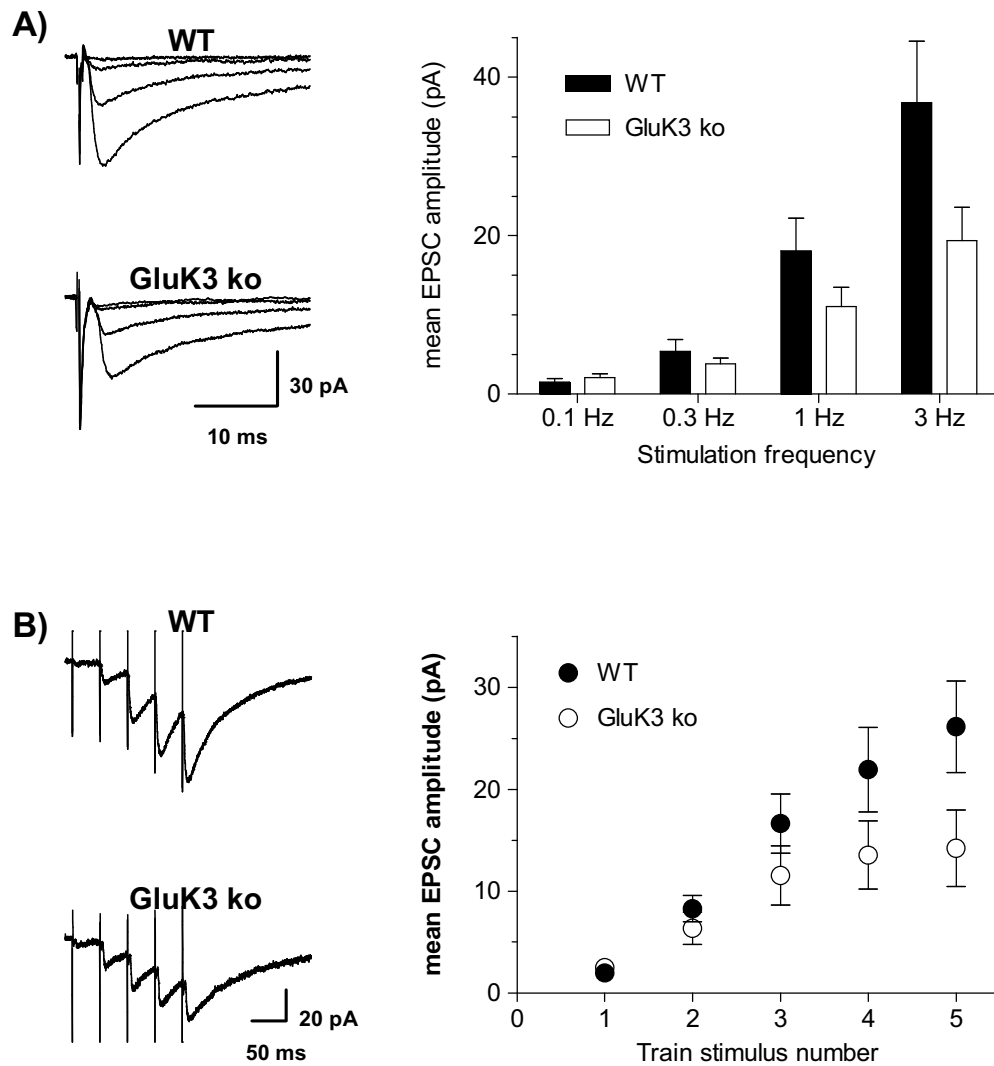
Supplemental Fig 2



Supplemental Fig. 2. UBP310 has no effect on the intrinsic properties of CA3 pyramidal cells. (A) Representative traces of successive 500 ms current injection steps (from 60 to 140 pA in 20 pA steps) before (black trace) and during (grey trace) application of UBP310 (5 μM) showing the lack of effect of UBP310 on cell excitability. (B) Summary graph of the full experiment (n = 6) depicted in (A).

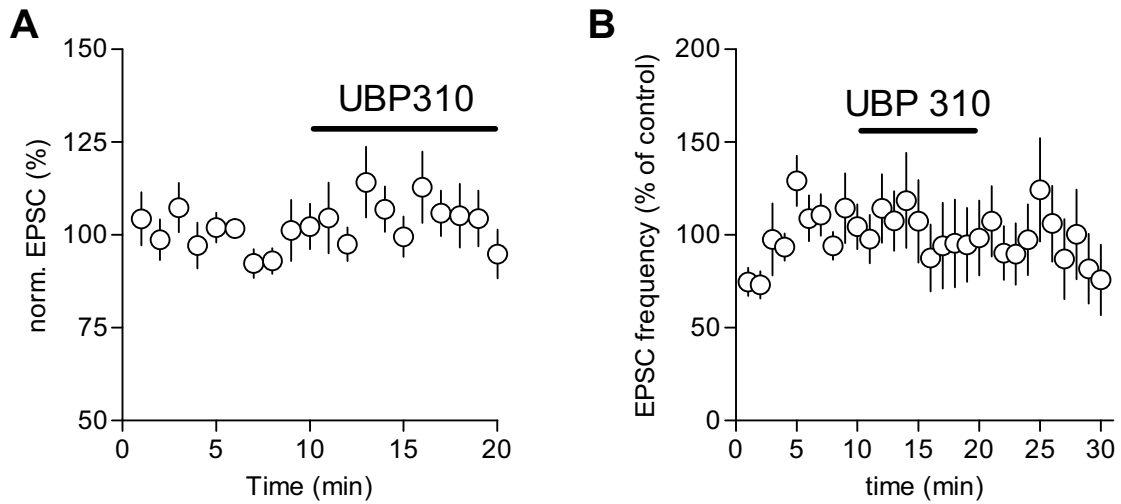
Text to supplemental Fig. 3. Recently, the implication of presynaptic KARs in MF synaptic plasticity has been dismissed in favor of an indirect effect mediated by postsynaptic KARs that would generate considerable polysynaptic activity. This would then be mistaken for the action of presynaptic KARs (Kwon and Castillo, 2008). We have previously demonstrated that the genetic removal of GluR7 (GluK3) significantly reduces presynaptic facilitation (Pinheiro et al, 2007). GluR7 is only expressed in the granule cells of the dentate gyrus and, therefore, KAR EPSCs on CA3 pyramidal cells are spared by its genetic deletion. Furthermore, in the present manuscript we clearly demonstrate that the full selective blockade of postsynaptic KARs with UBP310 has no influence on MF synaptic plasticity. We also previously demonstrated that UBP310 has no effect on presynaptic KARs (Perrais et al., 2009). Taken together, the three studies clearly argue in favor of a strong action of presynaptic kainate receptors in synaptic plasticity and against the implication of postsynaptic KARs, or polysynaptic activity, in such phenomena. Furthermore, we repeated short-term plasticity experiments in GluK3 knockout mice, in which post-KARs are fully functional, and found markedly reduced synaptic plasticity of mf-EPSCs, as previously reported (Pinheiro et al., 2007; Sachidhanandam et al., 2009). Nevertheless, to settle the argument of polysynaptic activity we designed an additional experiment based on the following rationale: CA3 pyramidal cells communicate with each other and, if many are stimulated simultaneously, one may effectively suffer polysynaptic contamination when recording from any given cell. However, unlike MF synapses onto CA3 pyramidal cells, excitatory synaptic transmission between CA3 pyramidal cells is mediated by AMPA and NMDA receptors and lacks KAR-mediated EPSCs. Therefore, by fully blocking AMPA receptors with a low concentration of NBQX and NMDA receptors with D-AP5 recurrent synaptic transmission between CA3 pyramidal cells is completely eliminated while it is still possible to monitor MF-CA3 synaptic transmission through KAR-mediated EPSCs. In these experimental conditions we were still able to demonstrate that in GluR7 knockout mice synaptic plasticity is significantly reduced compared with WT mice. This experiment very strongly argues against the contribution of polysynaptic contamination to presynaptic plasticity phenomena. These experiments are demonstrated in the figure bellow. Additionally, Kwon and Castillo (2008) try to demonstrate that mossy fiber synaptic transmission in GluR7 knockout mice is unaffected when compared to WT mice. This experiment is, however, misleading since it was performed in the presence of 4 mM Ca^{2+} and 4 mM Mg^{2+} , a condition in which we previously demonstrated, through direct comparison between GluR7 knockout mice and WT mice, that the facilitatory effect of presynaptic KARs is occluded (our supporting figure 12 in Pinheiro et al., 2007; see also Lauri et al., 2003).

Supplemental Fig. 3



Supplemental Fig. 3. Presynaptic KAR-mediated plasticity enhancement is still observed without polysynaptic activity. (A) *Left*: average traces of the KAR component of mf-EPSCs recorded at four stimulus frequencies (0.1, 0.3, 1 and 3 Hz) in WT (top) and GluK3 ko (bottom) mice. *Right*: Average KAR-EPSC amplitudes recorded at 0.1, 0.3, 1 and 3 Hz in WT (n = 5) and GluK3 KO (n = 7) mice. (B) *Left*: average traces of the KAR component of mf-EPSCs evoked by a train of 5 stimuli at 25 Hz in WT (top) and GluK3 ko (bottom) mice. *Right*: Average KAR-EPSC amplitudes evoked by a train of 5 stimuli at 25 Hz in WT (n = 7) and GluK3 ko (n = 8) mice. Recordings were obtained in the presence of D-AP5 (25 μ M), NBQX (1 μ M), Bicuculline (10 μ M) and CGP55845 (1 μ M). ANOVA analysis of the data indicates a significant interaction between either frequency or train facilitation and genotypes ($p < 0.01$ in both cases).

Supplemental Fig. 4



Supplemental Fig. 4. Effect of UBP310 on the A/C pathway. (A) UBP310 (5 μ M) had no effect on EPSCs recorded from CA3 pyramidal cells evoked by stimulation of the A/C pathway, consistent with the inexistence of KARs at such synapses and with its lack of effect on AMPA and NMDA receptors. (B) UBP310 had no significant effect on the frequency of spontaneous events recorded from CA3 pyramidal neurons (corresponding to all possible inputs to these cells).

ANNEXE 3

“Spike-Timing-Dependent Plasticity Induces Presynaptic Changes at Immature Hippocampal Mossy Fiber Synapses”

Lanore F., Rebola N. and Carta M.

Journal Club_J Neurosci 29(26): 8299-301 (2009).

Journal Club

Editor's Note: These short, critical reviews of recent papers in the *Journal*, written exclusively by graduate students or postdoctoral fellows, are intended to summarize the important findings of the paper and provide additional insight and commentary. For more information on the format and purpose of the Journal Club, please see http://www.jneurosci.org/misc/ifa_features.shtml.

Spike-Timing-Dependent Plasticity Induces Presynaptic Changes at Immature Hippocampal Mossy Fiber Synapses

Frederic Lanore, Nelson Rebola, and Mario Carta

Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5091, Bordeaux Neuroscience Institute, University of Bordeaux, 33077 Bordeaux, France

Review of Sivakumaran et al. (<http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/29/8/2637>)

Activity-dependent modulations of synaptic strength play a crucial role in the structural and functional refinement of neuronal connections (Goda and Davis, 2003), which are thought to be the cellular basis of information storage and memory formation. Long-lasting modifications in the efficacy of synaptic transmission can be induced by coincident presynaptic and postsynaptic activity in a form of plasticity known as spike-timing-dependent plasticity (STDP) (Caporale and Dan, 2008). In this form of plasticity, the precise timing and the order of presynaptic and postsynaptic action potentials determine the magnitude and the direction of the change in synaptic strength.

STDP can occur at both glutamatergic and GABAergic synapses, with slightly different induction rules. At glutamatergic synapses, when a postsynaptic action potential follows a presynaptic spike within a window of tens of milliseconds, long-term potentiation (LTP) usually occurs, whereas the reverse order results in depression (LTD). The induction rules for STDP at GABAergic synapses appear to be more variable (Caporale and Dan, 2008). The current hypothesis suggests that the direction of plasticity depends on the peak

amplitude of the postsynaptic intracellular calcium concentrations: high calcium levels lead to LTP, whereas low to moderate levels lead to LTD (Caporale and Dan, 2008).

STDP has been already described in many areas of the brain, but so far it was not known whether it occurs at hippocampal mossy fiber synapses made between granule cells and CA3 pyramidal cells (Mf–CA3 synapses). In adult animals, Mf–CA3 synapses are glutamatergic synapses, but during the first week of development, GABA is the main neurotransmitter released (Safiulina et al., 2006). These synapses display several unique features, including low basal release probability, pronounced paired-pulse facilitation, and frequency facilitation. Moreover, Mf–CA3 synapses also display a particular form of LTP that is expressed presynaptically and is independent of NMDA receptor activation. Conversely, Mf–CA3 synapses are commonly assumed not to express the classical NMDA-dependent LTP associated with postsynaptic AMPA-EPSCs.

At Mf–CA3 synapses, whether presynaptic LTP depends on postsynaptic induction mechanisms has been a matter of debate. Williams and Johnston (1989) and Yeckel et al. (1999) argued that presynaptic LTP requires postsynaptic increases in Ca^{2+} and metabotropic glutamate receptor (mGluR) activation. The dependence of mossy fiber presynaptic LTP on postsynaptic mechanisms was further

supported by the observation that pairing presynaptic stimulation of mossy fibers with CA3 pyramidal cell depolarization induces LTP at Mf–CA3 synapses (Urban and Barrionuevo, 1996). However, Mellor and Nicoll (2001) showed that mossy fiber LTP is independent of postsynaptic Ca^{2+} and mGluRs receptor activation, arguing that the postsynaptic cell does not participate in inducing synaptic plasticity at Mf–CA3 synapses. Regardless of this controversy, the question that remains unanswered is whether mossy fibers present a Hebbian-like form of LTP.

In a recent study published in *The Journal of Neuroscience*, Sivakumaran et al. (2009) elegantly explored the presence of STDP at hippocampal Mf–CA3 pyramidal cell synapses. They examined this issue during an early postnatal period (postnatal day 2–5) when these synapses are thought to operate mainly through depolarizing GABA_A synaptic currents (Safiulina et al., 2006). Mossy fiber GABA_A -mediated synaptic potentials or currents (Mf-GPSPs or Mf-GPSCs) were evoked at 0.05 Hz from a holding potential of -70 mV in the presence of DNQX ($20 \mu\text{M}$) and D-AP5 ($50 \mu\text{M}$) to block AMPA- and NMDA-mediated synaptic responses, respectively. Using a paired-pulse stimulation recording paradigm (interstimulus interval 50 ms), the authors recorded from what they classified as “presynaptic silent synapses.” These correspond to synapses at which a synaptic response was detected following the

Received April 28, 2009; revised May 25, 2009; accepted May 27, 2009.

We acknowledge Dr. C. Mulle and Dr. C. Blanchet for their help in the discussion of this review.

Correspondence should be addressed to Frederic Lanore at the above address. E-mail: frederic.lanore@etud.u-bordeaux2.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1997-09.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/298299-03\$15.00/0

second stimulus of a pair, but not after the first stimulus. Semantically, the term “silent synapses” should not be used to refer to synapses with a very low probability of release, which are not very active, but also not silent. Although we agree that the difference between the two is subtle and that the term “silent synapses” is commonly used to refer to these synapses with very low probability of release, it is important to distinguish these from postsynaptically silent synapses whose definition is not dependent on the rate of stimulation. Maybe it is more appropriate to use the definition “whispering” synapses, a term already adopted by Voronin and Cherubini (2004).

By applying a pairing paradigm (10 postsynaptic spikes evoked at 0.1 Hz with afferent stimulation) between presynaptic and postsynaptic activity, the authors observed STDP in immature Mf-CA3 synapses. The observed activity-dependent changes in synaptic efficacy strongly relied on the temporal relationship between presynaptic and postsynaptic activation, with a critical window for STDP similar to that described for most glutamatergic and GABAergic synapses. If a positive pairing of postsynaptic spikes 15 ms after single Mf-GPSCs was used, LTP was observed; however, if postsynaptic spikes preceded Mf-GPSCs by 15 ms, LTD was induced.

Coincident presynaptic and postsynaptic activity had been shown previously to modulate synaptic strength at GABAergic synapses when GABA is still depolarizing (Woodin et al., 2003). However, in the previous study, the modulation of synaptic strength was related to a calcium-dependent decrease of the K^+-Cl^- cotransport activity. This seems not to be the mechanism involved in the activity-dependent modulation of GABAergic synaptic responses at immature mossy fiber synapses, since no change in GABA equilibrium potential was observed after pairing.

Interestingly, both LTP and LTD appeared to be induced postsynaptically and expressed presynaptically. In support of the presynaptic expression, the authors observed that LTP was followed by a decrease in paired-pulse ratio, decrease in the number of failures, and increase in the CV^{-2} (inverse squared value of coefficient of variation), whereas LTD was accompanied by opposite changes in these parameters. However, as mentioned by the authors, these parameters should be analyzed with caution, because insertion or removal of postsynaptic receptors

could in the same circumstances produce the same effects.

The authors observed that LTP induction by the pairing protocol led to synapse “fully speaking,” further supporting the presynaptic locus of expression of the observed LTP. Moreover, in a recent paper the authors showed that the “whispering” state of mossy fiber synapses at this age seems to be related to presynaptic tonic GABA_B receptor activation inhibiting synaptic release (Safiulina and Cherubini, 2009). In future work, it would be interesting to investigate whether “fully speaking” synapse induced by the pairing protocol operates by modulating tonic GABA_B receptor activation.

Mechanistically, Sivakumaran et al. (2009) found that STDP-LTP of GPSCs depended on postsynaptic calcium rise, postsynaptic protein kinase A (PKA) activity, and TrkB [brain-derived neurotrophic factor (BDNF) receptor] receptor activation. The authors hypothesize that the pairing protocol induced an activity-dependent release of BDNF from CA3 pyramidal cells, which in turn acted presynaptically at mossy fiber terminals to increase probability of release. Consequently, exogenous BDNF application did indeed increase synaptic efficacy at immature Mf-CA3 pyramidal cell synapses through a presynaptic mechanism required on PKA activity. To further support BDNF action through presynaptic TrkB receptors it would have been interesting to test the effect of exogenous BDNF application while blocking postsynaptic PKA activity. This experiment would rule out the possible modulation of synaptic transmission by BDNF acting on postsynaptic TrkB receptors as it has been suggested by Huang et al. (2008). While there are substantial evidence that BDNF can act as a retrograde messenger in several other synapses (Poo, 2001), this is the first time that such a phenomenon is reported to occur at Mf-CA3 synapses.

Surprisingly, when the authors blocked LTP induction by using a TrkB receptor antagonist or by reducing postsynaptic calcium rise using an antagonist of voltage-dependent L-type calcium channels (nifedipine) or with patch pipettes containing the calcium chelator 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA), they observed LTD of Mf-GPSCs instead. Although the nature of LTD obtained with BAPTA and with nifedipine is not clear, it could simply result from blockade of a calcium-dependent protection mecha-

nism against a decrease in Cl^- conductance as proposed by others (Woodin et al., 2003). The authors stated that the persistent synaptic depression obtained by blocking TrkB receptors was also of presynaptic origin because of the reduced number of successes and the significant increase in paired-pulse ratio. It might suggest the presence of a second pathway of postsynaptic/presynaptic communication that apparently does not depend on postsynaptic calcium rise and BDNF as a retrograde messenger. An interesting possibility would be to test the role of mGluRs, since this synapse can also release glutamate at this age (Safiulina et al., 2006).

An important point that we would also like to underline concerns the induction protocol of STDP. Immature Mf-CA3 synapses are normally “whispering” synapses (i.e., no postsynaptic response is triggered at the first stimulus). How is it then possible to explain that isolated presynaptic stimulations used during the pairing protocol, which should not trigger a postsynaptic response, give rise to these forms of plasticity? Indeed STDP at immature Mf-CA3 synapses requires both presynaptic and postsynaptic activity. A possible explanation is that another (a second) neurotransmitter is released by mossy fiber stimulation during the pairing protocol. Again, glutamate seems like a good candidate. An intriguing possibility is that glutamate released from Mfs during the pairing protocol would activate postsynaptic mGluRs, inducing increase of intracellular calcium levels and in turn BDNF release. In their experiments the authors had blocked ionotropic glutamate receptors, but not mGluRs, leaving this possibility open. It would be of great importance to verify the possible role of these receptors in STDP.

In conclusion, the work of Sivakumaran et al. (2009) describes for the first time a Hebbian-like form of synaptic plasticity at immature hippocampal mossy fiber synapses. This form of plasticity may contribute to the shaping of neuronal connectivity before the establishment of the adult neuronal circuits. Interestingly this new form of plasticity can result in both LTP and LTD, depending on the precise timing of presynaptic versus postsynaptic activity, which are both postsynaptically induced and presynaptically expressed. The current work raises also the need to address the role of the postsynaptic component in modulating synaptic plasticity induction at mossy fiber synapses in adult animals.

References

- Caporale N, Dan Y (2008) Spike timing-dependent plasticity: a Hebbian learning rule. *Annu Rev Neurosci* 31:25–46.
- Goda Y, Davis GW (2003) Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 40:243–264.
- Huang YZ, Pan E, Xiong ZQ, McNamara JO (2008) Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal synapse. *Neuron* 57:546–558.
- Mellor J, Nicoll RA (2001) Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium. *Nat Neurosci* 4:125–126.
- Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24–32.
- Safiulina VF, Cherubini E (2009) At immature mossy fibers-CA3 connections, activation of presynaptic GABAB receptors by endogenously released GABA contributes to synapses silencing. *Front Cell Neurosci* 3:1.
- Safiulina VF, Fattorini G, Conti F, Cherubini E (2006) GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. *J Neurosci* 26:597–608.
- Sivakumaran S, Mohajerani MH, Cherubini E (2009) At immature mossy-fiber-CA3 synapses, correlated presynaptic and postsynaptic activity persistently enhances GABA release and network excitability via BDNF and cAMP-dependent PKA. *J Neurosci* 29:2637–2647.
- Urban NN, Barrionuevo G (1996) Induction of Hebbian and non-Hebbian mossy fiber long-term potentiation by distinct patterns of high-frequency stimulation. *J Neurosci* 16:4293–4299.
- Voronin LL, Cherubini E (2004) ‘Deaf, mute and whispering’ silent synapses: their role in synaptic plasticity. *J Physiol* 557:3–12.
- Williams S, Johnston D (1989) Long-term potentiation of hippocampal mossy fiber synapses is blocked by postsynaptic injection of calcium chelators. *Neuron* 3:583–588.
- Woodin MA, Ganguly K, Poo MM (2003) Coincident pre- and postsynaptic activity modifies GABAergic synapses by postsynaptic changes in Cl[−] transporter activity. *Neuron* 39:807–820.
- Yeckel MF, Kapur A, Johnston D (1999) Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism. *Nat Neurosci* 2:625–633.