

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

PAR

MARC-ANDRÉ MARTEL

**LA PHOSPHOLIPASE A₂ INDÉPENDANTE DE L'ION CALCIUM : UN
ACTEUR CELLULAIRE CONTRIBUANT À LA PLASTICITÉ
GLUTAMATERGIQUE DE L'HIPPOCAMPE**

Septembre 2005

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je remercie profondément tous ceux qui m'ont soutenu tout au long de mes études à Trois-Rivières, autant les professeurs que mes collègues étudiants. Merci à mon directeur de recherche, le Dr Guy Massicotte, pour son entrain autant au laboratoire qu'en dehors, ainsi que pour son soutien continu durant ces deux années à la maîtrise. Je tiens aussi à remercier et féliciter mes collègues de laboratoire : Caroline Ménard, Christian Patenaude, Audrey Marineau, Émilie Chartier et Stéphanie Alaux; pour leur patience et leur intérêt face à mes incessantes et redondantes interrogations.

Je suis tout aussi reconnaissant vis-à-vis le Dr Gilles Bronchti et son équipe de recherche, tous les étudiants stagiaires présents ou passés, ainsi qu'au personnel de l'animalerie.

RÉSUMÉ

La potentialisation à long terme (LTP) est le modèle électrophysiologique par lequel on s'explique la mémoire cellulaire des neurones et comment l'information cognitive peut être stockée dans le cerveau. Dans la région CA1 de l'hippocampe, cette augmentation de l'efficacité synaptique s'effectue par une restructuration postsynaptique des récepteurs au glutamate alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-propionate (AMPA). Plusieurs indices suggèrent que les phospholipases A₂ (PLA₂) participent à la LTP, possiblement en régulant le trafic subcellulaire des récepteurs AMPA. Ces enzymes à action membranaire sont présents dans les neurones sous plusieurs formes dont les fonctions sont peu connues.

Dans la présente étude, nous avons utilisé l'électrophysiologie en potentiel de champ pour mesurer la transmission de l'influx aux synapses de l'hippocampe de rats. Avec l'aide de cette technique qui permet de mesurer l'activation des récepteurs AMPA suite à une stimulation, nous avons déterminé que la PLA₂ indépendante de l'ion calcium (iPLA₂) contribuait à la LTP de la région CA1 de l'hippocampe. En effet, l'inhibition des iPLA₂ par le bromoenol lactone (BEL) empêchait la LTP induite par une stimulation de type thêta. Comme l'inhibition des iPLA₂ ne semblait pas perturber les propriétés électriques des neurones ni les processus présynaptiques, il a été conclu que l'inhibiteur avait un effet dans les dendrites postsynaptiques.

En utilisant différents inhibiteurs isoformes-spécifiques, l'isoforme de iPLA₂ responsable de cette plasticité synaptique a été identifiée. Cette isoforme, la iPLA₂γ, est associée au réticulum endoplasmique dans plusieurs types cellulaires et pourrait donc réguler les processus d'exocytose de récepteurs AMPA lors de la LTP au niveau des pools intracellulaires de récepteurs.

Conséquemment, l'inhibiteur de iPLA₂ bloque aussi la potentialisation chimique, induite par ajout de N-méthyl-D-aspartate dans le milieu dans lequel baignent les tissus. Ce traitement provoque une augmentation du nombre de récepteurs dans les membranes

synaptiques, augmentation qui a été mesurée par immunobuvardage de type Western et par quantification de liaison au ^3H -AMPA. Tel qu'attendu, l'inhibition des iPLA_2 renversait les augmentations causées par la potentialisation chimique. Ces résultats indiquent que la $\text{iPLA}_2\gamma$ participe à la LTP glutamatergique de l'hippocampe en contribuant à l'insertion de récepteurs AMPA additionnels à la membrane des neurones. Les prochaines études sur le sujet devront élucider les modes de régulation de l'enzyme et par quels mécanismes son activité régule les récepteurs AMPA.

MOTS CLÉS : AMPA, électrophysiologie, hippocampe, LTP, mémoire, phospholipase A_2 , plasticité, rat.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 La potentialisation à long terme.....	1
1.1.1 L'hippocampe, siège de l'apprentissage et la mémoire.....	2
1.1.2 La LTP et les récepteurs au glutamate.....	4
1.1.3 La LTP nécessite l'exocytose de récepteurs AMPA à la membrane.....	8
1.1.4 Autres facteurs influençant la transmission synaptique.....	11
1.1.5 Hypothèse générale; quels sont les médiateurs du trafic de récepteurs AMPA?.....	13
1.2 Les phospholipases A ₂	15
1.2.1 Les PLA ₂ extracellulaires.....	15
1.2.2 Les PLA ₂ intracellulaires.....	16
1.2.3 Les cPLA ₂	17
1.2.4 Les iPLA ₂	17
1.2.5 Les iPLA ₂ assurent-elles le trafic de récepteurs AMPA?....	18
1.3 Hypothèses et objectifs du projet.....	19
1.4 Méthodologie.....	20
1.4.1 Inhibiteurs utilisés.....	20
1.4.2 Électrophysiologie et potentialisation.....	21
1.4.3 Dosages biochimiques des récepteurs AMPA.....	23

CHAPITRE II A NOVEL ROLE FOR CALCIUM-INDEPENDENT PHOSPHOLIPASE A₂ IN AMPA RECEPTOR REGULATION DURING LONG- TERM POTENTIATION.....24

2.1	Résumé.....	25
2.1.1	Contribution respective des auteurs de l'article.....	26
2.2	Abstract.....	26
2.3	Introduction.....	27
2.4	Materials and methods.....	28
2.4.1	Hippocampal slice preparation.....	28
2.4.2	Electrophysiology.....	29
2.4.3	Membrane preparation.....	30
2.4.4	Western blots.....	30
2.4.5	Membrane binding assays.....	31
2.4.6	Agents.....	31
2.4.7	Statistical analysis.....	32
2.5	Results.....	32
2.5.1	BEL prevents LTP induced by TBS.....	32
2.5.2	TBS-induced LTP is selectively blocked by (R)-BEL.....	34
2.5.3	BEL prevents NMDA-induced potentiation of fEPSPs and upregulation of AMPA receptors.....	37
2.6	Discussion.....	41
2.7	Acknowledgment.....	44
2.8	Abbreviations.....	44

CHAPITRE III DISCUSSION ET CONCLUSION.....45

3.1	Les iPLA ₂ et la potentialisation dans l'hippocampe.....	45
3.2	Biochimie des récepteurs AMPA.....	51
3.3	Les isoformes de iPLA ₂ et la LTP.....	55
3.4	Conclusions et perspectives.....	58

BIBLIOGRAPHIE.....61

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau 1.1 : Les trois grandes classes de PLA_2 et quelques une de leurs propriétés de base.....	16
---	-----------

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1.1 :	La LTP dans l'hippocampe.....	3
Figure 1.2 :	Déclenchement de la LTP par une stimulation de haute fréquence.....	5
Figure 1.3 :	Les récepteurs AMPA et NMDA.....	6
Figure 1.4 :	L'augmentation des courants AMPA lors de la LTP s'effectue par trois phénomènes.....	9
Figure 1.5 :	Structure générale d'un glycérophospholipide, majeur constituant des membranes neuronales.....	14
Figure 1.6 :	Les inhibiteurs de PLA₂ utilisés dans les différentes expérimentations	22

CHAPITRE II

Figure 2.1 :	Selective inhibition of TBS-induced LTP by BEL.....	33
Figure 2.2:	BEL does not alter the basic properties of synaptic transmission.....	35
Figure 2.3:	Effects of selective inhibitors for PLA₂s on TBS-induced LTP.....	36
Figure 2.4:	BEL abolishes NMDA-induced potentiation.....	38
Figure 2.5:	Upregulation of GluR1 levels and ³H-AMPA binding after NMDA application are abolished by BEL.....	40

CHAPITRE III

Figure 3.1 :	Le BEL n'affecte pas les PPSEs.....	47
Figure 3.2 :	La potentialisation chimique est légèrement diminuée en présence d'inhibiteur de cPLA₂.....	51
Figure 3.3 :	Mécanisme hypothétique de l'implication des iPLA₂ dans la LTP.....	57

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AA	acide arachidonique
AACOCF ₃	arachidonyl trifluorométhyl ketone
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionate
BEL	bromoenol lactone
BFA	brefeldin A
CaMKII	calcium/calmoduline-dépendante protéine kinase II
COX	cyclooxygénase
cPLA ₂	PLA ₂ dépendante de l'ion calcium
DAG	diacylglycérol
GABA	acide gamma aminobutyrique
GFP	protéine fluorescente verte
iPLA ₂	PLA ₂ indépendante de l'ion calcium
LTD	dépression à long terme
LTP	potentialisation à long terme
MAFP	méthyl arachidonyl fluorophosphonate
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMDA-LTP	potentialisation chimique induite par le NMDA
PAP-1	phosphatidate phosphohydrolase-1
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLA ₂	phospholipase A ₂
PPSEs	potentiels postsynaptiques excitateurs
PSD	densité postsynaptique
PtCho	phosphatidylcholine; aussi lysoPtCho pour lysophosphatidylcholine
RE	réticulum endoplasmique
sPLA ₂	PLA ₂ sécrétée
ST	stimulation de type thêta
STP	plasticité à court terme

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Le cerveau est le siège de la pensée, la mémoire et la personnalité. Bien qu'il ne représente que 2% du poids total du corps, il consomme plus de 20% de l'énergie produite au repos et contient entre 50 et 100 milliards de neurones. Ce réseau cellulaire forme plus d'un million de milliards de connexions (Bear et al., 1999). Une grande partie des connaissances de base sur la neurotransmission a été découverte par l'électrophysiologie. Cette technique mesure les paramètres électriques provoqués lors du passage de l'influx dans les cellules, ce qui a permis d'élaborer des modèles expérimentaux pour expliquer le fonctionnement des neurones. L'étude des membranes excitables des neurones bat toujours son plein et les méthodes de communication entre les neurones se précisent continuellement.

1.1 LA POTENTIALISATION À LONG TERME

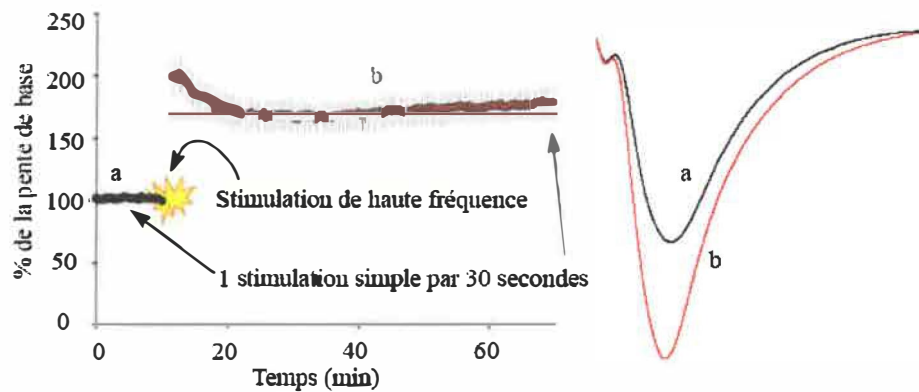
En 1973, Bliss et ses collègues (Bliss et Gardner-Medwin, 1973; Bliss et Lomo, 1973) observèrent qu'après une stimulation de haute fréquence, la grandeur de la réponse synaptique de certains neurones de lapin se trouvait augmentée. Ce phénomène, appelé la potentialisation à long terme (LTP), donna naissance aux bases physiologiques modernes de la mémoire, permettant d'expliquer comment l'information est traitée par le cerveau. Le concept de LTP démontra la validité du postulat de Hebb, selon lequel la communication entre deux neurones peut être modifiée par l'activité qui se produit entre ces mêmes neurones (Cooper, 2005). Suivant la logique de ce postulat, l'information cérébrale peut donc être stockée sous forme de synapses modifiées dans une configuration donnée. Cette capacité d'adaptation de la synapse suite à une expérience est nommée la *plasticité synaptique*. Ce modèle électrophysiologique d'adaptation cellulaire se produit dans la plupart des régions du cerveau et nous permet d'expliquer des phénomènes aussi divers que l'apprentissage ou la dépendance aux drogues (Lynch, 2004; Thompson et al., 2004).

1.1.1 L'hippocampe, siège de l'apprentissage et de la mémoire

Une structure sous-corticale a une importance fonctionnelle et structurelle : l'hippocampe. Le rôle de cette région du cerveau est de recevoir les informations cognitives qui transigent par le gyrus cingulaire, pour ensuite passer par les aires parahippocampiques et rhinales qui sont adjointes à l'hippocampe. Ces influx, une fois traités par l'hippocampe, sont ensuite redirigées via le fornix ou le cortex enthorinal, vers les régions corticales pertinentes où elles seront stockées à long terme, (FIGURE 1.1) (Bear et al., 1999). Un nombre considérable d'études suggèrent que le triage et l'acheminement des informations par l'hippocampe s'effectue en facilitant les synapses d'un trajet neuronal, soit par la LTP ou inversement par la dépression à long terme (LTD). Évidemment, tout dommage bilatéral (lésion, mort neuronale excessive) causé à l'hippocampe compromet les fonctions associées à l'apprentissage, la mémoire et la représentation spatiale (Lynch, 2004). En effet, des déficits spécifiques à certains types de mémoires (sémantique, spatiale, souvenirs à long terme) ont été observés chez le « patient H.M. », un individu ayant subi l'ablation bilatérale de l'hippocampe pour cause d'épilepsie sévère (Holscher, 2003). De plus, un dérèglement de l'hippocampe est symptomatique de plusieurs maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie et la schizophrénie (Antonova et al., 2004; Disterhoft et al., 2004; Sloviter, 2005). De façon générale et à la lumière des données acquises sur le sujet, l'hippocampe est perçu comme un *tampon mémoriel* transitoire à l'assimilation d'une mémoire à long terme (Lynch, 2004).

Les neurones de l'hippocampe montrent un haut niveau d'organisation (FIGURE 1.1). Les influx provenant des autres régions arrivent principalement par la voie perforante dans le gyrus dentelé. Les cellules granulaires stimulées projettent ensuite vers la région CA3 (fibres moussues). Les neurones de cette région ont de grandes projections axonales parallèles, les collatérales de Schaffer, qui croisent l'arbre dendritique des cellules pyramidales de la région CA1 (Kesner et al., 2004). Cette région dont le neurotransmetteur excitateur est le glutamate est particulièrement dense en

A



B

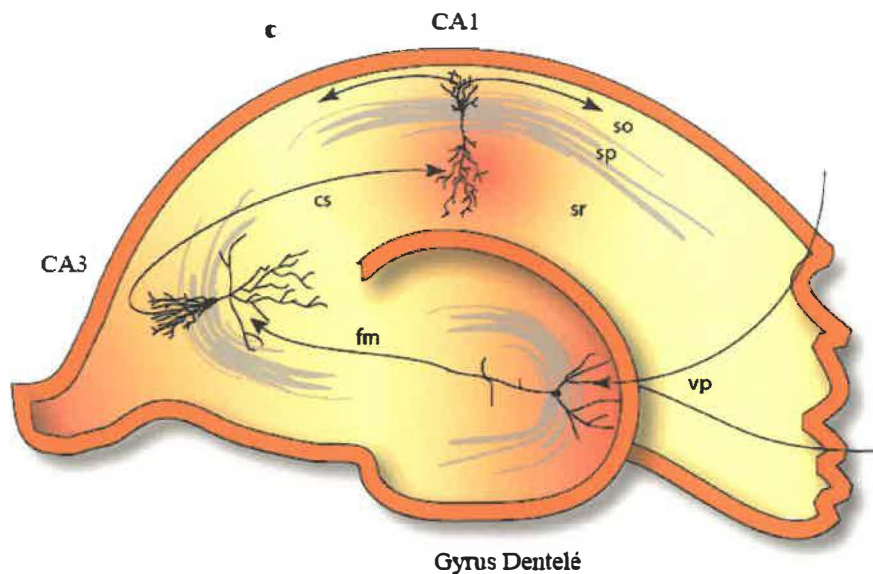


FIGURE 1.1 : La LTP dans l'hippocampe. A. La potentialisation à long terme. Les potentiels de champs, élicités par stimulations aux collatérales de Schaeffer et enregistrés dans le *stratum radiatum*, subissent une augmentation persistante suite à une stimulation de haute fréquence. **B.** Circuit général de la transmission nerveuse de l'hippocampe. Les axones des neurones pyramidaux du cortex entorhinal stimulent les cellules granulaires du gyrus dentelé via la voie perforante (vp). Cet influx se propage dans les fibres moussues (fm) aux neurones de CA3. Les axones de CA3, les collatérales de Schaeffer (cs), forment un réseau de synapses avec les dendrites des neurones pyramidaux de CA1. Ces neurones envoient leurs afférences vers le fornix (gauche) ou les retournent vers le cortex entorhinal (droite). Couche dendritique : *stratum radiatum* (sr). Couche des corps cellulaires : *stratum pyramidal*. Couche des axones : *stratum oriens*.

synapses. C'est dans cette région CA1 que la potentialisation à long terme a été découverte, et où les phénomènes d'induction y sont les mieux caractérisés.

1.1.2 La LTP et les récepteurs au glutamate

L'induction de la LTP se produit en 4 étapes qui recrutent différents protagonistes cellulaires (FIGURE 1.2).

Étape 1) Dans le CA1, la transmission excitatrice de base est assurée par les **récepteurs au glutamate de type AMPA** (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionate; FIGURE 1.3), perméables au sodium/potassium. Leur ouverture cause une entrée de sodium dans les neurones. Ces récepteurs sont composés de quatre sous-unités GluR1-4, qui se dimérisent symétriquement pour former le canal ionique (Matsuda et al., 2005). Dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, la plupart des récepteurs AMPA sont hétéromériques et composés de sous-unités GluR2 couplées à GluR1 ou GluR3 (Nagy et al., 2004; Sans et al., 2003). Les GluR2 exhibent une arginine chargée dans le pore et confèrent au récepteur une haute imperméabilité au calcium.

Étape 2) Lorsque survient une dépolarisation suffisante, induite notamment par une stimulation de haute fréquence, les **récepteurs au glutamate de type NMDA** (N-methyl-D-aspartate; FIGURE 1.3) **sont recrutés**. Les récepteurs NMDA, perméables au calcium, sont des hétéromères composés de 4 ou 6 sous-unités (NR1, NR2A-D, NR3A-B), dont les propriétés de conductance, de désensibilisation et de désactivation influencent les courants induits par ces récepteurs (Erreger et al., 2004; Mueller et Meador-Woodruff, 2005). Les récepteurs NMDA sont plutôt statiques par rapport aux AMPA, et on croit l'expression des différentes sous-unités des récepteurs NMDA liée au développement. Par exemple, durant la maturation du système nerveux central, la sous-unité NR2B est graduellement remplacée à la densité postsynaptique (PSD) par la NR2A, aux propriétés d'ouverture et de désensibilisation plus rapides (van Zundert et al., 2004). Cette maturation moléculaire fait état du rôle des récepteurs NMDA qui passent de médiateurs de la synaptogénèse à celui de médiateurs de la plasticité

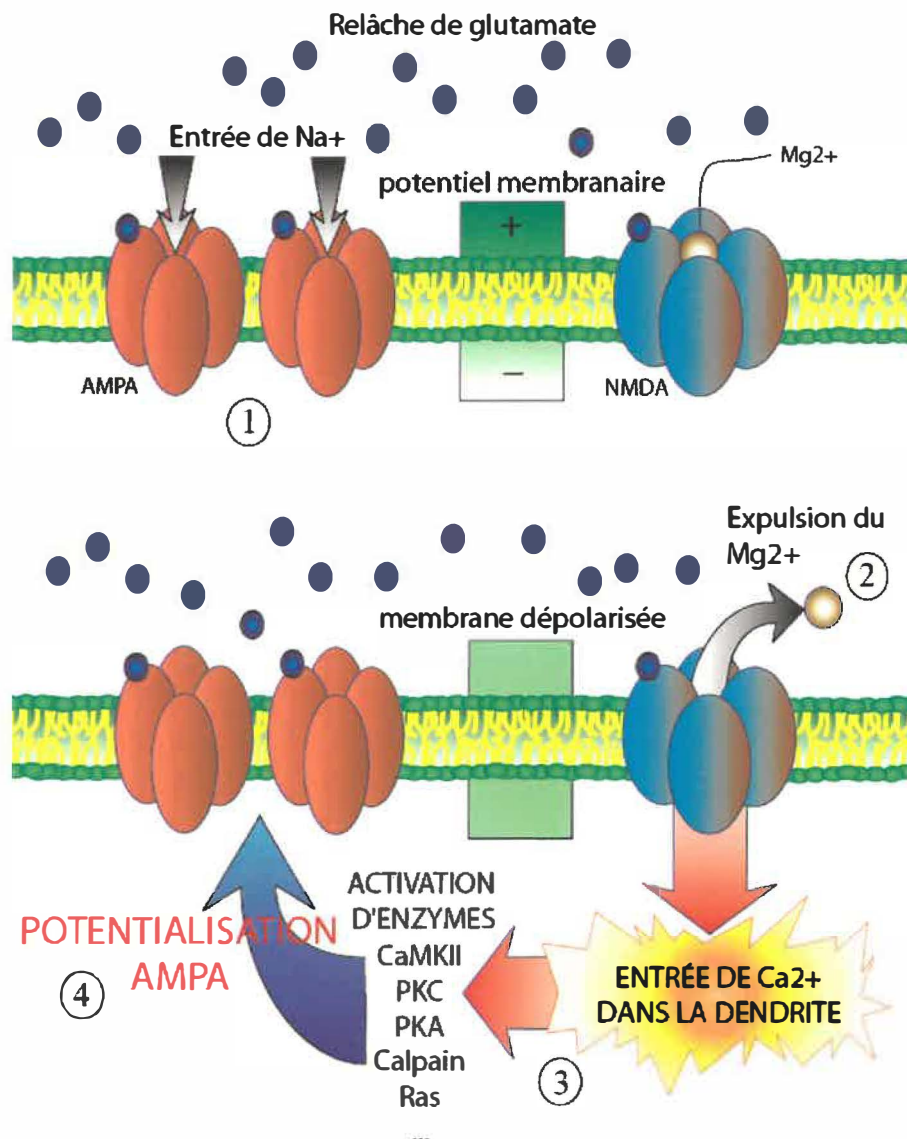


FIGURE 1.2 : Déclenchement de la LTP par une stimulation de haute fréquence. 1. Activation des récepteurs AMPA par le glutamate. Dépolarisation de la membrane plasmique. 2. Expulsion du magnésium et ouverture des canaux NMDA. 3. Influx calcique dans le cytoplasme post-synaptique. Activation d'enzymes calcium-dépendantes. 4. La contribution synaptique des récepteurs AMPA est augmentée de façon persistante.

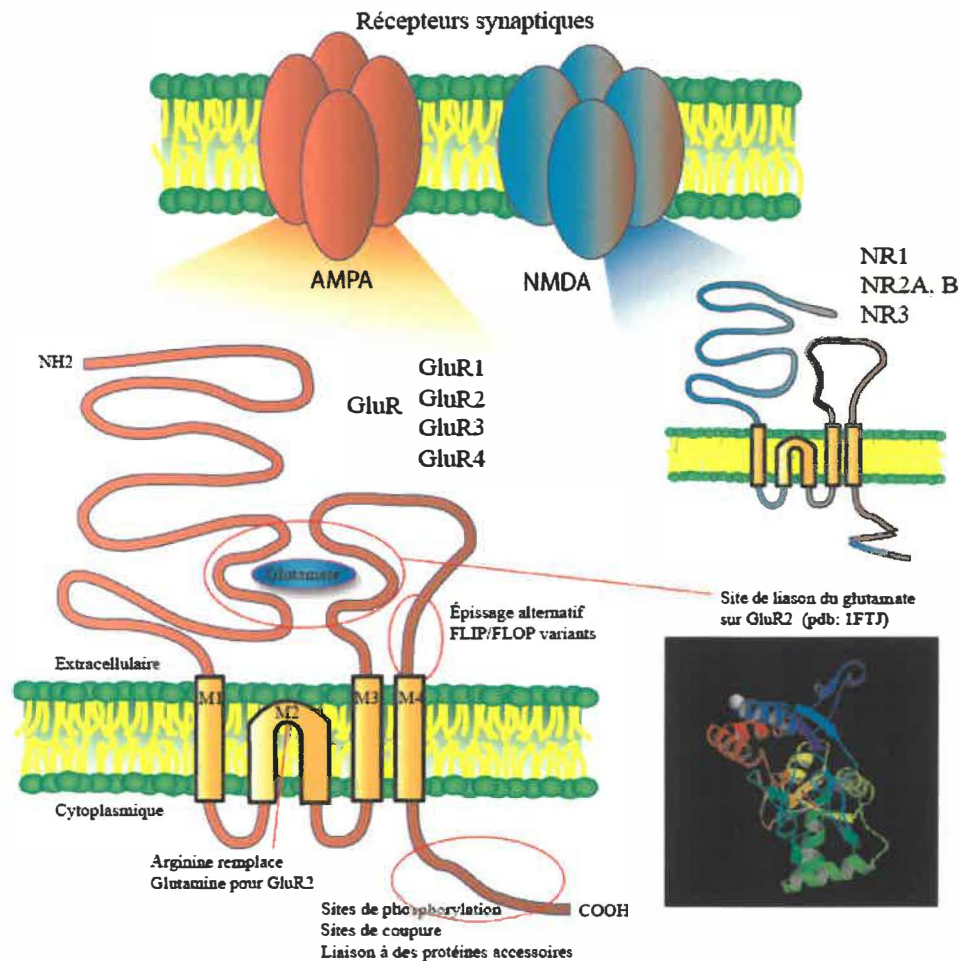


FIGURE 1.3 : Les récepteurs AMPA et NMDA. Les récepteurs AMPA et NMDA sont des récepteurs au glutamate ionotropiques. Ces canaux/récepteurs sont composés de plusieurs sous-unités, dont la portion N-terminale est extracellulaire alors que la queue C-terminale est cytoplasmique. Les sous-unités AMPA, nommées GluR1-4, ont chacune un site de liaison au glutamate, quatre domaines membranaires et plusieurs sites de régulation intracellulaire. Les mêmes caractéristiques peuvent être appliquées aux sous-unités NMDA (NR1-3), même si sur celles-ci plusieurs détails structurels –comme la configuration du site de liaison au glutamate- sont encore inconnus.

synaptique des neurones matures. Bien que plus sensibles au glutamate que les récepteurs AMPA, ils ne contribuent qu'à l'état de trace aux courants postsynaptiques basaux puisque le potentiel membranaire des neurones (environ -65 à -70mV) maintient le blocage de leur pore par les ions magnésium extracellulaires. Or, une stimulation de haute fréquence dépolarise la membrane neuronale suffisamment longtemps pour permettre une expulsion du Mg^{2+} et l'activation des récepteurs NMDA par le glutamate. Cette activation des récepteurs NMDA est essentielle à la LTP dans la région CA1 de l'hippocampe, d'où son appellation de LTP NMDA-dépendante.

Étape 3) Les récepteurs NMDA ainsi activés et libérés de l'ion magnésium bouchant leur pore permettent une **entrée de calcium** dans le cytoplasme du neurone pyramidal. Les cascades enclenchées par cet influx calcique sont encore controversées, en partie parce que une grande quantité de cascades métaboliques sont régulées directement ou indirectement par le calcium. Un élément indiscutablement essentiel à la formation de la LTP NMDA-dépendante est l'activation et l'autophosphorylation de la *calcium/calmoduline-dépendante protéine kinase II* (CaMKII) (Xia et Storm, 2005). Cette protéine très abondante dans les neurones (1-2% des protéines totales) devient constitutivement active lorsque phosphorylée et son activité de kinase persiste très longtemps après l'induction de la LTP par l'influx calcique (Poncer et al., 2002). Les cascades qui s'ensuivent sont mal caractérisées, quelques 28 substrats protéiques de la CaMKII ont été identifiés dans la PSD (Yoshimura et al., 2002). D'autres kinases, comme la protéine kinase C (PKC) et la protéine kinase A (PKA), sont aussi activées lors de la LTP. Toute cette activité cellulaire se conclue en une augmentation des courants ioniques dus aux récepteurs AMPA.

Étape 4) La synapse entre en **potentialisation à long terme -LTP**, un état synaptique réversible pouvant perdurer pendant des jours. Les hypothèses pour expliquer la hausse de potentiel postsynaptique due aux récepteurs AMPA ne manquent pas. Comme la LTP se produit sur une échelle de temps relativement courte, l'augmentation rapide de la contribution de récepteurs AMPA dans la membrane postsynaptique ne peut être le résultat d'une synthèse protéique ou de synaptogénèse. Ces phénomènes

interviennent plus tardivement (après quelques heures) et contribuent plutôt à la consolidation de la *mémoire* à long terme (Soderling et Derkach, 2000).

Comme la plupart des enzymes et des canaux protéiques sont hautement modulables par des ligands ou des modifications de leurs propriétés chimiques par d'autres enzymes, il est tout naturel de s'attendre à ce qu'un tel événement se produise au niveau des récepteurs AMPA. En effet, Benke et al. (1998) ont démontré que la phosphorylation de la sous-unité GluR1 des AMPA en position sérine 831 par la CamKII était en hausse lors de la LTP, et que cette modification augmentait la conductance des récepteurs. Cependant, des études subséquentes affirment que la contribution de la phosphorylation en position Ser831 est relativement petite et ne peut expliquer à elle seule l'augmentation des courants observés (Poncer et al., 2002) et même que la LTP peut se produire en son absence (Lee et al., 2003). De toute évidence, d'autres mécanismes sont à l'oeuvre dans la dendrite postsynaptique.

1.1.3 La LTP nécessite l'exocytose de récepteurs AMPA à la membrane

Bien que la phosphorylation des récepteurs sur leur partie C-terminale induit des changements de leurs propriétés biophysiques, elle influence aussi leur interaction avec des *protéines accessoires* pouvant se lier aux récepteurs, et constituer ainsi un signal de localisation subcellulaire. Chung et al. (2000) ont documenté à cet effet que la PKC activée phosphorylait la sérine 880 des sous-unités GluR2 à la synapse. Ces dernières subissent alors une internalisation due à une permutation de leur liaison de la protéine accessoire GRIP1 à PICK1; la première maintenant les récepteurs à la PSD et la seconde entraînant l'endocytose des récepteurs. Des observations de ce genre permettent d'envisager que les variations d'activité des enzymes activées lors d'une stimulation de haute fréquence (et de l'influx calcique conséquent), conduisent à une variation rapide de la quantité de récepteurs au glutamate présents dans la densité postsynaptique (FIGURE 1.4). L'association entre la LTP et l'insertion de récepteurs additionnels a été démontrée avec l'aide de récepteurs recombinants. En effet, la LTP induit l'augmentation de la quantité de GluR1 –conjugués à une protéine fluorescente verte

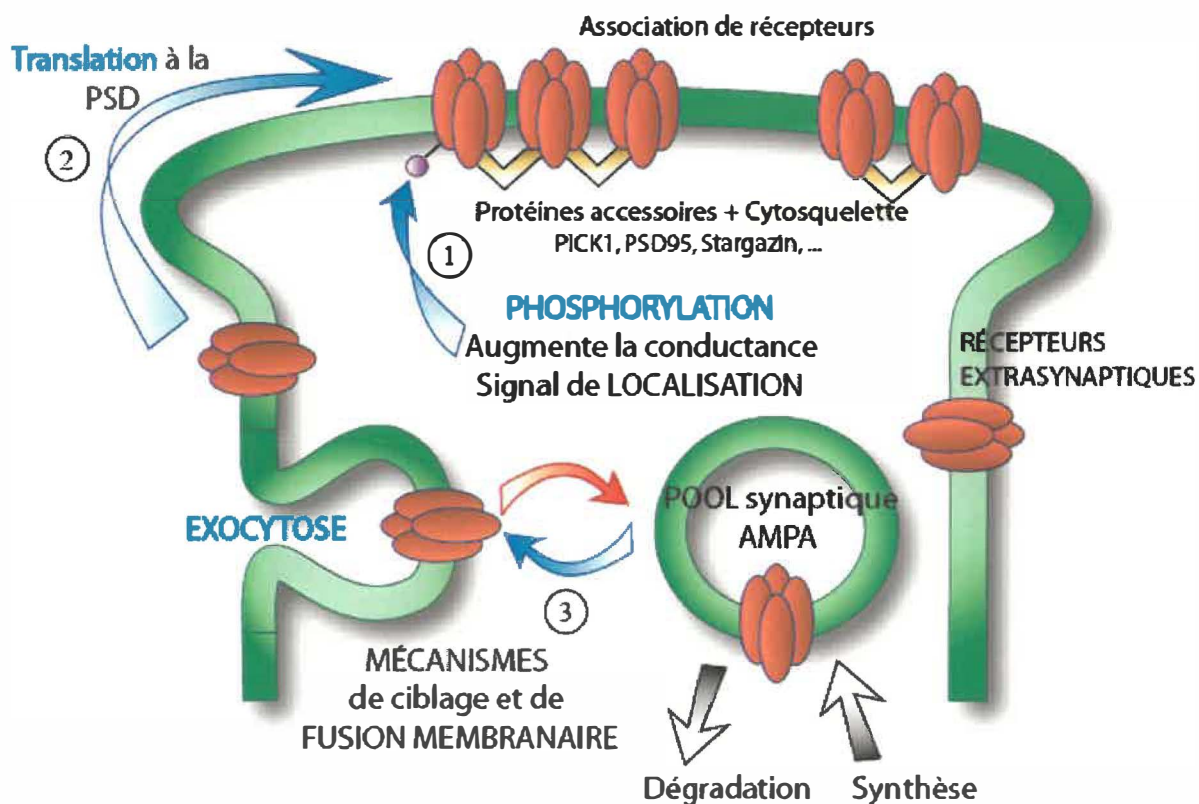


FIGURE 1.4 : L'augmentation des courants AMPA lors de la LTP s'effectue par 3 phénomènes. 1. Modulation des propriétés des récepteurs par la phosphorylation de la portion C-terminale. 2. Translation des récepteurs extrasynaptiques à la PSD. L'alignement pre- et postsynaptique augmente l'efficacité de la transmission. 3. Exocytose dynamique de récepteurs additionnels à la membrane. Les trois mécanismes sont possiblement complémentaires et nécessaires à la LTP.

(GFP; GFP-GluR1)- à la surface des dendrites de neurones en culture (Hayashi et al., 2000). Les mécanismes enzymatiques impliqués dans ce trafic sous-unités-spécifique de récepteurs sont largement méconnus.

Un modèle général accepté propose que les processus d'endo- et d'exocytose des récepteurs se produisent à des zones adjointes à la PSD, puis qu'une diffusion latérale

des récepteurs les amène à la PSD où ils forment des blocs denses couplés entre eux par des protéines accessoires ainsi que par le cytosquelette (Lisman, 2003). Ce modèle implique la présence d'un pool intracellulaire de récepteurs AMPA dans la dendrite et de mécanismes de régulation pouvant rapidement et spécifiquement les insérer (dans le cas d'une LTP). De tels pools subsynaptiques contenant des GluR1-3 et plusieurs protéines accessoires ont été identifiés (Lee et al., 2001). Comme les récepteurs AMPA sont sujet à un cycle continu entre de la membrane et le cytoplasme (Luscher et al., 1999), l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la PSD est-elle la conséquence d'une dérégulation du processus d'endocytose normal ou au contraire une augmentation de l'exocytose des AMPA dans la PSD?

Plusieurs études indiquent que l'exocytose induite est requise (Lu et al., 2001; Park et al., 2004). Un aperçu élégant des mécanismes de régulation conséquents à l'activation des récepteurs NMDA sur ces réserves AMPA a été fourni par Broutman et Baudry (2001). À l'aide d'un protocole de potentialisation chimique NMDA-dépendante (NMDA-LTP) permettant de potentialiser un très grand nombre de synapses de l'hippocampe, leur étude montre que la NMDA-LTP est accompagnée d'une augmentation de l'immunoréactivité des sous-unités GluR1 à 3 dans la fraction membranaire. Cette insertion de récepteur AMPA ne provient pas d'une synthèse protéique. De plus, elle est inhibée par la brefeldin A (BFA), un métabolite fongique qui cause la fusion du réticulum endoplasmique (RE) et du Golgi. La fusion de ces organites bloque les processus d'*exocytose* et de ce fait la potentialisation chimique et électrique (Klausner et al., 1992).

Tous ces phénomènes de fusion membranaire durant le recrutement du système Golgi/RE et du pool vésiculaire nécessitent d'autres processus enzymatiques. En plus des protéines de fusion identifiées (NSF, SNARE, SNAP, etc) (Braithwaite et al., 2000; Lu et al., 2001), qui constituent les signaux de localisation membranaire ou vésiculaire/RE/Golgi, les enzymes qui régulent ces processus en agissant sur la membrane sont peu caractérisées. Ces protéines font parties intégrantes des mécanismes

de plasticité; des perturbations de leur activité semblent être associées à plusieurs maladies neurodégénératives, tel qu'il le sera exposé plus loin.

En résumé, la potentialisation à long terme dans la région CA1 de l'hippocampe commence par l'activation postsynaptique des récepteurs AMPA (1) par une stimulation de haute fréquence. Cela induit l'activation des récepteurs NMDA (2), qui produisent une entrée de calcium dans le cytoplasme (3). Le calcium intracellulaire active plusieurs kinases et phosphatases, dont la CaMKII connue pour phosphoryler les sous-unités GluR1. La LTP est mise en place grâce à l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA dans la densité postsynaptique (4).

1.1.4 Autres facteurs influençant la transmission synaptique

Plusieurs autres acteurs entrent en jeu dans la transmission synaptique de l'hippocampe. Outre les récepteurs AMPA et NMDA, on retrouve les récepteurs au glutamate de type *kainate*. Ces récepteurs ionotropiques (i.e. canaux à ion) provoquent des courants sodium de moindre amplitude que les AMPA et modulent plus finement la transmission synaptique. Ils ont un rôle *présynaptique* dans l'induction de la LTP NMDA-indépendante aux synapses entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3 (Bortolotto et al., 1999). Dans CA1, les récepteurs kainates sont extrasynaptiques, donc ils ne contribuent pas directement aux événements synaptiques (Jaskolski et al., 2005).

Les mGluRs forment une classe de récepteurs au glutamate à part : ils sont *métabotropiques*, c'est-à-dire qu'ils agissent plutôt en générant un messager secondaire via l'activation d'une protéine G (protéine liant le GTP qui active d'autres protéines à proximité). Ceux-ci se retrouvent surtout au niveau des boutons présynaptiques, où ils modulent la relâche de glutamate (Bradley et al., 1996). Les types de plasticité générés dans l'hippocampe par ces récepteurs sont indépendantes de l'activation des récepteurs NMDA (Bashir, 2003). Entre autres, la LTP des cellules granulaires du gyrus dentelé

semble nécessiter le recrutement des mGluRs, ainsi que plusieurs plasticités atténuantes (dépression à long terme) (Riedel et al., 1996).

La dépression à long terme est l'antithèse de la LTP. Son induction est similaire à la LTP dans le sens où elle nécessite un influx calcique dans le cytoplasme. Une longue stimulation de basse fréquence provoque un influx de calcium faible et prolongé se produisant par l'entremise de récepteurs NMDA. À l'opposé de son homologue excitateur, la LTD provoque une diminution de la quantité de récepteur AMPA à la synapse (Carroll et al., 1999). Cependant, les mécanismes de régulation sont différents et les cascades enzymatiques ne sont évidemment pas les mêmes. Contrairement aux animaux immatures, les rats adultes ne font pratiquement pas de LTD *homosynaptique*, ou synapses-spécifiques, dans la région CA1 (Bear et Abraham, 1996). En fait, la disparition de cette forme de plasticité dans l'hippocampe corrèle avec la variation d'expression des sous-unités NMDA et suggère que cette plasticité a un aspect développemental qui pourrait guider la synaptogénèse dans cette région du cerveau (Erreger et al., 2005).

Seules les plasticités *persistantes* (LTP, LTD) ont été abordées jusqu'ici, mais une composante importante dans la modulation des influx nerveux est la *plasticité à court terme* (short-term plasticity; STP). La STP sert à moduler des influx nerveux rapprochés, pour faciliter ou diminuer la grandeur des stimulations subséquentes. De tels phénomènes impliquent des mécanismes présynaptiques qui modulent la relâche de neurotransmetteur (Zucker et Regehr, 2002). Cette plasticité de courte durée (0.1 milliseconde à quelques minutes) revêt une importance capitale à l'induction de la LTP puisqu'elle affecte la stimulation de haute fréquence, autant en facilitant les stimulations excitatrices répétées subites à la synapse qu'en réduisant la contribution inhibitrice inhérente (Arai et al., 1995). Autrement dit, la plasticité à court terme intensifie la stimulation de haute fréquence qui induit la LTP. Cette composante ne doit pas être négligée dans une étude électrophysiologique concernant la LTP.

Complémentaire à l'excitation glutamatergique, la contrepartie inhibitrice dans l'hippocampe est assurée par les interneurons, qui utilisent comme neurotransmetteur l'acide gamma aminobutyrique (GABA). Ces neurones sont relativement peu nombreux et forment un réseau autour des cellules principales (Freund et Buzsaki, 1996). Ils modulent l'excitabilité des cellules pyramidales par la relâche de GABA, qui provoque l'ouverture des récepteurs GABA_A perméables aux ions Cl⁻. L'entrée de chlore dans le cytoplasme hyperpolarise la membrane neuronale et limite l'excitabilité des canaux voltage-dépendants (Mody et Pearce, 2004). Par contre, les autorécepteurs GABA_B (présynaptiques) sont métabotropiques. Ils réduisent la relâche de GABA par les interneurons dans les 200 ms suivantes par l'intermédiaire d'une protéine G (Freund et Buzsaki, 1996). Comme mentionné plus haut, cette période réfractaire (plasticité à court terme) intensifie les stimulations tétaniques en diminuant l'inhibition (Arai et al., 1995).

1.1.5 Hypothèse générale; les phospholipases A2 médiatrices du trafic de récepteurs AMPA?

Comme mentionné précédemment, l'insertion des sous-unités AMPA exige la participation de mécanismes de régulation du trafic membranaire afin d'augmenter l'excitabilité des synapses des neurones pyramidaux. Les enzymes responsables du métabolisme des phospholipides qui composent les membranes sont les *phospholipases*. Ces enzymes sont classés selon la position où ils coupent les glycérophospholipides, constituants majeurs des membranes cérébrales (Farooqui et al., 2000). Comme montré à la FIGURE 1.5, les phospholipases D clivent au niveau des têtes polaires, les phospholipases C hydrolysent le lien entre le glycérol et le phosphate, les phospholipases A1 coupent l'acide gras en position *sn-1*, et les phospholipases A2 (PLA₂) l'acide gras en position *sn-2* (Brown et al., 2003). L'activation des récepteurs NMDA par des agonistes stimule la relâche d'acide arachidonique (AA) (O'Dell et al., 1991). Cet acide gras se retrouve en position *sn-2* des lipides et sa libération est effectuée par les PLA₂.

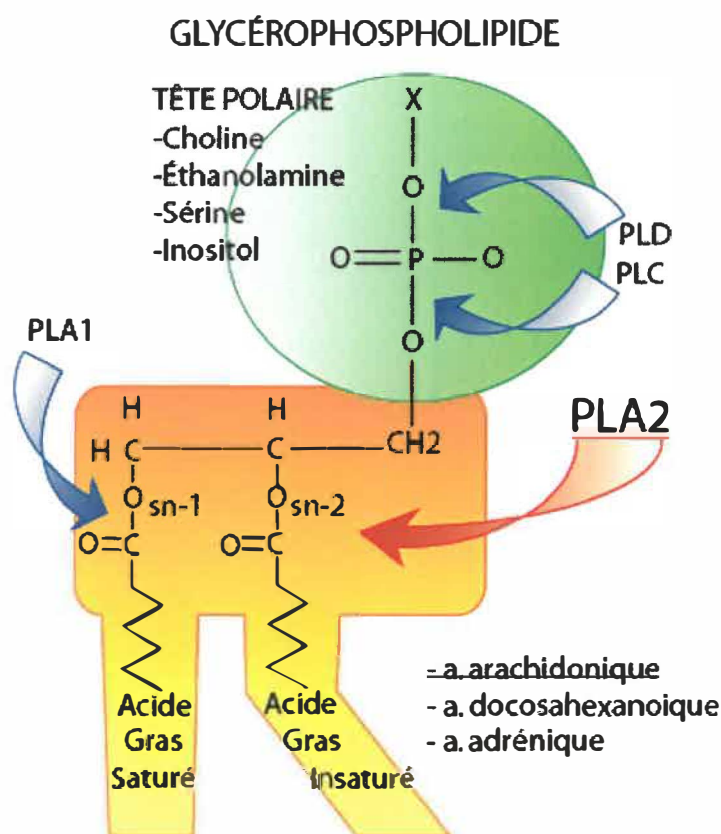


FIGURE 1.5 : Structure générale d'un glycérophospholipide, majeur constituant des membranes neuronales. Les différentes classes de phospholipases clivent la molécule à des endroits différents : la PLC et la PLD coupent la tête polaire avec ou sans le phosphate respectivement; les PLA₁ hydrolysent le lien en position *sn*-1 alors que les PLA₂ le font en *sn*-2. Elles libèrent ainsi un lysophospholipide et un acide gras insaturé, dont quelques exemples courants sont mentionnés.

Ces indices portent à croire que cette classe d'enzyme est activée lors des phénomènes de plasticité invoquant les récepteurs NMDA. Bref, ont-elles un rôle dans la LTP et le trafic des récepteurs AMPA?

1.2 LES PHOSPHOLIPASES A₂

Les PLA₂ sont une superfamille d'enzymes qui hydrolysent le lien ester des glycerophospholipides en position sn-2. Ce faisant, leur activité produit un acide gras souvent insaturé : comme l'AA, l'acide docosahexaénoïque et l'acide adrénique. Le deuxième produit de la réaction est un lysophospholipide dont la structure dépend de la phospho-base (choline, éthanolamine, inositol, sérine). Ce lysophospholipide peut être rapidement réacylé à un nouvel acide gras insaturé par les acyltransférases. Comme les acides gras insaturés sont sujets à l'oxydation, ce mécanisme de recyclage membranaire assure une intégrité et une fluidité constante à celle-ci (Kudo et Murakami, 2002). L'AA et la lysophosphatidylcholine (lysoPtCho) sont deux métabolites fréquents des PLA₂ et sont présents en faibles quantités dans les cellules non stimulées (Balsinde et al., 1999). C'est pourquoi on associe souvent les PLA₂ exclusivement aux cascades de l'inflammation. En effet, la conversion de l'AA en eicosanoïdes entraîne les réactions cellulaires de l'inflammation. De même, la lysoPtCho est un précurseur du *facteur d'activation des plaquettes* (platelet activating factor), un autre messenger de l'inflammation (Kudo et Murakami, 2002). En réalité, les fonctions des PLA₂ et de l'acide arachidonique au sein des différents types cellulaires sont d'autant plus diverses qu'on découvre régulièrement de nouvelles isoformes de PLA₂.

À ce jour, près de 20 isoformes de PLA₂ ont été identifiées chez le mammifère. Elles sont classifiées par groupes de I à XIV selon leurs structures moléculaires, mais plus généralement en trois grandes classes (Balsinde et al., 2002) (TABLEAU 1.1).

1.2.1 Les PLA₂ extracellulaires

Les PLA₂ dites *sécrétées* (groupes I-III, V, IX-XIV; sPLA₂) sont des enzymes de faible poids moléculaire (13-19 kDa) qui sont excrétées par les cellules. Elles n'ont aucune spécificité pour les différents phospholipides, utilisent une dyade aspartate/histidine pour catalyser l'hydrolyse des phospholipides et nécessitent une concentration de Ca²⁺ de l'ordre du millimolaire, à quelques exceptions près. Leurs

fonctions regroupent toutes les tâches de maintenance et de signalisation qui impliquent le feuillet lipidique extracellulaire ainsi que la digestion des lipides exogènes à la cellule-mère (Kudo et Murakami, 2002).

TABLEAU 1.1

Les trois grandes classes de PLA₂ et quelques une de leurs propriétés de base

Classe	Groupe	Dépendance au Ca²⁺	Isoformes confirmées dans le cerveau
sPLA₂ -extracellulaires-	I-III; V; VII-XIV	Dépendantes	Nombreuses
cPLA₂ -intracellulaires-	IV	Dépendantes, sauf l'isoforme γ	cPLA₂α cPLA₂β, cPLA₂γ
iPLA₂ -intracellulaires-	VI	Indépendantes	iPLA₂β iPLA₂γ

Concernant les neurones utilisant le neurotransmetteur glutamate, l'activité des sPLA₂ induit une augmentation présynaptique de la relâche de neurotransmetteur (Nishio et al., 1996) et amplifient les courants ioniques des récepteurs AMPA (Dev et al., 1997), le tout via la production d'acide arachidonique. Cependant, son implication dans la plasticité synaptique -notamment la LTP- n'est temporellement pas possible dans la phase d'induction et de mise en place puisque ce groupe de phospholipases est synthétisé *de novo* lorsque survient un signal cellulaire pertinent, ce qui est le cas dans l'ischémie cérébrale (Lauritzen et al., 1994).

1.2.2 Les PLA₂ intracellulaires

Les deux catégories restantes de PLA₂ sont présentes dans le cytoplasme cellulaire, soient les PLA₂ Ca²⁺-dépendantes (cPLA₂) et les PLA₂ Ca²⁺-indépendantes (iPLA₂). Contrairement aux sPLA₂ qui utilisent une histidine, leur site catalytique

comprend une sérine qui agit comme nucléophile lors de l'attaque du lien ester *sn-2* (Tanaka et al., 2004). Comme mentionné plus haut, ces protéines étaient autrefois catégorisées comme les productrices d'acide arachidonique, donc les responsables de l'inflammation et voire de la mort cellulaire. Les opinions sont maintenant tempérées depuis la caractérisation d'isoformes distincts, ainsi que leur localisation et implications dans d'autres phénomènes cellulaires (Murakami, 2004).

1.2.3 Les cPLA₂

Les PLA₂ dépendantes au calcium (cytosoliques PLA₂; cPLA₂; groupe IV) sont beaucoup plus massive que leur contrepartie sécrétée (environ 60-111 kDa) et nécessitent une quantité micromolaire de calcium, non pas pour assurer leur fonction lipasique, mais afin de lier leur domaine C2 à la membrane. Le motif C2 et certains résidus de leur portion C-terminale déterminent le lieu de translocation subcellulaire de l'enzyme (Malmberg et al., 2004). Par exemple, un isozyme de cette famille, la cPLA₂ α , est connue pour montrer une préférence pour la PtCho présente dans la membrane périnucléaire (Lucas et Dennis, 2004). Elle y serait couplée aux cyclooxygénases (COX), lesquelles produisent les prostaglandines, précurseurs de l'inflammation, et l'apoptose chez les cellules rénales HEK293 (Grewal et al., 2005).

1.2.4 Les iPLA₂

Les phospholipases A₂ indépendantes du calcium (iPLA₂; groupe VI) ont peu d'homologie structurelle avec les cPLA₂, mise à part la conservation de la séquence lipase consensus (GXSTG) (Tanaka et al., 2004). Découvertes bien plus récemment (premier isoforme purifié dans les macrophages P388D en 1994; (Ackermann et al., 1994), elles sont pourtant les responsables de la majorité de l'activité phospholipasique dans plusieurs type cellulaires. Les iPLA₂ ont une masse moléculaire d'environ 85 kDa et comme leur nom l'indique, leur activité ne dépend pas directement la présence de calcium. Bien au contraire, Wolf et Gross (1996) ont découvert que le calcium induit l'association de la iPLA₂ β à la calmoduline, laquelle inhibe son activité. Cet isoforme se

trouve donc spécifiquement activée lorsque les réserves de calcium intracellulaire sont épuisées.

Dans le cerveau et plus spécifiquement l'hippocampe, la iPLA₂ est la forme prédominante de phospholipase (Yang et al., 1999). Son rôle au sein des neurones -ou plutôt le rôle de chacun des isozymes iPLA₂- n'est pas connu. Pourtant des perturbations de l'activité des iPLA₂ sont associées à plusieurs neuropathies, dont la maladie d'Alzheimer et la schizophrénie, où l'activité iPLA₂ est détectée comme déficiente ou exagérée, respectivement (Farooqui et al., 2000). Parallèlement, la plasticité synaptique semble aussi nécessiter l'activité des iPLA₂. En effet, l'inhibition des iPLA₂ provoque une déficience de la LTP induite par stimulation 100 Hz (et non de la LTD) dans l'hippocampe, de même qu'un déficit de la mémoire spatiale chez les souris (Fujita et al., 2000; Wolf et al., 1995). Ces informations suggèrent que les iPLA₂ sont impliquées dans les processus d'apprentissages et de mémorisation, et qu'une perturbation de leur régulation nuit à l'expression des phénomènes de plasticité comme la LTP.

1.2.5 Les iPLA₂ assurent-elles le trafic des récepteurs AMPA?

D'après les études énumérées ci-haut, les PLA₂ intracellulaires, et plus particulièrement les iPLA₂, semblent avoir un rôle dans la LTP NMDA-dépendante. Fait intéressant, ces enzymes sont de plus en plus reconnues comme des médiatrices importantes aux phénomènes de trafic membranaire (Brown et al., 2003). Ainsi, l'inhibition des PLA₂ bloque la fusion d'endosomes purifiés (Mayorga et al., 1993), ce qui sous-entend l'implication des PLA₂ dans les processus d'endocytose. L'exocytose calcium-dépendante des cellules bêta pancréatiques de souris est similairement réduite lors d'une inhibition des PLA₂ (Juhl et al., 2003). Le contact entre les membranes lors d'un tel processus est l'évènement central de la fusion membranaire (Burger, 2000). L'apparition de « défauts » structurels dans la membrane, tels que les lysophospholipides et les acides gras libres, facilite l'union des biomembrane -une action énergétiquement défavorable et non spontanée (Burger, 2000). Mieux encore, la

génération localisée de ces produits peut stimuler la courbure des membranes et initier la partition de domaines.

Dans cet ordre d'idée, l'activité des iPLA₂ est essentielle à la communication entre le RE et le Golgi. Ces compartiments cellulaires forment entre eux des tubules membranaires pour acheminer les lipides et les protéines du RE où ils sont finalisés, jusqu'au Golgi où ils sont compartimentés et adressés (de Figueiredo et al., 1998). La contribution de la iPLA₂ à la formation de ces tubules, possiblement en initiant les courbures membranaires, est démontrée par la BFA. Comme mentionné précédemment, ce métabolite fongique provoque la fusion ER/Golgi en entraînant une formation démesurée de tubules. L'inhibition des iPLA₂ rend impossible l'action de la BFA en empêchant la formation des tubules de membrane entre ces organites (de Figueiredo et al., 2000).

Récemment, un isoforme de iPLA₂ associé au RE a été identifié dans plusieurs types cellulaires, dont trois lignées cellulaires humaines et des microsomes de cerveau de rat et de lapin (Kinsey et al., 2005). Cet isoforme localisé, la iPLA₂ γ , protégerait le RE des dommages oxydatifs en inhibant la peroxydation lipidique. Conjointement avec les informations obtenues avec la BFA sur la formation des tubules, cette RE-iPLA₂ pourrait être une candidate de choix à la régulation du pool vésiculaire de récepteurs AMPA dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe.

1.3 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET

D'un point de vue général, les recherches exposées ici tentent d'éclaircir les mécanismes de formation de la potentialisation des récepteurs AMPA (LTP). Comme plusieurs études indiquent que les iPLA₂ influencent divers processus neuronaux, notre approche expérimentale consiste en l'observation de la régulation des récepteurs au glutamate par les iPLA₂ lors de la LTP.

Comme rapporté plus haut, l'inhibition des iPLA₂ empêche la LTP induite par une stimulation 100 Hz (Wolf et al., 1995). Or, la stimulation endogène qui se produit dans l'hippocampe des rongeurs pour produire la LTP est une stimulation de type thêta (ST). Cette stimulation de haute fréquence –plus complexe– induit la LTP dans l'hippocampe de façon optimale. Dans certaines études, on rapporte que certains traitements causant l'abolition de la LTP-100 Hz ne perturbent pas ou différemment la LTP-ST (Nguyen et al., 2000). La première hypothèse posée suppose donc que l'inhibition des iPLA₂ résulte en une défaillance de la LTP induite par ST. L'objectif sous-jacent est de provoquer la LTP par une ST en présence ou en absence d'inhibiteurs des iPLA₂, le tout étant effectué en électrophysiologie en potentiel de champs.

Ensuite, vu la présence de plusieurs isoformes de iPLA₂ dans l'hippocampe, chacune ayant probablement une fonction et une localisation spécifique au sein des cellules, il est pertinent de supposer qu'une isoforme de iPLA₂ en particulier est nécessaire à la potentialisation des récepteurs AMPA. Cette hypothèse est vérifiée en inhibant sélectivement les isoformes iPLA₂, puis en tentant d'induire la LTP.

Finalement, ces enzymes sont impliqués dans la communication inter-organites et la fusion membranaire dans plusieurs systèmes cellulaires; les iPLA₂ ont donc possiblement un rôle dans le trafic subcellulaire des récepteurs AMPA. La troisième hypothèse est que l'isoforme iPLA₂ nécessaire à la LTP l'est comme médiatrice de l'insertion de récepteurs AMPA additionnels lors de la LTP. Cela est déterminé en analysant la quantité synaptique des récepteurs AMPA lors de la potentialisation des synapses de l'hippocampe, avec ou sans inhibiteurs de iPLA₂.

1.4 MÉTHODOLOGIE

1.4.1 Inhibiteurs utilisés

Beaucoup d'études portant sur les PLA₂ intracellulaires ont été effectuées avant la découverte de plusieurs isoformes des PLA₂ et avec l'aide d'inhibiteurs peu

spécifiques, comme le bromophenacyl bromide qui inhibe autant les PLA₂ intracellulaires que sécrétées (Balsinde et al., 1999). Afin de discerner le rôle des multiples isoformes de PLA₂, un arsenal de produits pharmacologiques de plus en plus spécifiques a été récemment développé pour les inhiber (FIGURE 1.6).

Les isoformes de cPLA₂ sont spécifiquement et irréversiblement inhibées par l'arachidonyl trifluorométhyl ketone (AACOCF₃, IC₅₀ = 8 µM). À plus haute concentration, cet inhibiteur affecte les iPLA₂ (IC₅₀ = 15µM). Le méthyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) cible les PLA₂ intracellulaires (Balsinde et al., 1999). L'isozyme iPLA₂γ n'est pas sensible au MAFP. L'inhibiteur le plus utilisé pour cibler les iPLA₂ est le bromoenol lactone (BEL, IC₅₀ = 1-3 µM ; aussi connu comme haloenol lactone suicide substrate, HELSS). Toutefois, ce produit n'affecte pas la cPLA₂γ -qui fait parti de la famille iPLA₂. Récemment, Jenkin et al. (2002) ont isolé les énantiomères (R)-BEL et (S) par chromatographie liquide à haute pression chiralité-spécifique. Ces énantiomères montrent une remarquable spécificité pour la iPLA₂γ et iPLA₂β respectivement. Tel qu'illustré à la FIGURE 1.6, l'utilisation d'une combinaison de ces composés permet de cribler efficacement un des enzymes.

1.4.2 Électrophysiologie et potentialisation

L'observation des conséquences de l'inhibition des différentes PLA₂ sur la LTP est faite par l'électrophysiologie en potentiel de champs. Cette technique détecte les mouvements ioniques d'une population de synapses suite à une stimulation électrique voisine, le tout sur des tranches transversales d'hippocampe de rat. Les potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSEs) recueillis sont proportionnels à l'activité des récepteurs AMPA aux synapses à proximité de l'électrode d'enregistrement. La LTP est induite par une stimulation de type thêta (10 trains de stimulations à 5 Hz, chacun contenant 4 stimulations à 100 Hz). Comme cette LTP n'est provoquée qu'aux quelques synapses stimulées, les modifications des récepteurs au glutamate qui s'y produisent sont trop peu importants dans le tissu entier.

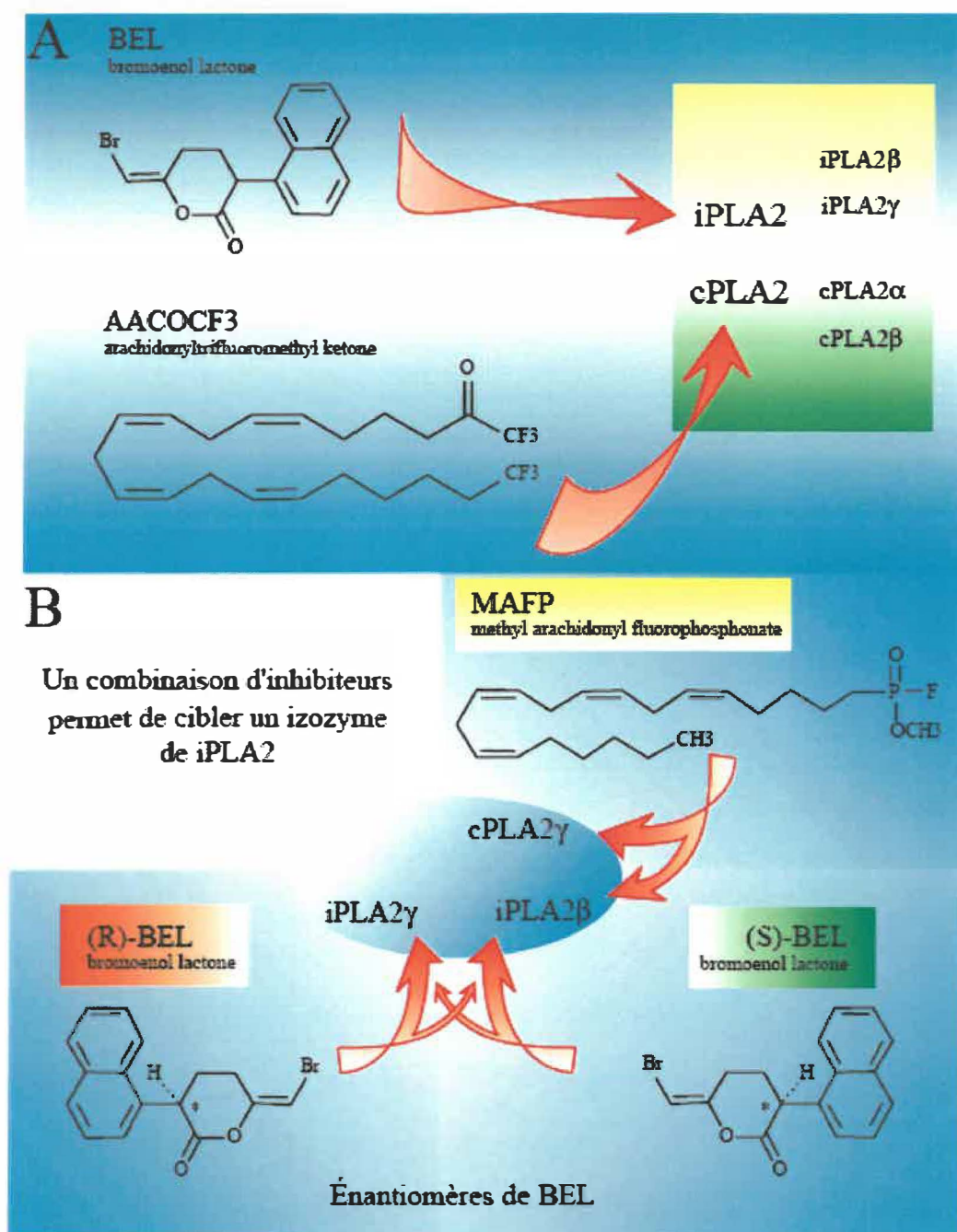


FIGURE 1.6 : Les inhibiteurs de PLA₂ utilisés dans les différentes expérimentations. A. Le BEL et le AACOCF₃ sont des inhibiteurs généraux des iPLA₂ et des cPLA₂, respectivement. **B.** Le MAFP et les énantiomères de BEL ciblent préférentiellement différentes isoformes de iPLA₂, ce qui permet de déterminer l'implication de chacune des formes de l'enzyme.

Le modèle de potentialisation chimique développé par Broutman et Baudry (2001) procure une occasion de potentialiser une grande quantité de synapse de l'hippocampe. Ce protocole permet d'observer une potentialisation mesurable en électrophysiologie, de même que de mesurer les altérations en récepteurs AMPA. La potentialisation chimique s'effectue par une courte application de NMDA au milieu extracellulaire. Ainsi, l'application d'inhibiteurs de PLA₂ intracellulaires permet donc d'établir si, et laquelle des iPLA₂ est impliquée dans la LTP hippocampique, et si cette implication est nécessaire à la régulation des récepteurs AMPA en particulier.

1.4.3 Dosages biochimiques des récepteurs AMPA

L'analyse biochimique subséquente de la fraction membranaire du tissu procure ensuite un dosage semi-quantitatif des proportions synaptiques des récepteurs AMPA. Selon l'hypothèse avancée, l'inhibition de la forme supposée de iPLA₂ associée au réticulum endoplasmique, la iPLA₂ γ , empêche à la fois la potentialisation à long terme induite électriquement et chimiquement. Ce phénomène est vraisemblablement accompagné d'une perturbation des mécanismes d'insertion de récepteurs. Les dosages biochimiques (immunobuvardage de type Western dirigés vers GluR1 ainsi que le comptage de liaison au ³H-AMPA) permettent de mesurer cette obstruction du trafic membranaire en bloquant les augmentations provoquées par la potentialisation chimique. Une caractérisation de la PLA₂ responsable du trafic membranaire permettra d'élaborer sur les voies d'activation possible de cet enzyme, en tenant compte de sa localisation et sa fonction au sein des neurones de la région CA1 de l'hippocampe.

CHAPITRE II

A NOVEL ROLE FOR CALCIUM-INDEPENDENT PHOSPHOLIPASE A₂ IN AMPA RECEPTOR REGULATION DURING LONG-TERM POTENTIATION

Marc-André MARTEL[†], Christian PATENAUDE[‡], Brian S. CUMMINGS[¶]
and Guy MASSICOTTE^{†‡}

[†] Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada

[‡] Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

[¶] Department of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, College of Pharmacy,
University of Georgia, Athens, GA 30602

Corresponding author address: Dr. Guy Massicotte
Département de chimie-biologie
Université du Québec à Trois-Rivières
3351, boul. des Forges, C.P. 500
Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7
Phone (819) 376-5053
Fax (819) 376-5084
Email: guy_massicotte@uqtr.ca

Running title: iPLA₂ and synaptic plasticity

Number of pages: 29; Figures: 5

Number of words: Whole manuscript: 6,663; Abstract: 210; Introduction: 495

Key words: Hippocampus, synaptic plasticity, rat, PLA₂ inhibitors, fEPSPs

Soumis à European Journal of Neuroscience le 28 juin 2005

2.1 RÉSUMÉ

Plusieurs indices suggèrent que les phospholipases A₂ (PLA₂) participent à la LTP de la transmission synaptique excitatrice. Dans la présente étude, nous avons déterminé que la PLA₂ indépendante de l'ion calcium contribue à la LTP hippocampique du rat. De plus, l'isoforme de iPLA₂ responsable de cette plasticité synaptique a été identifié. Avec l'aide d'enregistrements d'électrophysiologie en potentiel de champ dans la région CA1 des tranches d'hippocampe de rat, nous avons observé que la LTP des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSEs), induite par une stimulation thêta, était abolie par l'inhibiteur de iPLA₂ bromoenol lactone (BEL). Cette absence de potentialisation ne s'est pas produite en présence d'arachidonyl trifluorométhyl kêtone, un inhibiteur de PLA₂ dépendantes au calcium. La phase d'induction de la LTP n'a pas été affectée par l'inhibition des iPLA₂ puisque la présence de BEL n'a pas eu d'effet sur la magnitude des facilitations des PPSEs mesurées durant la stimulation tétnique. De plus, le (R)-BEL, un inhibiteur enantio-sélectif de la iPLA₂γ, a empêché de façon similaire la LTP induite par stimulation thêta. Cet effet n'a pas été reproduit par les inhibiteurs de la iPLA₂β, soit le (S)-BEL et le méthyl arachidonyl fluorophosphonate. Nous avons aussi découvert que le BEL prévenait la potentialisation des PPSEs provoquée par une brève exposition à 50 μM N-méthyl-D-aspartate (NMDA). De même, le BEL a renversé l'augmentation de l'immunoréactivité de sous-unités GluR1 des récepteurs alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-propionate (AMPA) et la hausse de liaison du ³H-AMPA dans les fractions de membranes synaptiques, augmentations associées à la potentialisation induite par le NMDA. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la plasticité synaptique hippocampale est dépendante de la iPLA₂γ, un enzyme qui induit l'insertion de récepteur AMPA additionnels aux membranes synaptiques lors de la LTP.

2.1.1 Contribution respective des auteurs de l'article

L'article a été rédigé par Marc-André Martel, Dr Christian Patenaude et Dr Guy Massicotte. L'isolation des énantiomères de BEL a été effectuée par le Dr Brian S. Cummings. Toutes les autres expériences ont été faites par Marc-André Martel.

2.2 ABSTRACT

A considerable body of evidence indicates that phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes participate in long-term potentiation (LTP) of excitatory synaptic transmission. In the present study, we have undertaken experiments to determine how the calcium-independent forms of PLA₂ (iPLA₂) contribute to rat hippocampal LTP and identify the iPLA₂ isoforms involved in synaptic plasticity. Using field recordings from rat CA1 hippocampal slices, we found that theta burst-induced LTP of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) was abolished by the iPLA₂ inhibitor bromoenol lactone (BEL) but not by the Ca²⁺-dependent PLA₂ inhibitor arachidonyl trifluoromethyl ketone. The induction phase of LTP was not affected during iPLA₂ inhibition since BEL by itself had no effect on the magnitude of facilitation during burst responses. In addition, (R)-BEL, an enantioselective inhibitor of iPLA₂ γ , precluded theta burst-induced LTP, an effect that was not replicated by the iPLA₂ β inhibitors (S)-BEL and methyl arachidonyl fluorophosphonate. BEL was also found to prevent the potentiation of fEPSPs elicited by brief exposure to 50 μ M N-methyl-D-aspartate, as well as the associated upregulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate (AMPA) receptor GluR1 subunit levels and the increase in ³H-AMPA binding in crude synaptic fractions. Collectively, these results suggest that hippocampal synaptic plasticity is dependent on iPLA₂ γ , an enzyme which presumably favours the insertion of new AMPA receptors at synaptic membranes.

2.3 INTRODUCTION

Phospholipases A₂ (PLA₂s) are a large and diverse superfamily of enzymes that catalyze the hydrolysis of glycerophospholipids at the *sn*-2 position to generate lysophospholipids and free fatty acids (Kudo et Murakami, 2002). More than 20 PLA₂ isoforms have been identified and classified in 3 groups, namely, the cytosolic calcium-dependent group (cPLA₂), the calcium-independent group (iPLA₂), and the secretory group (sPLA₂). Functionally, these enzymes are well-known for their involvement in the regulation of inflammation, immune function and smooth muscle contraction through the generation of arachidonic acid (AA) and its subsequent metabolism to eicosanoids (prostaglandins, leukotrienes, etc.) via cyclooxygenases and lipoxygenases (Kudo et Murakami, 2002; Leslie, 2004). Furthermore, there are some indications that iPLA₂ have major impacts on intracellular membrane trafficking events, since iPLA₂ activity was reported to play an important role in the membrane fusion process of exocytosis during isoproterenol-, forskolin-, and cAMP-induced amylase release in parotid acinar cells (Takuma et Ichida, 1997). In addition, iPLA₂ inhibitors were found to prevent tubule formation in the Golgi complex (de Figueiredo *et al.*, 1998) and to induce dispersion of the Golgi apparatus (Kuroiwa *et al.*, 2001).

In the hippocampus, iPLA₂ represents the predominant constitutive phospholipase activity (Wolf *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1999). From a pharmacological perspective, 3 calcium-independent PLA₂ isoforms (iPLA₂β, iPLA₂γ and cPLA₂γ) can be distinguished according to their sensitivity to inhibitors. For instance, bromoenol lactone (BEL) is known to inhibit iPLA₂β and iPLA₂γ but not cPLA₂γ (Mancuso *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1999), methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) blocks cPLA₂γ and cytosolic iPLA₂β activities (Lio *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 2002), and the enantiomers (S)-BEL and (R)-BEL inhibit iPLA₂β and iPLA₂γ, respectively (Jenkins *et al.*, 2002). Using this approach, Kinsey *et al.* (2005) reported that these 3 isoforms may be present in rat brains. Although little is known about iPLA₂ functions in neurons, a growing body of evidence suggests their involvement in long-term potentiation (LTP) of excitatory synaptic transmission through the generation of AA

(Fujita et al., 2001; Wolf et al., 1995), which has initially been proposed to act as a retrograde messenger to modify transmitter release during the maintenance of hippocampal LTP (Drapeau et al., 1990; Williams et al., 1989). From a postsynaptic viewpoint, translocation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate (AMPA) receptors from intracellular compartments to synaptic membranes appears to be a crucial step in LTP expression (Hayashi *et al.*, 2000), and the influence of iPLA₂ activity on this phenomenon has not yet been documented.

In the current investigation, we first used specific inhibitors to unravel the iPLA₂ isoform implicated in LTP formation elicited by a theta-burst stimulation (TBS) paradigm in the CA1 hippocampal area. Moreover, since iPLA₂ enzymes are known to regulate several trafficking events of cells (for review see Brown *et al.*, 2003), particular attention was given to the influence of iPLA₂ inhibition on insertion of AMPA receptors at the cell surface following N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced potentiation in CA1 hippocampal slices (Broutman et Baudry, 2001; Lu et al., 2001; Pickard et al., 2001).

2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Hippocampal slice preparation

Male Sprague-Dawley rats (2 to 3 months old) were decapitated after brief anesthesia with AErrane (isoflurane; Baxter Corporation, Toronto, ON). Their brains were rapidly removed and placed in ice-cold cutting buffer of the following composition (in mM): NaCl, 124; KCl, 3; KH₂PO₄, 1.25; CaCl₂, 1; MgSO₄, 3; NaHCO₃, 26; glucose, 10; and saturated with carbogen (95% O₂ / 5% CO₂). Hippocampi were dissected, and transverse 350 μM-thick slices were prepared with a McIlwain tissue chopper. In all cases, the CA3 region was surgically removed to avoid drug-induced epileptiform activity. The slices were placed on a nylon mesh in a liquid-gas interface recording chamber and continuously perfused at 1.5 ml/min with preheated (32 ± 1°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): NaCl 124; KCl 3; KH₂PO₄ 1.25; CaCl₂ 3; MgSO₄ 1; NaHCO₃ 26; and glucose 10, while the upper surface of the chamber was

exposed to humidified carbogen. The slices were allowed to recover for at least 1 h before experimental recordings began.

2.4.2 Electrophysiology

Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were evoked by a bipolar stimulating electrode (twisted nichrome wires, 65 μm), recorded in the CA1 stratum radiatum with a glass microelectrode containing 2M NaCl, and digitized by NAC 2.0 software (Theta Burst Corp., Irvine, CA). Stimulation consisted of a 0.1 ms-duration pulse delivered every 30 s (0.033 Hz) with the current intensity adjusted to obtain 40-50% of maximal fEPSPs. After 10 min of baseline stimulation, electrical LTP was induced by TBS, which consisted of 10 stimulus trains given at 5 Hz, each train containing 4 pulses (0.1-ms duration) at 100 Hz. Stimulation then returned to baseline, and fEPSPs were recorded for at least another 40 min. In almost all experiments, 2 independent pathways, one on each side of the recording electrode, were stimulated alternatively every 15 s. Evoked responses were averaged immediately or 40 min after TBS and were compared to those acquired during the baseline period. The involvement of PLA₂ in TBS-induced LTP was assessed by applying BEL (iPLA₂ inhibitor), MAFP (iPLA₂ and cPLA₂ inhibitor) and arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃; cPLA₂ inhibitor) in the perfusion solution for 30 min prior to and 30 min after TBS. The responses generated by TBS were compared in control slices and in slices treated with BEL. The area defined by the response envelope of the bursts was measured and calculated as a percent of the value of the first burst response. In some experiments, antidromic stimulation was delivered in the stratum oriens, and population spikes were recorded in the pyramidal cell layer before and after drug application. Paired stimuli were given at various intervals (ranging from 50 to 400 ms), and paired-pulse facilitation (PPF) was determined by comparing the peak amplitude of the second fEPSP relative to the first ($\text{fEPSP}_2/\text{fEPSP}_1 \times 100$).

In subsets of hippocampal slices, chemical LTP was induced after 10 min of baseline fEPSP recordings by 3-min application of ACSF containing 50 μM NMDA

(Broutman et Baudry, 2001). As in the TBS-induced LTP experiments, hippocampal slices were treated with BEL for 30 min prior to and 30 min after NMDA application to establish if this form of plasticity also depended on iPLA₂ activity. In these experiments, slices were collected at the end of recording, placed in ice-cold homogenization solution (320 mM sucrose, 10 mM EDTA, 0.01 mM leupeptin) and kept at -70°C.

2.4.3 Membrane preparation

Crude synaptic membranes were prepared from previously-frozen hippocampal slices as described by Broutman and Baudry (2001). The slices were homogenized with a glass-Teflon homogenizer and centrifuged at 24,000 x g at 4°C for 20 min. The pellet was resuspended in distilled water containing 100 µM EGTA and again centrifuged (at 24,000 x g at 4°C for 20 min). This step was repeated, and the pellet was resuspended in Tris-acetate buffer (100 mM with 100 µM EGTA, pH 7.4). The samples were finally washed twice by centrifugation at 24,000 x g and resuspended in Tris-acetate buffer to a final concentration of 1-2 µg/µl, then processed for Western blotting or binding assay.

2.4.4 Western blots

After the determination of protein concentration by Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA), similar amounts of proteins from the homogenates or crude synaptic membranes were subjected to sodium dodecyl sulfate-8% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes. After 1h of incubation at room temperature in PBS containing 5% dry non-fat milk, the membranes were incubated with primary antibodies directed against the C-terminal domain of the AMPA receptor GluR1 subunit (dilution 1:1,000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) for 1h in PBS with 5% non-fat milk at room temperature. Immunostaining was then detected by incubation with a peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and a chemiluminescent peroxide substrate (MJS Biolynx, Brockville, ON). The immunoblots were placed on a Northern light illuminator, and the

resulting computer-generated images were analyzed semi-quantitatively by densitometry with a microcomputer imaging device (Imaging Research, MCID, St. Catherines, ON).

2.4.5 Membrane binding assays

Binding assays were conducted as described previously (Massicotte et Baudry, 1990). Briefly, aliquots of membrane suspension containing 20-40 μg of proteins in 20 μl Tris-acetate buffer were incubated for 45 min with 100 nM ^3H -AMPA in the presence of 50 mM KSCN. The samples were then centrifuged for 20 min at 25,000 $\times g$ (4°C). The pellets were dissolved in 50 μl of 0.1 M NaOH, and the radioactivity retained in the pellet was counted after the addition of scintillation fluid (1 ml). Non-specific binding was measured by the addition of 5 mM glutamate and subtracted from total binding.

2.4.6 Agents

BEL (Calbiochem, Ann Arbor, MI), AACOCF₃ and MAFP (Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA) were dissolved in DMSO (0.05% final concentration) and mixed in ACSF on the day of experimentation to obtain the desired final concentration. (R)- and (S)-enantiomers of BEL were isolated from racemic BEL with a Chirex 3,5-dinitrobenzoyl-(R)-phenylglycine chiral HPLC column (Phenomenex, Inc., Torrance, CA) according to previously-published methods (Jenkins et al., 2002). The column was equilibrated with hexane/dichloroethane/ethanol (150:15:1), and the optical enantiomers were eluted isocratically at 2 ml/min. Elution of (R)- and (S)-BEL was monitored by UV absorbance at 280 nm. Under these conditions, the retention times (R_t) for (R)- and (S)-BEL differed by 1 min, with the R_t for (S)-BEL and (R)-BEL being 11.1 min and 12.2 min respectively (Jenkins *et al.*, 2002). Peaks corresponding to these R_t were collected, dried under N₂, and stored at -20°C . The concentration of each enantiomer was determined spectrophotometrically based on its UV absorbance ($\epsilon = 6130 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ in acetonitrile (Jenkins et al., 2002), stored in DMSO and mixed in ACSF on the day of experimentation to obtain the desired final concentration. All other chemical reagents were procured from Sigma.

2.4.7 Statistical analysis

In all cases, the data are presented as means \pm S.E.M. Electrophysiological and biochemical results were analyzed by Student's paired and unpaired t-test, respectively. Values were considered significantly different at $p < 0.05$.

2.5 RESULTS

2.5.1 BEL prevents LTP induced by TBS

The iPLA₂ inhibitor BEL has previously been shown to prevent 100 Hz-induced LTP in the hippocampal CA1 area (Fujita et al., 2001; Wolf et al., 1995). The present study has tested whether this inhibitor similarly affects LTP elicited by TBS, a paradigm that mimics rhythmic theta activity during exploratory episodes (Larson et Lynch, 1986). Hippocampal slices were perfused with 10 μ M BEL for 30 min prior to and after TBS. Evoked responses were averaged 1 and 40 min after application of TBS in area CA1 of the hippocampus to evaluate the effect of BEL on post-tetanic potentiation and LTP of fEPSPs, respectively. As shown in Figure 1A, BEL perfusion did not significantly alter post-tetanic potentiation of fEPSPs that occurred immediately after TBS (control: $206 \pm 15\%$ of baseline; BEL: $176 \pm 10\%$ of baseline; $n=8$ for each group). However, we found that, compared to control slices, in which a long-term increase in fEPSPs reaching $170 \pm 10\%$ of baseline was observed at 40 min post-TBS ($n=8$; $p < 0.001$), potentiation was completely abolished in slices pretreated with BEL ($104 \pm 7\%$ of baseline; $n=8$; $p = 0.5377$) (Fig. 1A). It can be noted that BEL, by itself, had no detectable effect on the fEPSP slope of unpotentiated pathways ($107 \pm 4\%$ of baseline after 50 min of recording; Fig. 1A, $n=7$; $p = 0.1124$). Because cPLA₂ has been assumed to play a role in long-term changes of synaptic function (Massicotte, 2000), we also investigated in another group of slices the effect of 10 μ M AACOCF₃, a preferential cPLA₂ blocker, on TBS-induced LTP. However, in contrast to BEL, the magnitude of LTP was not altered in slices perfused with AACOCF₃, and reached $155 \pm 5\%$ of baseline at 40 min post-TBS (Fig. 1A, $n=4$; $p < 0.001$).

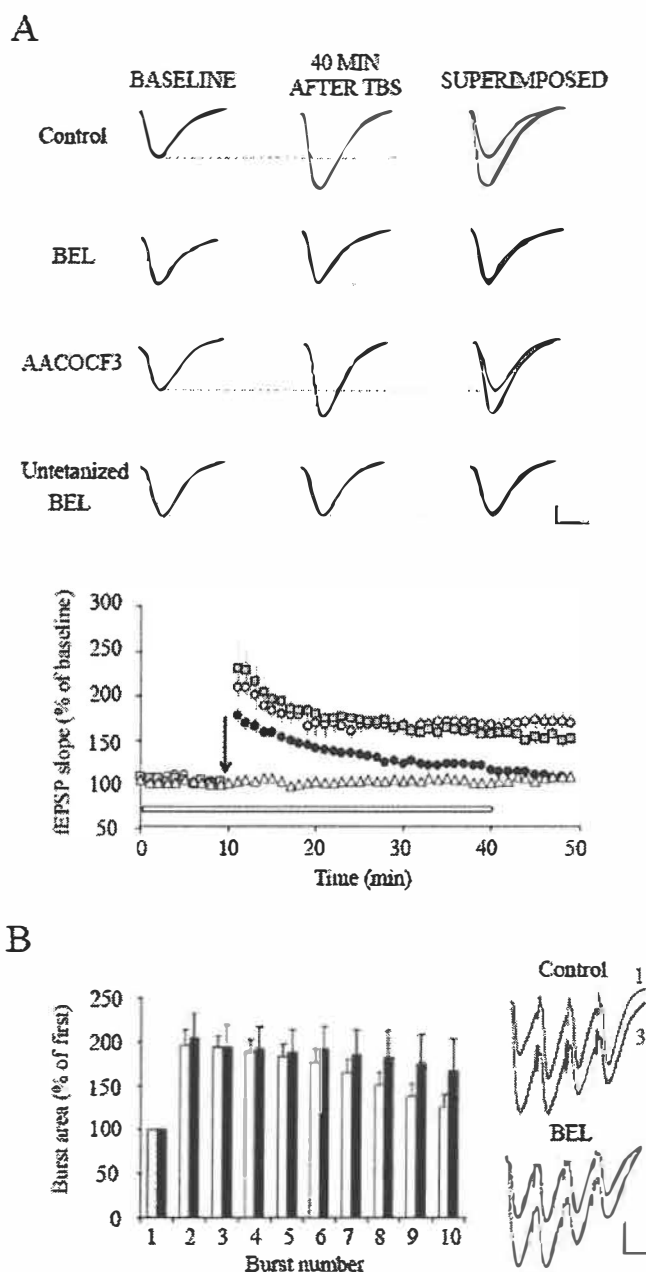


FIGURE 2.1 Selective inhibition of TBS-induced LTP by BEL.

A. *Top:* Examples of average fEPSPs elicited in the stratum radiatum before and after TBS in a control slice, in a slice pretreated with 10 μ M BEL or 10 μ M AACOCF3, and in an untetanized slice perfused with BEL. Each sample trace is an average of 5 consecutive responses. *Bottom:* Graph of the fEPSP slope expressed as percentages of the average response before TBS (arrow) in control slices (open circles; $n=8$), in slices subjected to BEL (black circles; $n=8$), or AACOCF3 (grey squares; $n=4$), and in slices not subjected to TBS (open triangles; $n=7$). The horizontal bar indicates the period of time for which recordings were acquired in the presence of drugs. Each data point corresponds to the mean \pm S.E.M. **B.** Bar graph of the area under each theta-burst response expressed as percentages of the first burst in control (open bars; $n=8$) and BEL-treated slices (filled bars; $n=5$). Representative traces obtained during the first and the third theta-burst response in a control slice and in a slice perfused with BEL are illustrated on the right. Scale bars: A: 0.5 mV, 5 ms; B: 1 mV, 10 ms.

A possible explanation for the effect reported here is that BEL interferes with an induction step of LTP, such as transmitter release (presynaptic mechanism) and/or NMDA receptor activation (postsynaptic mechanism). With regard to the latter point, TBS not only mimics an endogenous rhythm, i.e. theta-rhythm, but also reveals a NMDA component during the burst (Arai et Lynch, 1992). Thus, we compared the responses generated by this paradigm in control conditions and during BEL application. The net depolarization produced by successive bursts in control and BEL-treated slices is depicted in Figure 1B. As can be seen, perfusion with BEL did not interfere with the burst response elicited during TBS. If anything, the degree of depolarization was slightly greater after BEL application than in the control, an effect particularly evident during later bursts. A standard assay for changes in transmitter release was also performed by measuring the degree of PPF. As shown in Figure 2A, iPLA₂ blockade had presumably no presynaptic effect on neurotransmitter release since the PPF of fEPSPs elicited by paired stimuli at 50-, 75-, 100-, 150-, 200-, 300- and 400-ms intervals in the stratum radiatum was not affected by BEL (n=4). An additional test was carried out to determine whether neuronal excitability and inhibitory synaptic transmission were sensitive to BEL treatment. To achieve this, antidromic responses were recorded in CA1 cell body layer upon the delivery of a single pulse through the alveus. As shown in Figure 2B, the amplitude of population spikes and the following positive-going potentials remained stable throughout recording and were not affected after perfusion with BEL for a period of 60 min. Altogether, these results suggest that BEL does not interfere with basic neuronal properties and the induction steps of LTP, but rather specifically disrupts the expression mechanisms of long-term synaptic plasticity.

2.5.2 TBS-induced LTP is selectively blocked by (R)-BEL

We took advantage of the fact that iPLA₂ isoforms have a distinct inhibition profile for BEL enantiomers to determine which iPLA₂ isoform is involved in TBS-induced LTP. As for the racemic mixture, hippocampal slices were perfused with 5 μ M of each enantiomer ((R)-BEL and (S)-BEL) for 30 min prior to and after TBS. As depicted in Figure 3, fEPSPs were significantly increased to $148 \pm 12\%$ of baseline 40

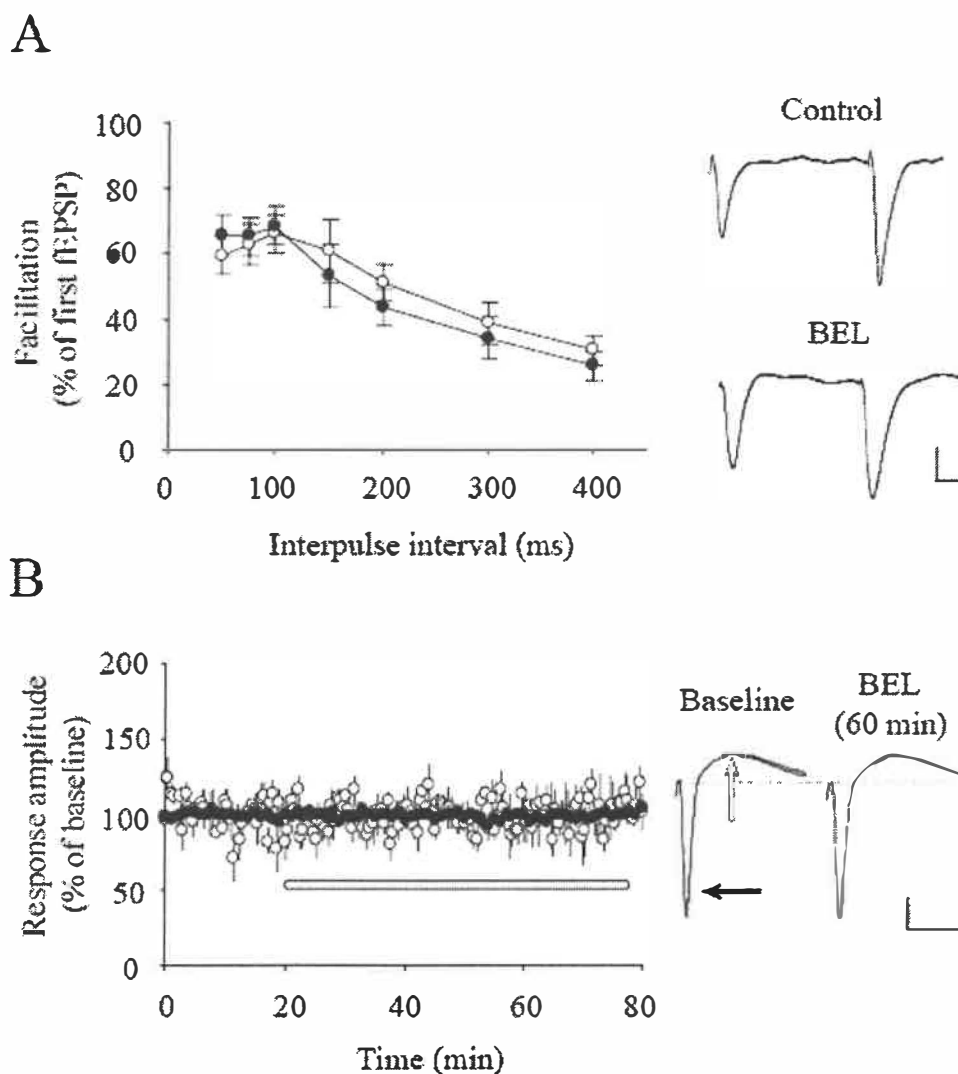


FIGURE 2.2 BEL does not alter the basic properties of synaptic transmission.

A. Graph of average facilitation of the second fEPSP relative to the first one in control slices (open circles) and in slices subjected to 10 μ M BEL (closed circles), with interpulse intervals ranging from 50 to 400 ms ($n=4$ for each group). Examples of fEPSPs elicited in the stratum radiatum by paired stimuli given at 50-ms intervals in a control slice and in a slice pretreated for 30 min with BEL are illustrated on the right. **B.** Antidromic responses elicited by stimulation in the stratum oriens and recorded in the cell body layer were obtained before and during application of 10 μ M BEL. Population spike (closed circles) and positive-going potential (open circles) amplitudes before and during application of BEL (*horizontal bar*) are expressed as percentages of the average response during the last 10 min before BEL perfusion. Data are the mean \pm S.E.M. of 4 slices. Representative antidromic responses in an average of 5 consecutive traces are presented on the right. Scale bars: A: 0.5 mV, 10 ms; B: 0.5 mV, 5 ms.

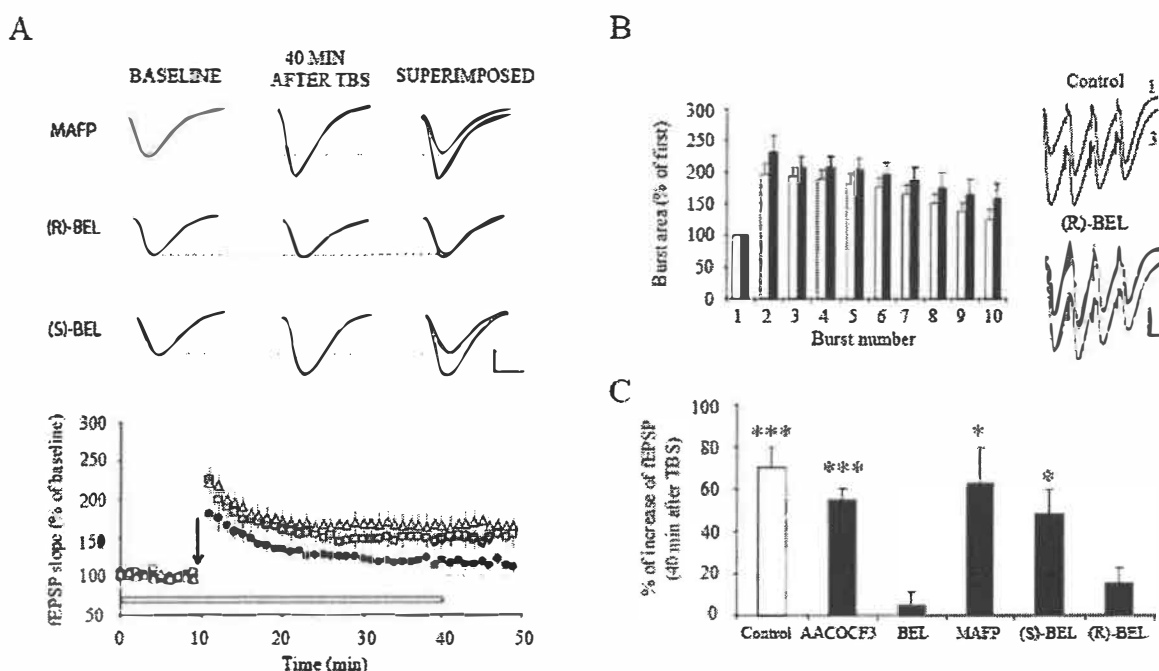


FIGURE 2.3 Effects of selective inhibitors for PLA₂s on TBS-induced LTP.

A. Top: Examples of average fEPSPs elicited in the stratum radiatum before and after TBS in a slice pretreated with 10 μ M MAFP or with 5 μ M of (R)- or (S)-BEL enantiomers. Each sample trace is an average of 5 consecutive responses. **Bottom:** Graph of the fEPSP slope expressed as percentages of the average response before TBS (arrow) in slices subjected to MAFP (open triangles; $n=5$), (R)-BEL (closed circles; $n=5$) or (S)-BEL (grey squares; $n=5$). The horizontal bar indicates the period of time for which recordings were acquired in the presence of PLA₂ inhibitors. Each data point corresponds to the mean \pm S.E.M. **B.** Bar graph of the area under each theta-burst response expressed as percentages of the first burst in control (open bars; $n=8$) and (R)-BEL-treated slices (filled bars; $n=5$). Representative traces obtained during the first and the third theta-burst responses in a control slice and in a slice perfused with (R)-BEL are illustrated on the right. **C.** Comparative histogram showing the effects of PLA₂ inhibitors on LTP of fEPSPs 40 min after TBS. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ Student's t test. Scale bars: A: 1 mV, 5 ms; B: 1 mV, 10 ms.

min post-TBS in slices treated with 5 μ M (S)-BEL (Fig. 3 A, $n=5$; $p < 0.05$), but this potentiation was prevented in slices incubated with 5 μ M (R)-BEL ($115 \pm 8\%$ of baseline; $n=5$; $p = 0.0952$), suggesting that TBS-induced LTP depends mainly on iPLA₂ γ activity. As for the BEL racemic mixture, (R)-BEL had no effect on the magnitude of facilitation during burst responses (Fig. 3B), indicating that induction steps of LTP are not distorted by the enantiomer. The involvement of iPLA₂ γ in the TBS-induced plasticity is further supported by the observation that LTP persisted in slices superfused with 10 μ M MAFP ($163 \pm 17\%$ of baseline at 40 min post-TBS; $n=5$; Fig. 3A), an agent that inhibits cytosolic iPLA₂ β (Lio *et al.*, 1996) but not endoplasmic reticulum (ER)-associated iPLA₂ (Cummings *et al.*, 2002; McHowat *et al.*, 1998), which has recently been identified as iPLA₂ γ in the rabbit kidney and heart as well as in the rat kidney (Kinsey *et al.*, 2005). Figure 3C summarizes the differential effects of PLA₂ inhibitors on TBS-induced potentiation of fEPSPs.

2.5.3 BEL prevents NMDA-induced potentiation of fEPSPs and upregulation of AMPA receptors

The above results indicate that BEL interferes with expression mechanisms and not with the induction steps of LTP. Chemically-induced plasticity generated by transient perfusion of CA1 hippocampal slices with NMDA has proved to be a very convenient tool to investigate the biochemical changes in AMPA receptors associated with LTP expression (Broutman *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998; Musleh *et al.*, 1997). The present study took advantage of this to determine whether iPLA₂ activity is a necessary step in the sequence leading to AMPA receptor regulation during LTP in area CA1. As reported previously, exposure of CA1 hippocampal slices to 50 μ M NMDA for 3 min resulted in transient, complete depression of fEPSPs (Fig. 4B), an effect that may in part be attributable to a loss of driving force caused by NMDA-induced depolarization (Broutman *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998). The depression began to fade 5-10 min after NMDA application and recovered completely within 25-35 min of recording. Synaptic responses were increased thereafter and remained elevated for the rest of the recording period ($169 \pm 12\%$ of baseline 70 min post-NMDA application; Fig.

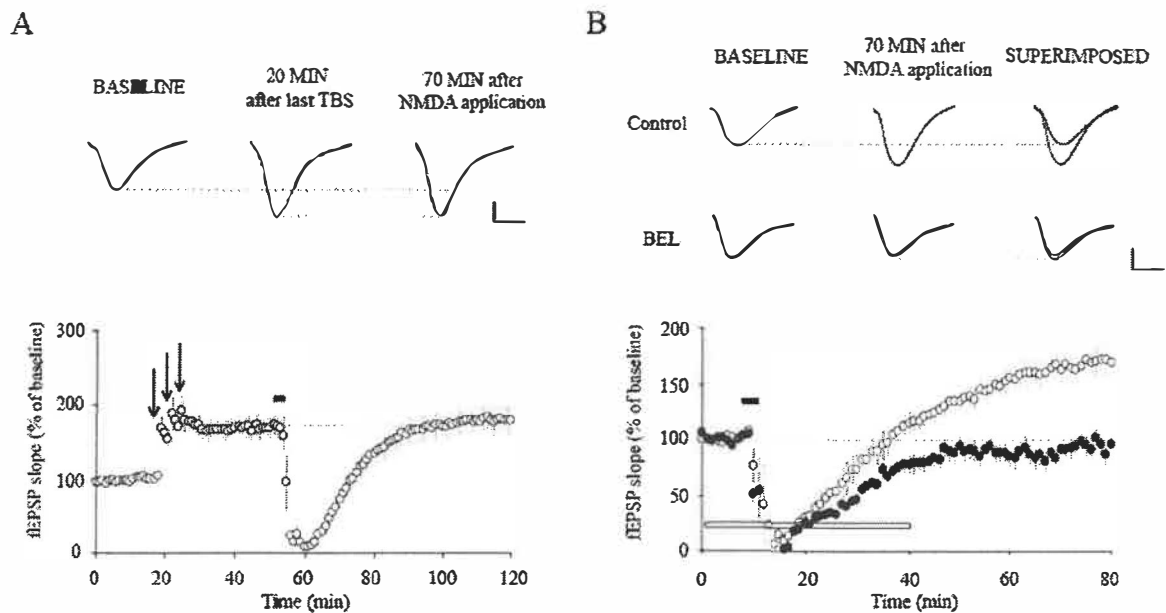


FIGURE 2.4 BEL abolishes NMDA-induced potentiation.

A. Top: Examples of fEPSPs recorded in the stratum radiatum during the baseline period, 20 min after TBS and 70 min after application of 50 μ M NMDA. Each sample trace is an average of 5 consecutive responses. **Bottom:** Graph of the fEPSP slope expressed as percentages of the average response before 3 successive TBSs (arrows). TBS occluded NMDA-induced potentiation of fEPSPs ($n=4$). NMDA was applied for the period indicated by the horizontal bar. **B. Top:** Representative fEPSPs during the baseline period and 70 min after a 3-min application of 50 μ M NMDA in a control slice and in a slice pretreated with 10 μ M BEL. Each sample trace is an average of 5 consecutive responses. **Bottom:** Graph of the fEPSP slope expressed as percentages of the average response before NMDA application (horizontal filled bar) in control slices (open circles; $n=10$) and in slices incubated with BEL (closed circles; $n=6$). The horizontal white bar indicates the period of time for which recordings were acquired in the presence of BEL. Each data point corresponds to the mean \pm S.E.M. Scale bars: A and B: 1 mV, 5 ms.

4B; $n=10$). As a control, we tested the stability of fEPSPs in slices perfused with ACSF alone. No significant changes in the fEPSP slope were found over the course of these experiments (data not shown). LTP elicited by TBS occluded NMDA-induced potentiation of fEPSPs. Indeed, 3 episodes of TBS delivered 3 min apart saturated LTP to a maximum of $174 \pm 13\%$ of baseline. Application of $50 \mu\text{M}$ NMDA 20 min after the last episode of TBS did not cause any further increase in synaptic responses 70 min following NMDA application ($104 \pm 12\%$ relative to pre-NMDA application; Fig. 4A; $n=4$), confirming that the cellular events responsible for NMDA-induced potentiation share mechanisms similar to those implicated in TBS-induced LTP. This is reinforced by the fact that, as for TBS-induced LTP, chemically-induced potentiation was prevented in hippocampal slices pretreated for 30 min with $10 \mu\text{M}$ BEL, as fEPSPs were $93 \pm 11\%$ of baseline 70 min after NMDA application (Fig. 3B; $n=8$), a non-significant difference from pre-NMDA perfusion ($p = 0.5660$).

Previous studies showed that NMDA-induced potentiation is characterized by translocation of AMPA receptors from intracellular to membrane compartments (Broutman et Baudry, 2001). Hippocampal slices treated with NMDA were collected at the end of the recording period and were processed for Western blotting using an antibody recognizing the C-terminal domain of the AMPA receptor GluR1 subunit. As depicted in Figure 5A, AMPA receptor GluR1 subunit levels were increased by $25 \pm 4\%$ in crude synaptic membrane fractions of slices exposed to NMDA ($p < 0.05$; $n=5$ slices), when compared to untreated controls. We also found that GluR1 upregulation in NMDA-treated slices, while evident in crude synaptic P2 fractions, was virtually absent in whole homogenates of CA1 hippocampal slices ($9 \pm 5\%$ from control slices, at 50 min post-NMDA perfusion, $p = 0.3675$; $n=4$, data not shown), which is consistent with the notion that LTP is due to insertion of new membrane receptors originating from intracellular pools. Relative to slices pre-incubated in the presence of $10 \mu\text{M}$ BEL, the NMDA-induced increase in the GluR1 subunit in crude synaptic membranes was dampened to only $10 \pm 5\%$ ($n=5$; $p = 0.2108$), while this inhibitor did not by itself noticeably alter GluR1 subunit levels ($-4 \pm 4\%$; $n=5$; $p = 0.3883$). Of course, if regulation of GluR1 immunoreactivity during NMDA-induced LTP is related to

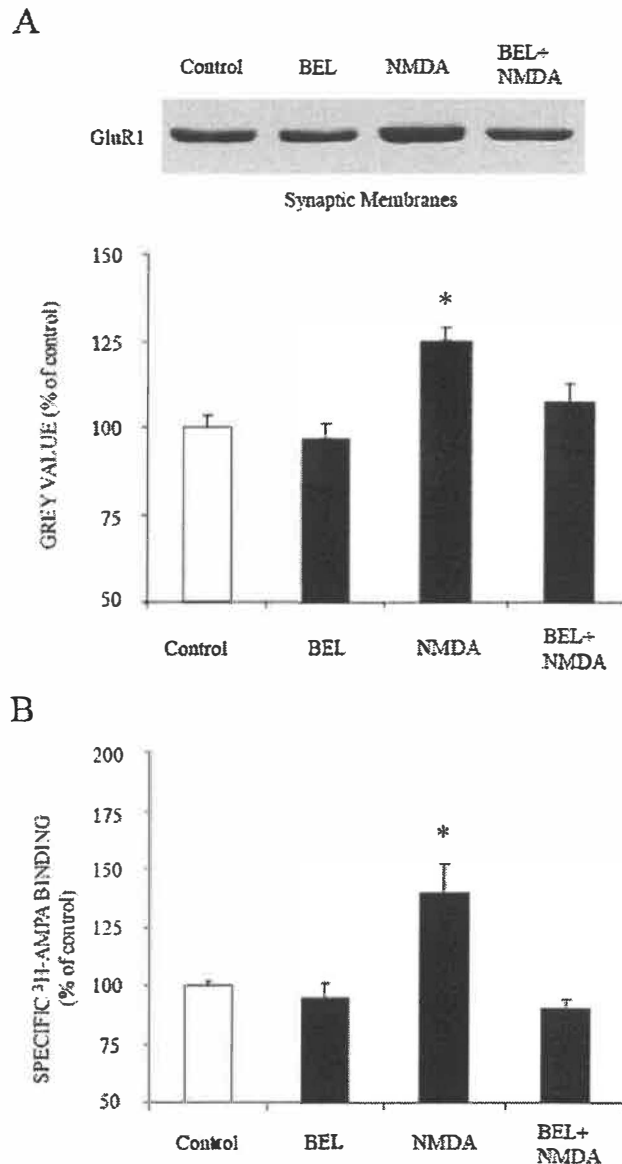


FIGURE 2.5 Upregulation of GluR1 levels and ³H-AMPA binding after NMDA application are abolished by BEL.

A. Graph of the changes in AMPA GluR1 subunit levels in a crude synaptic membrane fraction in control slices (n=6), in slices subjected to 10 μ M BEL alone (n=5) and in slices that were exposed to a 3-min application of 50 μ M NMDA without (n=5) or with BEL (n=5). The data represent percentages of variation of the optical density \pm S.E.M. from control slices. An example of Western blots from crude synaptic membrane fractions is illustrated on the top. **B.** Crude synaptic membrane samples submitted to the same conditions as in A were also processed for ³H-AMPA binding. The results are average percentages \pm S.E.M. of specific radioactive ligand binding relative to control slices (control: n=6; BEL: n=5; NMDA: n=5; BEL+NMDA: n=5). * $p < 0.05$ Student's *t* test.

insertion of new receptors in synaptic membranes, then synaptic potentiation should also significantly modify ^3H -AMPA binding. The results of experiments testing this are illustrated in Figure 5B, and show that radioactive binding levels were enhanced by $40 \pm 12\%$ ($p < 0.05$; $n=5$) in NMDA-potentiated slices compared to the controls. Again, BEL by itself had no effect on basal receptor binding ($-6 \pm 6\%$; $n=5$; $p = 0.4698$) but abolished the capacity of NMDA to upregulate ^3H -AMPA binding on crude synaptic membranes ($-10 \pm 4\%$, $n=5$; $p = 0.0573$). Taken together, these results suggest that translocation of AMPA receptors to synaptic membranes underlying the NMDA-induced potentiation of fEPSPs requires iPLA₂ activity.

2.6 DISCUSSION

Blockade of iPLA₂ activity has previously been reported to inhibit LTP elicited by 100 Hz tetanization in area CA1 of hippocampal slices (Fujita et al., 2001; Wolf et al., 1995). Our results extend the involvement of iPLA₂ in synaptic plasticity by showing that BEL also disrupts LTP induced by TBS, a physiologically-relevant stimulation paradigm (Larson et Lynch, 1986). Several arguments indicate that LTP reduction by this iPLA₂ inhibitor does not arise from changes in the physiological properties of the preparation. First, PPF was unaffected in the presence of the inhibitor at every interval tested, suggesting that transmitter release was not altered in BEL-perfused slices. Second, the inhibitor did not significantly change the amount of post-tetanic potentiation induced by TBS, nor did it modify the fEPSP and antidromic responses of control pathways over time. We also found that the burst responses evoked by TBS in the presence of BEL exhibited the characteristic build-up of depolarization attributed to a transient reduction of inhibitory postsynaptic potentials and activation of NMDA receptors (Kramar et al., 2004).

The above-mentioned observations point to the conclusion that iPLA₂ activity contributes to LTP formation by interacting with mechanisms that sustain potentiation in area CA1 of the hippocampus. A diverse body of evidence suggests that modifications in postsynaptic AMPA receptor properties are required for long-term expression of

synaptic potentiation, as shown by the increased kinetics of receptor-associated ion channels (Ambros-Ingerson et al., 1993; Ambros-Ingerson et al., 1993), the redistribution of existing receptors within the postsynaptic density (Xie *et al.*, 1997) and the insertion of new receptors in synapses (Lu *et al.*, 2001; Pickard *et al.*, 2001). In this matter, recent studies have provided strong evidence that the translocation of receptors originating from the ER-Golgi complex to the synaptic membrane is critically involved in NMDA-induced potentiation (Broutman et al., 2001). Interestingly, iPLA₂ activity may initiate the formation of membrane tubules emanating from several membrane-bound organelles (Brown *et al.*, 2003). These membrane tubules may be involved in various intracellular trafficking pathways such as retrograde movement from the Golgi complex to the ER, the organization of spatially-separated Golgi stacks into an interconnected ribbon, transport of material from the *trans*-Golgi network to the plasma membrane and the recycling of membrane and receptors through endocytic pathways (Brown *et al.*, 2003). Thus, the fact that pretreatment of hippocampal slices with BEL completely abolished NMDA-induced potentiation as well as the associated up-regulation of GluR1 subunits in synaptosomal fractions and ³H-AMPA binding may underscore an important role for iPLA₂ activity in AMPA receptor translocation from the ER-Golgi apparatus to the synaptic membrane during LTP.

Recently, reverse transcription-polymerase chain reaction experiments have shown that rat brains express messenger RNAs for at least 3 calcium-independent PLA₂ isoforms, iPLA₂β, iPLA₂γ and cPLA₂γ (Kinsey et al., 2005; Tang et al., 1997; Underwood et al., 1998), with differential inhibition profiles. The fact that TBS-induced LTP is prevented by BEL racemic mixture but not by MAFP allows us to exclude cPLA₂γ as a candidate in this synaptic plasticity because its enzymatic activity was found to be efficiently inhibited by MAFP but was unaffected by BEL (Kinsey *et al.*, 2005). In fact, considering further that LTP displays enantioselective impairment by the iPLA₂γ blocker (R)-BEL but not by the iPLA₂β inhibitor (S)-BEL (Jenkins *et al.*, 2002), iPLA₂γ is strongly suggested to be the crucial isoform governing hippocampal synaptic potentiation. Indeed, given that iPLA₂γ mRNA and protein have been reported to be enriched in the ER-Golgi apparatus in several cell types (Kinsey *et al.*, 2005), this

isoform may be well-suited to mediate AMPA receptor translocation during LTP. Keeping in mind that BEL inhibits endosome fusion (Mayorga *et al.*, 1993) and that recycling endosomes also supply AMPA receptors for LTP (Park *et al.*, 2004), we cannot exclude the possibility that iPLA₂ blockade may have interfered with the cycling of AMPA receptors in and out of the postsynaptic membranes, and that this disruption may have precluded synaptic plasticity.

There is now broad experimental support for the notion that calcium calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) plays a critical role in LTP generation by phosphorylating AMPA receptor subunits and/or driving GluR1-containing AMPA receptors to synapses (Broutman et Baudry, 2001; Malinow, 2003). Thus, iPLA₂ inhibition could have also interfered with LTP expression by interacting with mechanisms underlying AMPA receptor phosphorylation. Some recent biochemical data are indeed in agreement with this possibility. For instance, it has been shown, using different inhibitors, that iPLA₂ blockade differentially regulates GluR1 and GluR2/3 subunit phosphorylation (Menard *et al.*, 2005). Furthermore, given that CaMKII and iPLA₂β may interact with each other and that CaMKII activity can be regulated by iPLA₂ reaction products in pancreatic islet beta-cells (Wang *et al.*, 2005), it is conceivable that blockade of such interaction between iPLA₂ and CaMKII in hippocampal neurons may have interfered with CaMKII-mediated signaling and precluded AMPA receptor insertion. Alternatively, AA has been reported to facilitate the interaction of protein kinase Cγ (PKCγ) with the plasma membrane, and this association is shortened by the iPLA₂ inhibitor BEL (Yagi *et al.*, 2004). Because PKCγ mutant mice exhibit diminished levels of LTP (Abeliovich *et al.*, 1993), it is also possible that impairment of LTP by BEL resulted in an inappropriate activation of PKCγ. Additional experiments using iPLA₂ knock out mice should clarify these issues.

Independently of intimate details of the mechanisms involved in the effects of PLA₂ enzymes on AMPA receptor regulation during LTP, our results have interesting implications for understanding the molecular aspects of learning and memory because numerous studies have suggested the involvement of PLA₂ in memory function. Indeed,

intracerebral injection of PLA₂ inhibitors into the chick intermediate medial hyperstriatum ventrale impairs the learning of a passive avoidance task (Holscher et Rose, 1994), while intracerebroventricular injection of iPLA₂ inhibitors impairs spatial learning in rodents (Fujita *et al.*, 2000). Furthermore, it has been discovered recently that acquisition of one-trial step-down inhibitory avoidance in rats correlates with iPLA₂ activity in the hippocampus and that bilateral injection of iPLA₂ inhibitors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs both short-term and long-term memory (Schaeffer et Gattaz, 2005). Hence, defining which iPLA₂ isoforms are involved in the acquisition of memory and whether they are involved in memory consolidation will be of particular interest.

2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to G.M.. The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript.

2.8 ABBREVIATIONS

AA, arachidonic acid; AACOCF₃, arachidonyl trifluoromethyl ketone; ACSF, artificial cerebrospinal fluid; AMPA, alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-propionate; BEL, bromoenol lactone; CaMKII, calcium calmodulin-dependent protein kinase II; cPLA₂, calcium-dependent phospholipase A₂; ER, endoplasmic reticulum; fEPSP, field excitatory postsynaptic potential; iPLA₂, calcium-independent phospholipase A₂; LTP, long-term potentiation; MAFP, methyl arachidonyl fluorophosphonate; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PLA₂, phospholipase A₂; PKC, protein kinase C; PPF, paired-pulse facilitation; R_t, retention time; sPLA₂, secretory phospholipase A₂; TBS, theta-burst stimulation.

CHAPITRE III

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les PLA₂ ont fait l'objet d'un certain intérêt il y a plusieurs années, alors qu'on croyait la LTP comme étant un phénomène présynaptique. Les recherches faites à ce sujet suggéraient l'acide arachidonique, produite par les PLA₂, comme messenger rétrograde pouvant traverser les membranes et la fente synaptique pour aller moduler la relâche de glutamate aux afférences (Williams et al., 1989). Ce messenger rétrograde devait donc pouvoir reproduire la LTP par sa simple présence et être produit suite à l'activation des récepteurs NMDA. Seulement, l'application d'AA sur des préparations hippocampales n'induit pas spontanément la LTP; ni ne renverse le blocage des récepteurs NMDA par la DL-acide phosphonoalérique (D-AP5), un antagoniste NMDA (O'Dell et al., 1991). L'hypothèse de l'AA comme messenger rétrograde fut donc écartée au profit d'autres molécules comme l'oxyde nitrique et, même lorsque l'attention se tourna vers les mécanismes postsynaptiques, l'étude de l'AA et des PLA₂ fut plus ou moins mise à l'écart.

3.1 Les iPLA₂ et la potentialisation dans l'hippocampe

La présente étude revisite le rôle des PLA₂, et plus particulièrement des iPLA₂, dans la LTP glutamatergique dans la région CA1 de l'hippocampe. Suite à certaines observations selon lesquelles l'inhibition de la iPLA₂ par le BEL empêche la formation de la LTP induite par une stimulation 100 Hz (Fujita et al., 2001; Wolf et al., 1995), nous avons d'abord vérifié la validité de ce postulat avec une stimulation de type thêta. En effet, la LTP produite par l'une ou l'autre des stimulations de haute fréquence peut varier en intensité de même que par les mécanismes d'induction et de maintenance impliqués (Nguyen et al., 2000). La stimulation thêta consiste en 10 stimulations à 200 ms d'intervalle contenant chacune 4 stimulations à 0,1 ms d'intervalle. Ce paradigme se rapproche des stimulations endogènes produites par les collatérales de Schaeffer sur les neurones pyramidaux de la région CA1 lorsque l'animal explore son environnement (Arai et Lynch, 1992). Plus précisément, chaque train de 4 stimulations (100 Hz)

provoque la dépolarisation membranaire et l'ouverture des récepteurs NMDA, alors que l'intervalle de 200 ms entre chacun de ces trains concorde avec la période de latence du circuit inhibiteur GABAergique (Arai et al., 1995). La stimulation thêta assure donc un stimulus optimal des synapses glutamatergiques et un niveau de LTP maximal dans le circuit.

En accord avec les résultats obtenus par la stimulation 100 Hz, le BEL a bloqué la LTP induite par le pattern thêta (FIGURE 2.1). Contrastant avec ce résultat, l'inhibition des cPLA₂ par l'AACOCF₃ n'a pas modifié l'importance de la potentialisation mesurée de façon extracellulaire.

L'application de BEL n'a pas influencé la transmission de base puisque qu'aucune variation des composantes des PPSEs n'a été observée (FIGURE 2.1A; FIGURE 3.1). Pourtant des résultats antérieurs de notre laboratoire, effectués en *patch clamp*, démontrent que l'injection de 10 μ M BEL dans la dendrite de neurones pyramidaux provoque une augmentation des courants ioniques dus aux récepteurs AMPA (St-Gelais et al., 2004). Les mesures de *patch clamp* sont recueillies à l'aide d'une électrode d'enregistrement insérée à l'intérieur de la dendrite et qui mesure les courants entrants/sortants de cette cellule suite à une stimulation des afférences. Pour s'assurer que la variation des propriétés AMPA n'est pas rendue indétectable par l'activité GABAergique inhibitrice ou l'ouverture des récepteurs NMDA, des antagonistes de ces composantes ont été utilisés (picrotoxin et D-AP5, respectivement). Les PPSEs résultants sont purement issus des récepteurs AMPA, et l'inhibition de la iPLA₂ par le BEL n'a induit aucun changement des PPSEs-AMPA (FIGURE 3.1). Que les mesures intracellulaires suggèrent une régulation à la hausse des récepteurs AMPA alors que les mesures de potentiels extracellulaires ne varient pas semble paradoxal. Cette apparente contradiction peut s'expliquer, notamment par la possibilité que le *patch clamp* produise un artéfact d'enregistrement dû à la dilution du cytoplasme dans la micropipette insérée (Lin et al., 2002), ou même que l'inhibiteur appliqué directement n'atteigne pas la même « concentration effective » que lorsque appliqué dans le bain. Fuentes et al. (2003) ont à

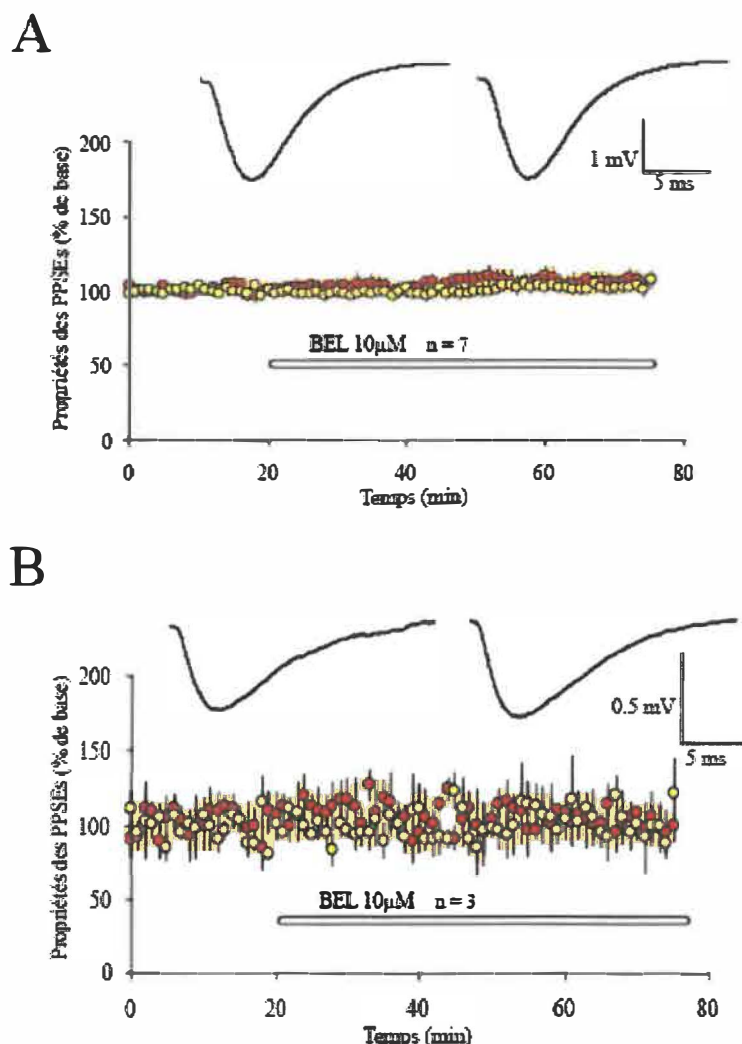


FIGURE 3.1 : Le BEL n'affecte pas les PPSEs. A. Ni la pente (*rouge*), ni la demi-largeur (*jaune*) ne varient lorsque 10 μ M de BEL sont ajoutés dans le milieu. **B.** Même expérience qu'en A., mais avec 20 μ M D-AP5 et 10 μ M de picrotoxine. Ces antagonistes des récepteurs NMDA et GABA_A permettent d'enregistrer les PPSEs propres aux récepteurs AMPA. Les propriétés mesurées de ces AMPA-PPSEs (*rouge* : pente; *jaune* : demi-largeur) ne sont pas altérées par le BEL.

cet effet démontré que le BEL, à concentration suffisante, inhibe la phosphatidate phosphohydrolase-1 (PAP-1). Les rôles physiologiques de la PAP-1 sont peu connus, mais plusieurs études indiquent que cet enzyme contrôle la production de diacylglycérol (DAG) (Brindley et al., 2002). Or, le DAG est un activateur de la PKC, qui elle-même phosphoryle les récepteurs AMPA (Ling et al., 2002). Il est donc possible que, lors des

injections dendritiques, le BEL ait mené à la phosphorylation et l'augmentation des courants AMPA de façon indépendante à l'inhibition de la $iPLA_2$; une possibilité qui de toute évidence devra être vérifiée expérimentalement.

Dans la méthodologie extracellulaire appliquée ici, le BEL n'a induit aucun changement dans les propriétés postsynaptiques de base, non plus qu'au niveau présynaptique comme l'atteste le protocole de stimulations paires (FIGURE 2.2A). Ce protocole consiste en une double stimulation à intervalle variant de 50 à 400 ms. À ces intervalles, le deuxième PPSE se trouve facilité par rapport au premier car le bouton présynaptique contient du calcium résiduel à la première stimulation, ce qui amplifie la deuxième relâche de glutamate (Zucker et Regehr, 2002). La présence de PLA_2 exogène (PLA_2 de groupe I, porcine) provoque la fusion des vésicules de neurotransmetteur à la membrane présynaptique, vraisemblablement par la modification de l'environnement lipidique présynaptique et la production d'acide arachidonique (Nishio et al., 1996). Il était donc envisageable que le blocage de la $iPLA_2$ puisse interférer avec les processus présynaptiques. Hors, l'inhibition de la $iPLA_2$ n'a pas significativement modifié le rapport des PPSEs paires, ce qui signifie que les processus de relâche de neurotransmetteurs ne sont pas perturbés par le BEL.

Similairement, il a été vérifié que l'application de BEL n'influencait pas la transmission axonale des neurones pyramidaux. Une telle observation s'effectue en potentiel de champ en positionnant l'électrode de stimulation dans le *stratum alveus* où les neurones projettent leurs axones et en mesurant les potentiels au niveau des corps cellulaires (*stratum pyramidale*) (FIGURE 2.2B). La réponse enregistrée est un potentiel d'action rapide suivi d'une hyperpolarisation, composée de la retro-inhibition GABAergique et de PPSEs inversés (Arai et al., 1995). Comme l'inhibition de la $iPLA_2$ n'a modifié aucune propriété de ces enregistrements, le BEL ne perturbe ni la conduction axonale par le potentiel membranaire des neurones, ni l'inhibition par le GABA. Combinées, ces observations des propriétés intrinsèques de la transmission nerveuse indiquent que l'abolition de la LTP par le BEL n'est pas une conséquence

indésirable mais bien une perturbation des mécanismes postsynaptiques glutamatergiques.

L'effet du BEL étant localisé spécifiquement dans l'aire postsynaptique, il est possible que l'inhibition de la LTP induite par stimulation thêta soit due à une altération de l'activation des récepteurs NMDA, donc d'une différence d'importance de l'influx calcique et des cascades conséquentes. Le BEL n'a aucune influence sur les réponses NMDA *ponctuelles* –évoquées par stimulation unique et isolées en ajoutant des antagonistes aux récepteurs AMPA et GABA (Wolf et al., 1995). Seulement, il est possible que les propriétés de désensibilisation des récepteurs soient modifiées, un phénomène qui n'apparaît qu'avec une suite de stimulation rapprochées (Arai et Lynch, 1998a; Arai et Lynch, 1998b). L'analyse comparative des trains de 4 réponses lors de la stimulation thêta met en évidence de tels effets. Le BEL n'a pas induit de variations notables dans le pattern de facilitation des 10 trains de stimulation 100 Hz (FIGURE 2.1B), ce qui indique que ses conséquences sur la LTP ne sont pas liées à un dérèglement de l'influx calcique entrant par les récepteurs NMDA.

L'inhibition de la $iPLA_2$ ne change pas les propriétés fonctionnelles des récepteurs et empêche la formation de la LTP par un processus postsynaptique. Dans la région CA1 de l'hippocampe, la mise en place de la LTP NMDA-dépendante induit une insertion rapide de récepteur AMPA contenant la sous-unité GluR1 (Pickard et al., 2001). La potentialisation chimique utilisée par Broutman et Baudry (2001) présente des similitudes avec la LTP induite électriquement. Comme cette méthode consiste en une application directe de NMDA au milieu extracellulaire des tranches *in vitro*, l'influx calcique passe exclusivement par les récepteurs du même nom, contrairement à d'autres méthodes de potentialisation chimique (comme l'application de glycine ou de KCl; (Chabot et al., 1996; Otmakhov et al., 2004). L'application de NMDA dans le liquide cerebro-spinal artificiel (ACSF), à plus basse concentration et plus faible durée, a été similairement utilisée afin de provoquer une LTD chimique (Lee et al., 1998; Snyder et al., 2005). C'est grâce à ce paradigme que la déphosphorylation de la sérine 845 sur GluR1 lors de la LTD fut démontrée. Dans la présente investigation, l'application de

NMDA dans l'ACSF (50 μ M, 3 min) produit une potentialisation globale des synapses dans le tissu (NMDA-LTP). Une potentialisation téτανique saturée, faite à l'aide de trois stimulations θ séparée de 5 minutes, a occlut toute potentialisation subséquente par le NMDA, ce qui suggère que ces deux plasticités utilisent les mêmes mécanismes cellulaires (FIGURE 2.4A).

Tel que postulé, une préincubation des tranches d'hippocampe dans une solution contenant 10 μ M de BEL pendant 30 minutes a supprimé la NMDA-LTP (FIGURE 2.4B). Ce résultat confirme que l'activité iPLA₂ est requise ultérieurement à l'ouverture des récepteurs NMDA. Bien que le AACOCF₃, inhibiteur de cPLA₂, n'ait pas affecté la LTP induite par stimulation θ , il n'est pas exclu que les cPLA₂ aient aussi un rôle dans la NMDA-LTP. Tel qu'observé à la FIGURE 3.2, la présence de l'inhibiteur n'a pas aboli la potentialisation chimique, mais a réduit à un certain degré son importance. Ce résultat peut provenir du manque de sélectivité du produit, connu pour inhiber les iPLA₂ à plus haute concentration (Balsinde et al., 1999). Par contre, il est aussi probable que cet effet s'explique par la nature de l'influx calcique généré lors de l'application de NMDA. Contrairement à la LTP par stimulation téτανique, les récepteurs NMDA activés ne sont pas exclusivement situés à la synapse (Hardingham et Bading, 2003). Ces récepteurs extrasynaptiques peuvent être couplés à des cascades différentes de celles induites par les récepteurs synaptiques, et ainsi nécessiter l'activation des cPLA₂ intracellulaires. L'implication des cPLA₂ dans la plasticité de l'hippocampe n'est pas une notion inusitée: les inhibiteurs de cPLA₂ réduisent la magnitude de la LTD hippocampale (Normandin et al., 1996), à l'opposé du BEL qui ne l'influence pas (Fujita et al., 2001). Comme pour la LTD, la NMDA-LTP produit un influx calcique relativement prolongé. Ainsi, l'entrée de calcium dans le cytoplasme des neurones pyramidaux, mais aussi des autres cellules non principales (interneurones, astrocytes) a pu activer les cPLA₂. À même titre que les iPLA₂, la famille des cPLA₂ s'agrandit constamment. Dans le cerveau, plusieurs isoformes ont été détectées, comme la cPLA₂ α , β et γ à plus ou moins grande intensité d'expression (Farooqui et Horrocks, 2004). La plupart de ces isoformes sont peu caractérisées et l'observation selon laquelle le niveau

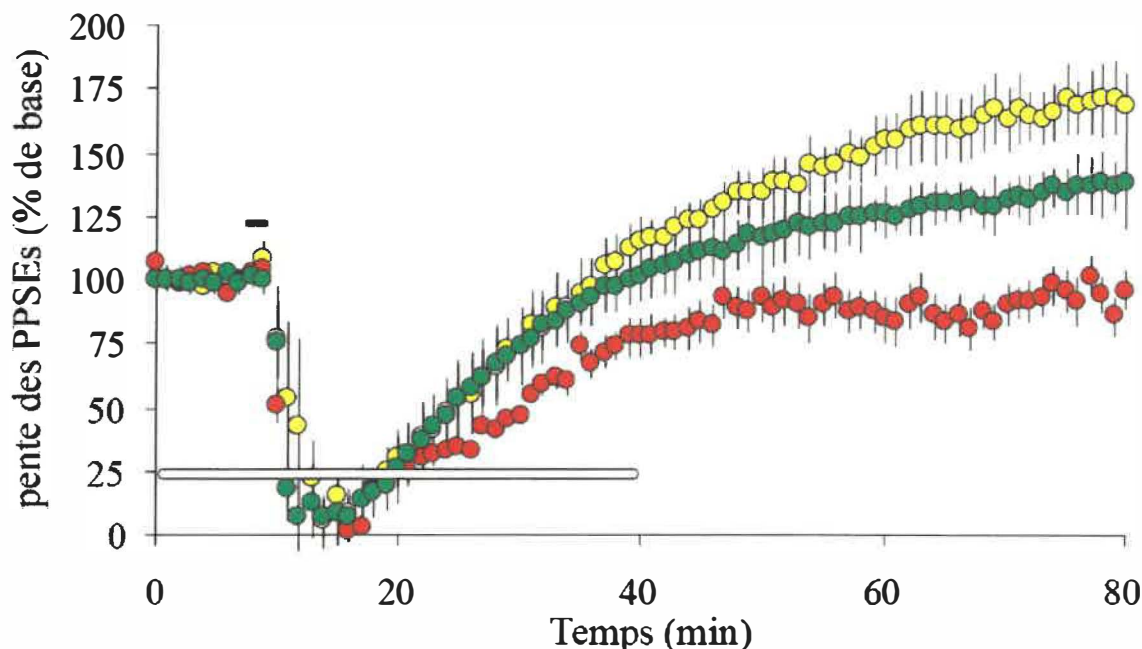


FIGURE 3.2 : La potentialisation chimique est légèrement diminuée en présence d'inhibiteur de cPLA₂. Après traitement au NMDA (*ligne horizontale pleine*), les PPSEs atteignent un niveau potentialisé (*jaune*). En présence de BEL, le tissu est incapable de potentialiser ses synapses (*rouge*). Contrairement à la LTP par stimulation thêta qui n'était pas affectée, le niveau de potentialisation chimique en présence de AACOCF₃ (inhibiteur de cPLA₂; *ligne horizontale vide*) apparaît comme inférieur au niveau contrôle (*vert*).

de NMDA-LTP diffère en présence d'inhibiteur de cPLA₂ pousse à l'approfondissement ultérieur.

3.2 Biochimie des récepteurs AMPA

L'analyse des tissus soumis à la NMDA-LTP révèle que la proportion de récepteurs AMPA dans la fraction des membranes synaptiques augmente, autant en sous-unités GluR1 qu'en GluR2/3; alors que le niveau des sous-unités NMDA NR1 reste semblable (Broutman et Baudry, 2001). Parallèlement, la quantité *intracellulaire* de récepteurs AMPA diminue similairement après l'application de NMDA, tel que montré

par un agent chimique liant les protéines péri-membranaires et les empêchant de migrer dans un gel d'électrophorèse (Broutman et Baudry, 2001). Ces deux évidences expérimentales indiquent un changement de localisation subcellulaire d'une quantité de récepteurs AMPA, provenant vraisemblablement d'un pool subsynaptique (Lisman, 2003; Sans et al., 2001). Dans le cas présent et en accord avec les résultats reportés par Broutman et Baudry, les niveaux de GluR1 ont augmenté significativement dans les fractions synaptiques (FIGURE 2.5A). Les récepteurs AMPA des neurones pyramidaux de l'hippocampe sont presque exclusivement composés de 2 dimères GluR1+2 ou GluR2+3 (Wenthold et al., 1996). Le trafic subcellulaire des récepteurs AMPA suite à un stimulus est un processus sous-unité-dépendant. En effet, les mécanismes d'endocytose employés lors de la LTD dépendent d'interactions avec la portion C-terminale de la sous-unité GluR2, alors que l'insertion de nouveaux récepteurs à la synapse lors de la LTP se produit par l'intermédiaire des GluR1 (Luscher et al., 1999; Meng et al., 2003). Le ciblage des sous-unités GluR1 en Western Blot, tel qu'effectué dans cette étude, procure donc un marqueur pertinent de la dynamique AMPA. Afin d'éliminer la possibilité que cette hausse de quantité de récepteurs AMPA après l'application d'agoniste des récepteurs NMDA ne soit due à une synthèse de nouveaux récepteurs, la variation en niveau de GluR1 sur des homogénats a été vérifiée. Les immunoréactivités des échantillons contrôles n'était pas significativement différentes de ceux soumis à la NMDA-LTP, indiquant que la quantité totale de GluR1 dans les cellules des tranches d'hippocampe ne varie pas ($109 \pm 9\%$ du niveau contrôle; $p > 0.05$).

Suivant notre hypothèse selon laquelle la $iPLA_2$ participe à l'insertion de récepteurs AMPA lors de la LTP et les résultats électrophysiologiques montrant que son inhibition par le BEL empêchait la NMDA-LTP, le BEL se devait de renverser l'augmentation de GluR1 dans les fractions synaptiques. Les résultats en Western Blot vont dans ce sens car le BEL a rendu la quantité de GluR1 détectée similaire aux échantillons contrôles (FIGURE 2.5A).

La technique de Western Blots avec anticorps GluR1 présente quelques inconvénients empêchant de postuler avec certitude que la détection tient purement compte du nombre de récepteurs. La portion C-terminale de ces protéines membranaires possède plusieurs sites de phosphorylation et même de coupure qui peuvent perturber la reconnaissance par l'anticorps lui aussi C-terminal. Par exemple, la calpaïne est une protéase activée par le calcium qui coupe la queue des GluR1 (formation de sous-unités ayant une masse apparente de 98 kDa plutôt que 105 kDa) (Lu et al., 2000). Ce faisant, la calpaïne rend les sous-unités GluR1 indétectables par l'anticorps C-terminal utilisés dans les présentes manipulations.

Pour contrer la possibilité d'un tel changement de reconnaissance de l'anticorps et du même coup apporter un indice supplémentaire de la modulation du trafic subcellulaire des récepteurs AMPA lors de la NMDA-LTP, le dosage de liaison de radioligand a été utilisé. Les échantillons de membranes synaptiques ont été mis en présence de ^3H -AMPA, ce qui a permis la comparaison des membranes ayant subi les différentes conditions par comptage radioactif. Les résultats obtenus corroborent avec ceux de l'immunobuvardage : une augmentation de radioliasion suite à l'application de NMDA, renversée par l'inhibition de la iPLA_2 par le BEL (FIGURE 2.5B). Ce protocole de dosage des récepteurs AMPA dépend du nombre de récepteurs AMPA (peu importe leur composition en sous-unités) ainsi que leur affinité pour l'agoniste (pouvant être modulée par la conformation du récepteur). Autrement dit, cette technique renseigne sur le nombre de sites de liaisons extracellulaires (N-terminal) alors que l'immunobuvardage de type Western établit cette quantité du point de vue intracellulaire (C-terminal). Ces mesures complémentaires valident l'hypothèse selon laquelle la iPLA_2 module la *quantité* de récepteurs AMPA dans les fractions synaptiques des échantillons.

Pour bien comprendre le sens de ces observations, une précision importante quant aux fractions synaptiques est à apporter. Ces fractions obtenues par centrifugation contiennent non seulement les densités postsynaptiques (PSD) riches en protéines (qui s'obtiennent habituellement par ajout de détergent), mais aussi les membranes plasmiques adjointes à la PSD. Les récepteurs détectés dans ces échantillons de

membranes grossières sont donc localisés dans la membrane des neurones. Dans le cas où les échantillons potentialisés auraient montrés des niveaux semblables de GluR1, c'est la *translocation* des récepteurs des zones extrasynaptiques vers la PSD qui aurait été perturbée. Le locus d'action de la iPLA₂ aurait alors porté sur la modification de la mobilité des récepteurs extra-/intrasynaptique. Seulement, le BEL empêche la LTP induite électriquement, chimiquement et l'augmentation de la quantité de récepteurs AMPA dans les fractions membranaires, ce qui indique que la iPLA₂ contribue spécifiquement aux mécanismes *inductibles* d'insertion des récepteurs.

Cette spécificité de la iPLA₂ pour les mécanismes inductibles est indiquée par le fait que l'inhibiteur de iPLA₂ ne provoque pas spontanément de variations du niveau des PPSEs de base, non plus que des niveaux de GluR1 et du comptage de radioligand. Les récepteurs AMPA de la PSD sont sujets à un recyclage continu et relativement rapide (Luscher et al., 1999). Si la iPLA₂ était responsable de l'exocytose des récepteurs en général, son inhibition par le BEL aurait graduellement diminué la grandeur des réponses électrophysiologiques, de même que l'immunoréactivité des GluR1 et la radioactivité du ³H-AMPA dans les échantillons de membranes. Par exemple l'application de B botulinium toxine (Botox), une toxine inactivant les protéines SNARE et qui prévient par la même occasion toute exocytose, provoque une décroissance graduelle de l'expression des récepteurs AMPA à la surface des neurones (perte de 40% en 20 minutes, approximativement; (Luscher et al., 1999). L'inhibition de la iPLA₂ ne produit pas un tel phénomène, ce qui suggère que cet enzyme n'intervient pas dans le recyclage constitutif des récepteurs. Aussi, la possibilité que le blocage de la iPLA₂ puisse interférer à la fois dans les processus d'exocytose et d'endocytose, une hypothèse qui pourrait aussi expliquer les résultats de notre étude, est improbable puisque le BEL n'abolit pas la LTD (Fujita et al., 2001). Dans l'ensemble, nos résultats poussent à croire que la iPLA₂, du moins une des isoformes exprimées dans les neurones, est spécifiquement requise lors d'un signal cellulaire de potentialisation pour l'insertion de récepteurs AMPA à la synapse.

3.3 Les isoformes de iPLA₂ et la LTP

La dénomination iPLA₂ a été utilisée jusqu'ici sans discrimination des différentes isoformes. Pourtant, la multitude de variantes de PLA₂ intracellulaires et leur expression soigneusement régulée d'un type cellulaire à l'autre portent à croire que chacune des isoformes présentes dans la cellule a un rôle bien spécifique. Cette délégation des tâches s'effectue possiblement grâce à la localisation distincte de chaque isozyme, dictée par la préférence à certains phospholipides mais surtout par leur séquence de liaison à la membrane (Kinsey et al., 2005). Ce domaine N-terminal respectif à chaque protéine traduite peut de plus varier selon l'épissage de l'ARN messenger, ce qui donne à la cellule un haut niveau de contrôle dans l'expression/localisation de ses phospholipases (Kudo et Murakami, 2002).

Le meilleur exemple connu de cette détermination pointue de l'activité des PLA₂ est probablement le couplage de la cPLA₂ α et de la cyclooxygénase-2 (COX-2). Le domaine C2 (domaine de liaison calcium-phospholipide) de la cPLA₂ lui donne une préférence pour les PtdCho et son site catalytique hydrolyse prioritairement l'AA (Farooqui et al., 2000). Lorsqu'en présence d'un ion calcium, la cPLA₂ α se transpose à la membrane où elle produit l'AA. Cette relocalisation de la cPLA₂ suite à une élévation du calcium intracellulaire semble se produire à différents endroits selon le type de cellule. Dans la souche épithéliale EA.hy.926, la cPLA₂ α activée se retrouve colocalisée avec la COX-2 à la membrane nucléaire interne et externe (Grewal et al., 2005). Le couplage de ces deux enzymes fait que l'activité de la cPLA₂ conduit directement à la conversion de l'AA en prostaglandine H₂ au noyau suite à un signal inflammatoire ou mitogène (Grewal et al., 2005).

La régulation, la localisation et les fonctions des iPLA₂ sont beaucoup moins connues. Contrairement aux cPLA₂, les iPLA₂ n'ont pas tous une haute affinité pour l'arachidonate (Yang et al., 1999). Il n'est donc pas exclu que les mécanismes régulés par les iPLA₂ le soient par la production d'autres acides gras insaturés, comme l'acide docosahexaénoïque ou le linoléate. En fait, Fujita et al. ont démontrés à cet effet que

l'inhibition de la LTP (100 Hz) par le BEL est renversée par l'application d'AA, mais aussi de DHA exogènes (Fujita et al., 2001). L'activité enzymatique des iPLA₂ du cerveau de rat est dramatiquement dépendante de l'état de la membrane sur laquelle elles sont associées : ces iPLA₂ hydrolysent très lentement les phospholipides sous forme vésiculaires, ce qui laisse croire que l'isozyme impliqué dans la plasticité synaptique n'est pas présent dans le pool vésiculaire AMPA (Yang et al., 1999). Autre que cette inactivation vésiculaire, un mécanisme de régulation de la iPLA₂ β a été découvert par Wolf et Gross (1996). La iPLA₂ β est inhibée lorsque liée à la calmoduline activée en présence de calcium. De même, il a été récemment démontré que dans les cellules β -pancréatiques, la iPLA₂ β s'associe avec la CaMKII β et forment ensemble un complexe qui potentialise leur activité respective (Wang et al., 2005). Que cette interaction au sein des neurones ait lieu reste à vérifier, de même que la possibilité d'une telle interaction avec la iPLA₂ γ . Dans le même ordre d'idée, plusieurs études rapportent une interrelation similaire entre les iPLA₂ et la PKC (Balsinde et al., 1997; Yagi et al., 2004). La CaMKII et la PKC étant des enzymes directement activés par l'influx calcique (affluent des récepteurs NMDA lors de la LTP), leur implication potentielle dans la régulation des iPLA₂ ouvre une piste intéressante quant à leur modulation indirecte par le calcium. Cette activation hypothétique de la iPLA₂ γ peut se produire via les sites consensus de phosphorylation de cette isoforme et/ou d'une oligomérisation (Farooqui et Horrocks, 2004; Larsson et al., 1998).

Plusieurs tissus, dont le cerveau, possèdent une activité iPLA₂ associée au RE (RE-iPLA₂) (Kinsey et al., 2005). L'isozyme présente au RE est un candidat potentiel pouvant répondre des observations présentées ici, en assurant la communication RE-Golgi par l'entremise des microtubules (Brown et al., 2003). En effet, comme la iPLA₂ semble participer à l'insertion induite de récepteurs AMPA (LTP), et non à leur diminution (LTD) ou encore à leur recyclage continu, il est probable que son implication se situe au niveau de la *contribution* au pool vésiculaire (FIGURE 3.3).

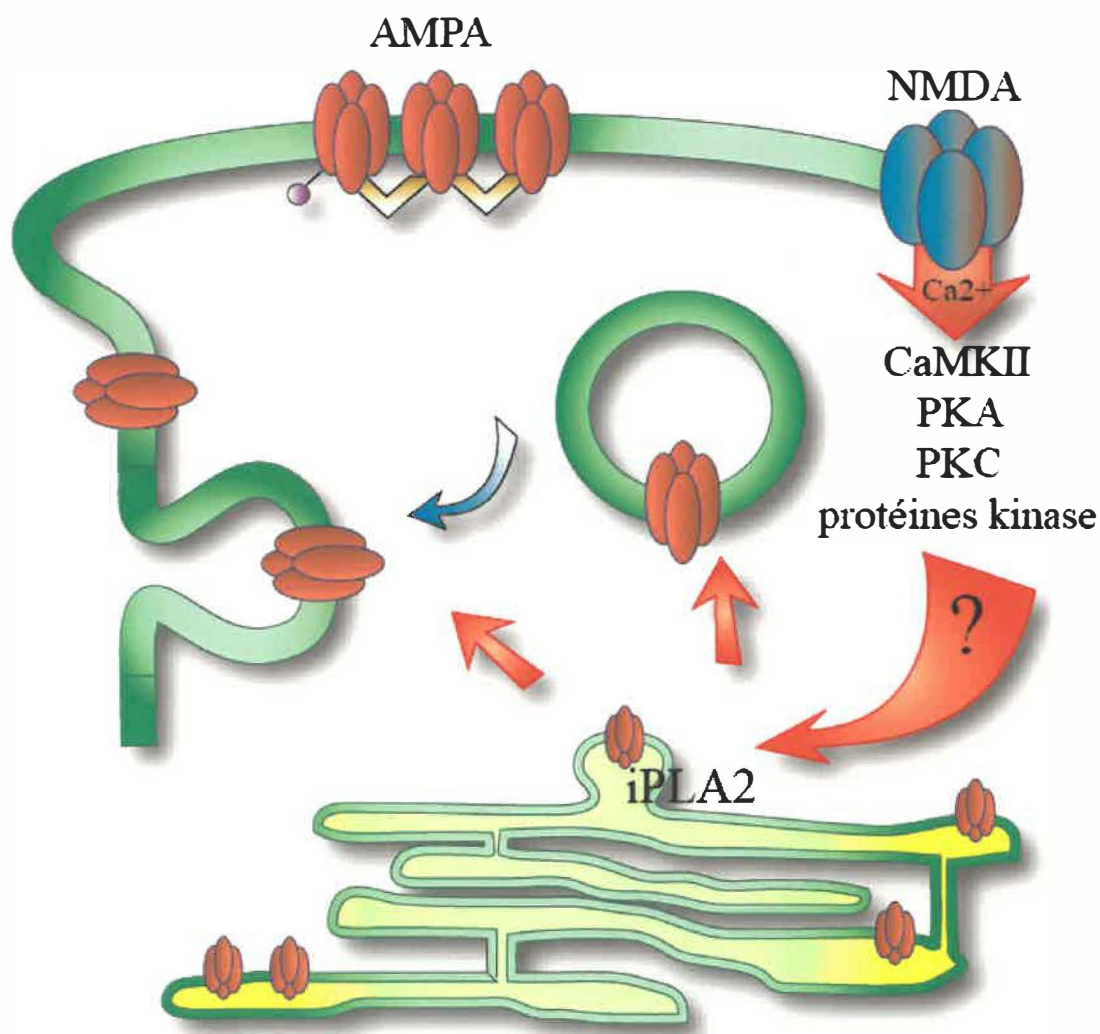


FIGURE 3.3 : Mécanisme hypothétique de l'implication des iPLA₂ dans la LTP. Les cascades enzymatiques activées par l'influx calcique induisent l'activation de la iPLA₂γ associée au système excrétoire. L'enzyme provoque alors la translocation des récepteurs AMPA à la membrane plasmique, directement ou par le pool vésiculaire de récepteurs.

Cette assomption est appuyée par le fait que la BFA, métabolite fongique soudant le RE au Golgi, empêche la formation de la potentialisation chimique (Broutman et Baudry, 2001), résultat équivalent à celui obtenu en présence d'inhibiteur de iPLA₂ (FIGURE 2.4B).

D'après l'inhibition spécifique des isoformes avec le MAFP et les énantiomères de BEL, la iPLA₂ γ serait l'isozyme responsable de la potentialisation des récepteurs AMPA dans CA1. À la lumière des expériences effectuées et en accord avec Kinsey et al. (2005), qui observent une perte importante de l'activité phospholipasique au RE du cerveau de rat suite à une incubation au BEL, la iPLA₂ γ pourrait être localisée au RE/Golgi. La possibilité de iPLA₂ γ -RE est une hypothèse intrigante qui mérite d'être investiguée plus profondément quant aux mécanismes assurés par cet enzyme.

3.4 Conclusions et perspectives

Notre étude se situe entre deux pôles de recherche sur la dynamique du cerveau. D'une part, les études biométriques observent que plusieurs neuropathologies sont caractérisées par des anomalies de la membrane pouvant être causées par les PLA₂. Ainsi, le sérum de patients schizophréniques montre une activité exagérée des iPLA₂ (Ross et al., 1999), surtout au premier épisode (Smesny et al., 2005). De même, les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer affichent une diminution du *turnover* membranaire et de l'activité PLA₂ dans plusieurs régions du cerveau, dont le lobe temporal où est situé l'hippocampe (Gattaz et al., 1996; Gattaz et al., 2004). La controverse fait rage quant à savoir si ces variations de la fluidité membranaire et de l'activité des PLA₂ ont un rôle dans la pathogenèse de ces maladies ou sont secondaires aux dommages oxydatifs à la membrane (Farooqui et al., 2000). Certaines études appuient la première hypothèse en corrélant des observations comportementales et la fluidité membranaire. En effet, l'inhibition de la iPLA₂ *in vivo* provoque une diminution dose-dépendante de la fluidité des membranes de cerveau de rat (Schaeffer et al., 2005). Les performances des animaux dans le labyrinthe en Y et dans les tâches d'apprentissage/évitement sont aussi perturbées lorsque la iPLA₂ est inhibée par injection de drogue dans l'hippocampe (Fujita et al., 2000; Schaeffer et Gattaz, 2005). L'interprétation de ces observations *in vivo* du point de vue cellulaire sont encore au niveau des spéculations.

Notre approche tente de déterminer le lien entre les effets physiologiques de modulation des PLA₂ et la biologie cellulaire des neurones de l'hippocampe. Les études mécanistiques sur la LTP sont encore trop peu développées pour intégrer les iPLA₂ à leur dynamique, en partie par manque de connaissances sur la régulation et les rôles des iPLA₂.

L'investigation du rôle des iPLA₂ dans la plasticité des neurones de l'hippocampe confirme que cette famille de phospholipases intracellulaires est nécessaire à la formation de la potentialisation à long terme, contrairement à la cPLA₂. Les iPLA₂ sont primordiales à l'insertion des récepteurs AMPA après l'activation des récepteurs NMDA, tel que démontré par l'absence de potentialisation chimique induite par l'agoniste NMDA. Cette absence a été observée à la fois électrophysiologiquement et en quantifiant les récepteurs AMPA par immunobuvardage de type Western dirigée vers la sous-unité GluR1 et par quantification de liaison d'AMPA radioactif. Afin de déterminer quelle isoforme des iPLA₂ était responsable de cette insertion dynamique de récepteurs AMPA, un criblage pharmacologique a été effectué. La iPLA₂ γ semble être la PLA₂ neuronale par qui les récepteurs AMPA sont insérés à la membrane postsynaptique lors de la LTP. Quelques indices portent à croire que cet isozyme est situé au réticulum endoplasmique des neurones pyramidaux où il y forme les microtubules de communication au Golgi; une hypothèse qui devra être considérée dans nos prochaines études (Kinsey et al., 2005). Un aspect -qui n'a pas été considéré ici- concernant la régulation des récepteurs au glutamate est la phosphorylation des récepteurs AMPA. La phosphorylation des sous-unités GluR constitue une méthode de signalisation à l'insertion des récepteurs AMPA additionnels à la membrane (Lee et al., 2003; Menard et al., 2005; Soderling et Derkach, 2000). Entre autres choses, la suite du présent projet tentera donc de déterminer si l'influence de la iPLA₂ γ sur le trafic subcellulaire des récepteurs AMPA module l'état de phosphorylation des sous-unités GluR. De plus, la distribution subcellulaire des isoformes de iPLA₂ se doit d'être étudiée pour supporter les hypothèses émergentes du présent projet (FIGURE 3.3). Aussi, comme les expérimentations menées ici l'ont été sur des périodes relativement courtes, les conséquences d'une inhibition de ces enzymes à plus long terme –grâce à l'utilisation

de cultures cellulaires- devront aussi être considérées. Enfin, l'utilisation d'animaux n'exprimant pas certains isoformes de iPLA₂ serait extrêmement pertinente à l'étude des rôles des iPLA₂ sur la plasticité des neurones de l'hippocampe.

Ce projet apporte de nouvelles perspectives de recherche sur les iPLA₂ et la plasticité synaptique. La localisation des différentes isoformes au sein des neurones, de même que la détermination de leur rôle spécifique, peut potentiellement permettre d'expliquer les processus de plasticité et même, dans le cas d'un dérèglement des activités iPLA₂, l'excitotoxicité et la neurodégénérescence des neurones. Une telle caractérisation contribuerait grandement aux connaissances des processus mnésiques et éventuellement mener au développement de nouvelles cibles thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abeliovich A, Chen C, Goda Y, Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S. 1993. Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice. *Cell* 75(7):1253-62.
- Ackermann EJ, Kempner ES, Dennis EA. 1994. Ca(2+)-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 269(12):9227-33.
- Ambros-Ingerson J, Lynch G. 1993. Channel gating kinetics and synaptic efficacy: a hypothesis for expression of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(16):7903-7.
- Ambros-Ingerson J, Xiao P, Larson J, Lynch G. 1993. Waveform analysis suggests that LTP alters the kinetics of synaptic receptor channels. *Brain Res* 620(2):237-44.
- Antonova E, Sharma T, Morris R, Kumari V. 2004. The relationship between brain structure and neurocognition in schizophrenia: a selective review. *Schizophr Res* 70(2-3):117-45.
- Arai A, Lynch G. 1992. Factors regulating the magnitude of long-term potentiation induced by theta pattern stimulation. *Brain Res* 598(1-2):173-84.
- Arai A, Lynch G. 1998a. AMPA receptor desensitization modulates synaptic responses induced by repetitive afferent stimulation in hippocampal slices. *Brain Res* 799(2):235-42.
- Arai A, Lynch G. 1998b. The waveform of synaptic transmission at hippocampal synapses is not determined by AMPA receptor desensitization. *Brain Res* 799(2):230-4.
- Arai A, Silberg J, Lynch G. 1995. Differences in the refractory properties of two distinct inhibitory circuitries in field CA1 of the hippocampus. *Brain Res* 704(2):298-306.
- Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. 1997. Differential regulation of phospholipase D and phospholipase A2 by protein kinase C in P388D1 macrophages. *Biochem J* 321 (Pt 3):805-9.

- Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. 1999. Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:175-89.
- Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. 2002. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* 531(1):2-6.
- Bashir ZI. 2003. On long-term depression induced by activation of G-protein coupled receptors. *Neurosci Res* 45(4):363-7.
- Bear MF, Abraham WC. 1996. Long-term depression in hippocampus. *Annu Rev Neurosci* 19:437-62.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. 1999. *Neurosciences : à la découverte du cerveau*. Rueil-Malmaison: Pradel. xv, 654 p.
- Benke TA, Luthi A, Isaac JT, Collingridge GL. 1998. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393(6687):793-7.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232(2):357-74.
- Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232(2):331-56.
- Bortolotto ZA, Clarke VR, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, Ho KH, Miu P, Brinton BT, Fantaske R and others. 1999. Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* 402(6759):297-301.
- Bradley SR, Levey AI, Hersch SM, Conn PJ. 1996. Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 16(6):2044-56.
- Braithwaite SP, Meyer G, Henley JM. 2000. Interactions between AMPA receptors and intracellular proteins. *Neuropharmacology* 39(6):919-30.

- Brindley DN, English D, Pilquil C, Buri K, Ling ZC. 2002. Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochim Biophys Acta* 1582(1-3):33-44.
- Broutman G, Baudry M. 2001. Involvement of the secretory pathway for AMPA receptors in NMDA-induced potentiation in hippocampus. *J Neurosci* 21(1):27-34.
- Brown WJ, Chambers K, Doody A. 2003. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* 4(4):214-21.
- Burger KN. 2000. Greasing membrane fusion and fission machineries. *Traffic* 1(8):605-13.
- Carroll RC, Lissin DV, von Zastrow M, Nicoll RA, Malenka RC. 1999. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat Neurosci* 2(5):454-60.
- Chabot C, Bernard J, Normandin M, Ohayon M, Baudry M, Massicotte G. 1996. Developmental changes in depolarization-mediated AMPA receptor modifications and potassium-induced long-term potentiation. *Brain Res Dev Brain Res* 93(1-2):70-5.
- Chung HJ, Xia J, Scannevin RH, Zhang X, Huganir RL. 2000. Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J Neurosci* 20(19):7258-67.
- Cooper SJ. 2005. Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. *Neurosci Biobehav Rev* 28(8):851-74.
- Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG. 2002. Role of an endoplasmic reticulum Ca(2+)-independent phospholipase A(2) in oxidant-induced renal cell death. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(3):F492-8.
- de Figueiredo P, Drecktrah D, Katzenellenbogen JA, Strang M, Brown WJ. 1998. Evidence that phospholipase A2 activity is required for Golgi complex and trans Golgi network membrane tubulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15):8642-7.

- de Figueiredo P, Drecktrah D, Polizotto RS, Cole NB, Lippincott-Schwartz J, Brown WJ. 2000. Phospholipase A2 antagonists inhibit constitutive retrograde membrane traffic to the endoplasmic reticulum. *Traffic* 1(6):504-11.
- Dev KK, Honore T, Henley JM. 1997. Effects of phospholipase A2 on alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor subunits. *Biochem Soc Trans* 25(3):537S.
- Disterhoft JF, Wu WW, Ohno M. 2004. Biophysical alterations of hippocampal pyramidal neurons in learning, ageing and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 3(4):383-406.
- Drapeau C, Pellerin L, Wolfe LS, Avoli M. 1990. Long-term changes of synaptic transmission induced by arachidonic acid in the CA1 subfield of the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 115(2-3):286-92.
- Erreger K, Chen PE, Wyllie DJ, Traynelis SF. 2004. Glutamate receptor gating. *Crit Rev Neurobiol* 16(3):187-224.
- Erreger K, Dravid SM, Banke TG, Wyllie DJ, Traynelis SF. 2005. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J Physiol* 563(Pt 2):345-58.
- Farooqui AA, Horrocks LA. 2004. Brain phospholipases A2: a perspective on the history. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 71(3):161-9.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. 2000. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids* 106(1):1-29.
- Freund TF, Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6(4):347-470.
- Fuentes L, Perez R, Nieto ML, Balsinde J, Balboa MA. 2003. Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A2. *J Biol Chem* 278(45):44683-90.

- Fujita S, Ikegaya Y, Nishikawa M, Nishiyama N, Matsuki N. 2001. Docosaheanoic acid improves long-term potentiation attenuated by phospholipase A(2) inhibitor in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 132(7):1417-22.
- Fujita S, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N. 2000. Ca²⁺-independent phospholipase A2 inhibitor impairs spatial memory of mice. *Jpn J Pharmacol* 83(3):277-8.
- Gattaz WF, Cairns NJ, Levy R, Forstl H, Braus DF, Maras A. 1996. Decreased phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 246(3):129-31.
- Gattaz WF, Forlenza OV, Talib LL, Barbosa NR, Bottino CM. 2004. Platelet phospholipase A(2) activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Neural Transm* 111(5):591-601.
- Grewal S, Herbert SP, Ponnambalam S, Walker JH. 2005. Cytosolic phospholipase A2-alpha and cyclooxygenase-2 localize to intracellular membranes of EA.hy.926 endothelial cells that are distinct from the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Febs J* 272(5):1278-90.
- Hardingham GE, Bading H. 2003. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26(2):81-9.
- Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R. 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287(5461):2262-7.
- Holscher C. 2003. Time, space and hippocampal functions. *Rev Neurosci* 14(3):253-84.
- Holscher C, Rose SP. 1994. Inhibitors of phospholipase A2 produce amnesia for a passive avoidance task in the chick. *Behav Neural Biol* 61(3):225-32.
- Jaskolski F, Coussen F, Mulle C. 2005. Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *Trends Pharmacol Sci* 26(1):20-6.
- Jenkins CM, Han X, Mancuso DJ, Gross RW. 2002. Identification of calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) beta, and not iPLA2gamma, as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10

- smooth muscle cells. Enantioselective mechanism-based discrimination of mammalian iPLA2s. *J Biol Chem* 277(36):32807-14.
- Juhl K, Hoy M, Olsen HL, Bokvist K, Efanov AM, Hoffmann EK, Gromada J. 2003. cPLA2 α -evoked formation of arachidonic acid and lysophospholipids is required for exocytosis in mouse pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(1):E73-81.
- Kesner RP, Lee I, Gilbert P. 2004. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev Neurosci* 15(5):333-51.
- Kinsey GR, Cummings BS, Beckett CS, Saavedra G, Zhang W, McHowat J, Schnellmann RG. 2005. Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA2. *Biochem Biophys Res Commun* 327(1):287-93.
- Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116(5):1071-80.
- Kramar EA, Lin B, Lin CY, Arai AC, Gall CM, Lynch G. 2004. A novel mechanism for the facilitation of theta-induced long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 24(22):5151-61.
- Kudo I, Murakami M. 2002. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:3-58.
- Kuroiwa N, Nakamura M, Tagaya M, Takatsuki A. 2001. Arachidonyltrifluoromethyl ketone, a phospholipase A(2) antagonist, induces dispersal of both Golgi stack- and trans Golgi network-resident proteins throughout the cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun* 281(2):582-8.
- Larson J, Lynch G. 1986. Induction of synaptic potentiation in hippocampus by patterned stimulation involves two events. *Science* 232(4753):985-8.
- Larsson PK, Claesson HE, Kennedy BP. 1998. Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A2 and their effect on enzyme activity. *J Biol Chem* 273(1):207-14.

- Lauritzen I, Heurteaux C, Lazdunski M. 1994. Expression of group II phospholipase A2 in rat brain after severe forebrain ischemia and in endotoxic shock. *Brain Res* 651(1-2):353-6.
- Lee HK, Kameyama K, Huganir RL, Bear MF. 1998. NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21(5):1151-62.
- Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS and others. 2003. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112(5):631-43.
- Lee SH, Valtschanoff JG, Kharazia VN, Weinberg R, Sheng M. 2001. Biochemical and morphological characterization of an intracellular membrane compartment containing AMPA receptors. *Neuropharmacology* 41(6):680-92.
- Leslie CC. 2004. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochem Cell Biol* 82(1):1-17.
- Lin B, Colgin LL, Brucher FA, Arai AC, Lynch G. 2002. Interactions between recording technique and AMPA receptor modulators. *Brain Res* 955(1-2):164-73.
- Ling DS, Benardo LS, Serrano PA, Blace N, Kelly MT, Crary JF, Sacktor TC. 2002. Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat Neurosci* 5(4):295-6.
- Lio YC, Reynolds LJ, Balsinde J, Dennis EA. 1996. Irreversible inhibition of Ca(2+)-independent phospholipase A2 by methyl arachidonyl fluorophosphonate. *Biochim Biophys Acta* 1302(1):55-60.
- Lisman J. 2003. Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1432):829-42.
- Lu W, Man H, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, Wang YT. 2001. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 29(1):243-54.

- Lu X, Rong Y, Bi R, Baudry M. 2000. Calpain-mediated truncation of rat brain AMPA receptors increases their Triton X-100 solubility. *Brain Res* 863(1-2):143-50.
- Lucas KK, Dennis EA. 2004. The ABC's of Group IV cytosolic phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 1636(2-3):213-8.
- Luscher C, Xia H, Beattie EC, Carroll RC, von Zastrow M, Malenka RC, Nicoll RA. 1999. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* 24(3):649-58.
- Lynch MA. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84(1):87-136.
- Malinow R. 2003. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1432):707-14.
- Malmberg NJ, Varma S, Jakobsson E, Falke JJ. 2004. Ca²⁺ activation of the cPLA2 C2 domain: ordered binding of two Ca²⁺ ions with positive cooperativity. *Biochemistry* 43(51):16320-8.
- Mancuso DJ, Jenkins CM, Gross RW. 2000. The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *J Biol Chem* 275(14):9937-45.
- Massicotte G. 2000. Modification of glutamate receptors by phospholipase A2: its role in adaptive neural plasticity. *Cell Mol Life Sci* 57(11):1542-50.
- Massicotte G, Baudry M. 1990. Modulation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA)/quisqualate receptors by phospholipase A2 treatment. *Neurosci Lett* 118(2):245-8.
- Matsuda S, Kamiya Y, Yuzaki M. 2005. Roles of the N-terminal domain on the function and quaternary structure of the ionotropic glutamate receptor. *J Biol Chem*.
- Mayorga LS, Colombo MI, Lennartz M, Brown EJ, Rahman KH, Weiss R, Lennon PJ, Stahl PD. 1993. Inhibition of endosome fusion by phospholipase A2 (PLA2) inhibitors points to a role for PLA2 in endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21):10255-9.

- McHowat J, Creer MH. 1998. Calcium-independent phospholipase A2 in isolated rabbit ventricular myocytes. *Lipids* 33(12):1203-12.
- Menard C, Valastro B, Martel MA, Chartier E, Marineau A, Baudry M, Massicotte G. 2005. AMPA receptor phosphorylation is selectively regulated by constitutive phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase activities. *Hippocampus* 15(3):370-80.
- Meng Y, Zhang Y, Jia Z. 2003. Synaptic transmission and plasticity in the absence of AMPA glutamate receptor GluR2 and GluR3. *Neuron* 39(1):163-76.
- Mody I, Pearce RA. 2004. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* 27(9):569-75.
- Mueller HT, Meador-Woodruff JH. 2005. Distribution of the NMDA receptor NR3A subunit in the adult pig-tail macaque brain. *J Chem Neuroanat* 29(3):157-72.
- Murakami M. 2004. Hot topics in phospholipase A2 field. *Biol Pharm Bull* 27(8):1179-82.
- Musleh W, Bi X, Tocco G, Yaghoubi S, Baudry M. 1997. Glycine-induced long-term potentiation is associated with structural and functional modifications of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17):9451-6.
- Nagy GG, Al-Ayyan M, Andrew D, Fukaya M, Watanabe M, Todd AJ. 2004. Widespread expression of the AMPA receptor GluR2 subunit at glutamatergic synapses in the rat spinal cord and phosphorylation of GluR1 in response to noxious stimulation revealed with an antigen-unmasking method. *J Neurosci* 24(25):5766-77.
- Nguyen PV, Duffy SN, Young JZ. 2000. Differential maintenance and frequency-dependent tuning of LTP at hippocampal synapses of specific strains of inbred mice. *J Neurophysiol* 84(5):2484-93.
- Nishio H, Takeuchi T, Hata F, Yagasaki O. 1996. Ca(2+)-independent fusion of synaptic vesicles with phospholipase A2-treated presynaptic membranes in vitro. *Biochem J* 318 (Pt 3):981-7.

- Normandin M, Gagne J, Bernard J, Elie R, Miceli D, Baudry M, Massicotte G. 1996. Involvement of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in homosynaptic long-term depression of the rat hippocampus. *Brain Res* 730(1-2):40-6.
- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. 1991. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(24):11285-9.
- Otmakhov N, Tao-Cheng JH, Carpenter S, Asrican B, Dosemeci A, Reese TS, Lisman J. 2004. Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation. *J Neurosci* 24(42):9324-31.
- Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD. 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305(5692):1972-5.
- Pickard L, Noel J, Duckworth JK, Fitzjohn SM, Henley JM, Collingridge GL, Molnar E. 2001. Transient synaptic activation of NMDA receptors leads to the insertion of native AMPA receptors at hippocampal neuronal plasma membranes. *Neuropharmacology* 41(6):700-13.
- Poncer JC, Esteban JA, Malinow R. 2002. Multiple mechanisms for the potentiation of AMPA receptor-mediated transmission by α -Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci* 22(11):4406-11.
- Riedel G, Wetzel W, Reymann KG. 1996. Comparing the role of metabotropic glutamate receptors in long-term potentiation and in learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 20(5):761-89.
- Ross BM, Turenne S, Moszczynska A, Warsh JJ, Kish SJ. 1999. Differential alteration of phospholipase A2 activities in brain of patients with schizophrenia. *Brain Res* 821(2):407-13.
- Sans N, Racca C, Petralia RS, Wang YX, McCallum J, Wenthold RJ. 2001. Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J Neurosci* 21(19):7506-16.
- Sans N, Vissel B, Petralia RS, Wang YX, Chang K, Royle GA, Wang CY, O'Gorman S, Heinemann SF, Wenthold RJ. 2003. Aberrant formation of glutamate receptor

- complexes in hippocampal neurons of mice lacking the GluR2 AMPA receptor subunit. *J Neurosci* 23(28):9367-73.
- Schaeffer EL, Bassi F, Jr., Gattaz WF. 2005. Inhibition of phospholipase A(2) activity reduces membrane fluidity in rat hippocampus. *J Neural Transm* 112(5):641-7.
- Schaeffer EL, Gattaz WF. 2005. Inhibition of calcium-independent phospholipase A(2) activity in rat hippocampus impairs acquisition of short- and long-term memory. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Sloviter RS. 2005. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *C R Biol* 328(2):143-53.
- Smesny S, Kinder D, Willhardt I, Rosburg T, Lasch J, Berger G, Sauer H. 2005. Increased calcium-independent phospholipase A2 activity in first but not in multiepisode chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 57(4):399-405.
- Snyder EM, Colledge M, Crozier RA, Chen WS, Scott JD, Bear MF. 2005. Role for A kinase-anchoring proteins (AKAPS) in glutamate receptor trafficking and long term synaptic depression. *J Biol Chem* 280(17):16962-8.
- Soderling TR, Derkach VA. 2000. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* 23(2):75-80.
- Stewart A, Ghosh M, Spencer DM, Leslie CC. 2002. Enzymatic properties of human cytosolic phospholipase A(2)gamma. *J Biol Chem* 277(33):29526-36.
- St-Gelais F, Menard C, Congar P, Trudeau LE, Massicotte G. 2004. Postsynaptic injection of calcium-independent phospholipase A2 inhibitors selectively increases AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Hippocampus* 14(3):319-25.
- Takuma T, Ichida T. 1997. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 in exocytosis of amylase from parotid acinar cells. *J Biochem (Tokyo)* 121(6):1018-24.
- Tanaka H, Minakami R, Kanaya H, Sumimoto H. 2004. Catalytic residues of group VIB calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2gamma). *Biochem Biophys Res Commun* 320(4):1284-90.

- Tang J, Kriz RW, Wolfman N, Shaffer M, Seehra J, Jones SS. 1997. A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs. *J Biol Chem* 272(13):8567-75.
- Thompson AM, Swant J, Gosnell BA, Wagner JJ. 2004. Modulation of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine self-administration. *Neuroscience* 127(1):177-85.
- Underwood KW, Song C, Kriz RW, Chang XJ, Knopf JL, Lin LL. 1998. A novel calcium-independent phospholipase A2, cPLA2-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA2. *J Biol Chem* 273(34):21926-32.
- van Zundert B, Yoshii A, Constantine-Paton M. 2004. Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci* 27(7):428-37.
- Wang Z, Ramanadham S, Ma ZA, Bao S, Mancuso DJ, Gross RW, Turk J. 2005. Group VIA phospholipase A2 forms a signaling complex with the calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIbeta expressed in pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem* 280(8):6840-9.
- Wentholt RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS. 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16(6):1982-9.
- Williams JH, Errington ML, Lynch MA, Bliss TV. 1989. Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 341(6244):739-42.
- Wolf MJ, Gross RW. 1996. The calcium-dependent association and functional coupling of calmodulin with myocardial phospholipase A2. Implications for cardiac cycle-dependent alterations in phospholipolysis. *J Biol Chem* 271(35):20989-92.
- Wolf MJ, Izumi Y, Zorumski CF, Gross RW. 1995. Long-term potentiation requires activation of calcium-independent phospholipase A2. *FEBS Lett* 377(3):358-62.
- Xia Z, Storm DR. 2005. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6(4):267-76.

- Xie X, Liaw JS, Baudry M, Berger TW. 1997. Novel expression mechanism for synaptic potentiation: alignment of presynaptic release site and postsynaptic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):6983-8.
- Yagi K, Shirai Y, Hirai M, Sakai N, Saito N. 2004. Phospholipase A2 products retain a neuron specific gamma isoform of PKC on the plasma membrane through the C1 domain--a molecular mechanism for sustained enzyme activity. *Neurochem Int* 45(1):39-47.
- Yang HC, Mosior M, Ni B, Dennis EA. 1999. Regional distribution, ontogeny, purification, and characterization of the Ca²⁺-independent phospholipase A2 from rat brain. *J Neurochem* 73(3):1278-87.
- Yoshimura Y, Shinkawa T, Taoka M, Kobayashi K, Isobe T, Yamauchi T. 2002. Identification of protein substrates of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in the postsynaptic density by protein sequencing and mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 290(3):948-54.
- Zucker RS, Regehr WG. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.

