

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LE CERVEAU: ANALYSE BIOCHIMIQUE
ET DIFFÉRENTIELLE DU SYSTÈME GLUTAMATERGIQUE
PAR IMMUNOBUVARDAGE QUANTITATIF

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
HOU VE

FÉVRIER 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de recherche, Pr Marc Lussier, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire pour effectuer ma maîtrise sous sa direction durant ces deux années. Je le remercie de m'avoir orienté, encadré et conseillé. Merci pour le soutien qu'il m'a apporté dans la gestion de mon projet de recherche.

Je voudrais remercier les membres du jury, les Prs Borhane Annabi et Claire Bénard, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail de recherche et d'avoir accepté de prendre leur temps pour l'évaluer.

Un grand merci à mes collègues de laboratoire. Merci d'abord à Camille Desroches pour sa bonne humeur communicative et son dynamisme. Sans elle, je n'aurais pas connu ce laboratoire épanouissant. Merci également à Julie Arteau pour son immense gentillesse et son support durant mes premiers jours de maîtrise. Merci à Kim Ghilarducci pour son aide technique, ses nombreux conseils et son soutien psychologique malgré toutes les petites disputes inutiles et amusantes que nous avons eu durant notre parcours académique. Merci encore une fois à elles pour avoir rendu ces deux années inoubliables et pour leur sincère amitié et confiance.

Je remercie enfin ma famille pour leur soutien constant et sans limites, tant au niveau moral et affectif.

DÉDICACE

À mes chers amis.

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Système nerveux chez les vertébrés	1
1.2 Cerveau	3
1.3 Cortex cérébral.....	3
1.4 Cellules du système nerveux central.....	4
1.4.1 Cellules gliales.....	4
1.4.2 Neurones	6
1.5 Synapses du système nerveux central.....	7
1.6 Biochimie de la neurotransmission chez les mammifères.....	10
1.7 Compartiment terminal présynaptique	11
1.7.1 Synaptophysine.....	12
1.7.2 Antigène-1 des endosomes primaires (EEA1).....	13
1.8 Épines dendritiques.....	14
1.8.1 Densité postsynaptique	15
1.8.2 Plasticité synaptique	16
1.8.3 Récepteurs AMPA	18
1.8.4 Récepteurs NMDA	19

1.8.5	Les protéines d'échafaudage de la PSD.....	20
1.8.6	Cytosquelette neuronal	21
1.9	Présentation du projet	22
1.9.1	Contexte du vieillissement chez l'humain	22
1.9.2	Objectifs du projet	24
1.9.3	Problématique de l'immunobuvardage quantitatif	24
1.9.4	Choix du modèle.....	25
CHAPITRE II MÉTHODES.....		26
2.1	Animaux et prélèvement du cerveau	26
2.2	Isolation de la densité postsynaptique du cortex de souris.....	26
2.3	Immunobuvardage de type Western	27
2.4	Analyse quantitative et statistique	28
CHAPITRE III RÉSULTATS		31
3.1	Fractionnement subcellulaire du cortex de souris	31
3.2	Domaine de quantification des protéines par immunobuvardage.....	33
3.3	Expression des sous-unités des AMPARs	40
3.4	Expression des sous-unités des NMDARs	42
3.7	Expression des protéines d'échafaudage	44
3.8	Expression des protéines cytosquelettiques.....	46
3.9	Expression des protéines de vésicule.....	48
CHAPITRE IV DISCUSSION		50
RÉFÉRENCES.....		65

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1. 1	Illustration des différents lobes du cortex cérébral humain 4
1. 2	Illustration de l'organisation des cellules gliales et des neurones du SNC..... 5
1. 3	Représentation d'un neurone typique. 7
1. 4	Comparaison entre les synapses chimiques et électriques 9
1. 5	Recyclage du glutamate synaptique 11
1. 6	Représentation globale du cycle de vésicules synaptiques. 12
1. 7	Classification morphologique des épines dendritiques. 15
1. 8	Organisation moléculaire de la densité postsynaptique 16
1. 9	Structure des sous-unités du AMPAR..... 19
2. 1	Quantification et normalisation des bandes sur ImageLab 30
2. 2	Exemple de soustraction du bruit de fond 30
3. 1	L'âge n'affecte pas le fractionnement subcellulaire du cortex de souris 32
3. 2	Domaine linéaire du signal stain-free sur membrane PVDF..... 35
3. 3	Domaine de linéarité du signal chimiluminescent pour la quantification des sous-unités des récepteurs de glutamate..... 36
3. 4	Domaine de linéarité du signal chimiluminescent pour la quantification des protéines d'échafaudage, du cytosquelette et de vésicules..... 37
3. 5	Immunobuvardage avec les anticorps sur différentes dilutions des fractions isolées 38
3. 6	Linéarité du signal chimiluminescent dans les différentes fractions isolées... 39
3. 7	Expression des sous-unités des AMPARs chez les souris matures et âgées... 41
3. 8	Expression des sous-unités des NMDARs chez les souris matures et âgées .. 43
3. 9	Expression des protéines d'échafaudage au cours du vieillissement des neurones corticaux chez la souris 45

3. 10	Expression des protéines du cytosquelette chez les souris matures et âgées ..	47
3. 11	Le vieillissement normal a un effet au niveau du compartiment présynaptique	49
4. 1	Modèle proposé des changements durant le vieillissement normal chez la souris	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1 Liste d'anticorps utilisés pour l'immunobuvardage	29

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMPAR	Récepteur AMPA
CamKII	Kinase II calmoduline-dépendante
EAAT	Transporteurs des acides aminés excitateurs
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EEA1	Antigène-1 des endosomes primaires
GABA	acide γ -aminobutyrique
GluA	Sous-unité du AMPAR
GluN	Sous-unité du NMDAR
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NMDAR	Récepteur NMDA
HRP	Peroxydase de raifort
PKC	Protéine kinase C
PNS	Surnagent postnucléaire
PSD	Densité postsynaptique
PVDF	Polyvinylidène difluoride
SDS-PAGE	Gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SEM	Erreur standard sur la moyenne
SNA	Système nerveux autonome
SNAP-25	<i>Synaptosomal nerve-associated protein 25 kDa</i>

SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SNC	Système nerveux central
SPM	Membrane synaptosomale
SSM	Membrane synaptosomale soluble
SV	Vésicule synaptique
TBS-T	Tampon Tris salin avec Tween
VAMP	Protéine membranaire associée aux vésicules
VGLUT	Transporteurs vésiculaires du glutamate

RÉSUMÉ

Le cerveau contient des milliards de neurones qui sont connectés entre eux pour former un réseau de communication pouvant accomplir des fonctions cognitives tels que l'apprentissage et la mémoire. Ces connexions, appelées synapses, dépendent de la composition des protéines impliquées dans la neurotransmission. Or, il est connu que le vieillissement entraîne une diminution de l'efficacité de la neurotransmission, menant ainsi à un déclin cognitif. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulant l'activité neuronale chez un sujet âgé, le but du projet est de déterminer l'impact du vieillissement sur l'expression des protéines synaptiques. À partir des cortex de souris âgées de 7 et de 22 mois, différents compartiments cellulaires ont été isolés par fractionnement pour évaluer l'expression des sous-unités des récepteurs de glutamate (AMPA et NMDA) ainsi que d'autres composantes synaptiques telles que les protéines du cytosquelette (actine et tubuline), d'échafaudage (PSD-95 et Shank) et de vésicules (synaptophysine et EEA1). Les protéines isolées de différents compartiments cellulaires ont été séparées sur des gels *stain-free* et analysées par immunobuvardage quantitatif. À la suite de la détermination du signal linéaire de quantification, l'analyse des protéines au niveau postsynaptique a montré que l'expression des sous-unités du récepteur AMPA n'a pas changé chez les souris âgées. L'expression des sous-unités GluN1 et GluN2B ont diminué dans la fraction membranaire, mais aucune variation d'expression de ces sous-unités n'a été observée au niveau de la densité postsynaptique. De plus, les changements d'expression des protéines d'échafaudage et du cytosquelette chez les souris âgées indiquent possiblement un changement morphologique des épines dendritiques. Au niveau présynaptique, une diminution d'expression de la synaptophysine a été observée dans plusieurs compartiments. En somme, les résultats supportent que le vieillissement exerce un effet sur la morphologie des épines dendritiques chez les souris âgées. Sachant que d'autres protéines impliquées dans la neurotransmission peuvent être affectées en fonction de l'âge, les résultats de ce projet permettront d'identifier des biomarqueurs précoces afin de mieux comprendre la frontière entre le vieillissement normal et pathologique.

MOTS CLÉS : Vieillissement, Synapse, Cortex cérébral, Fractionnement cellulaire, Immunobuvardage quantitative

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Système nerveux chez les vertébrés

Le système nerveux est le centre de contrôle qui permet d'intégrer et analyser les informations afin d'induire une réponse adaptée en coordonnant de manière fonctionnelle les autres systèmes corporelles. Il contient des neurones qui s'organisent en un réseau complexe et communiquent entre eux pour réguler les activités de l'organisme. Le système nerveux est composé de deux grandes parties : le système nerveux central et le système nerveux périphérique (Catala et Kubis, 2013).

Le système nerveux central (SNC) est composé de neurones et de cellules gliales ayant des fonctions de soutien, de protection et d'isolement des neurones (Mota et Herculano-Houzel, 2014). Il est constitué de l'encéphale contenu dans la boîte crânienne et de la moelle épinière étant incluse dans la colonne vertébrale (Catala et Kubis, 2013). Dans le langage courant, l'encéphale comprend le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral. Le système nerveux central a pour rôle de recevoir, d'enregistrer et d'interpréter les informations provenant de la périphérie. Le système nerveux périphérique est constitué de nerfs crâniens et de nerfs rachidiens qui relient le cerveau à toutes les parties de l'organisme. Il permet la circulation des informations sensibles et motrices. Le système nerveux périphérique comprend deux

parties : le système nerveux somatique et le système nerveux autonome (Catala et Kubis, 2013).

Le système nerveux somatique est responsable du mouvement des muscles volontaires. Sa fonction primaire est de connecter le SNC avec les organes et les muscles pour accomplir des réponses motrices. Le système nerveux somatique est composé de deux types de cellules nerveuses : les neurones sensoriels (ou afférents) qui transmettent les informations au SNC et les neurones moteurs (ou efférents) qui relient les informations du SNC aux muscles (Catala et Kubis, 2013).

Le système nerveux autonome (SNA), aussi appelé végétatif est impliqué dans la régulation de la circulation et de l'environnement interne du corps (McCorry, 2007). Il joue un rôle dans l'homéostasie, ce qui lui donne une importance vitale pour le bon fonctionnement de l'organisme (Stern et al., 2000; Wehrwein et al., 2016). De façon globale, le SNA contrôle les actions inconscientes qui ne sont pas contrôlées volontairement. Ces actions incluent la régulation de la circulation sanguine, de la digestion, de la respiration, de la température corporelle et du métabolisme (Wehrwein et al., 2016). C'est un système qui permet alors l'adaptation de l'organisme à son environnement. Le SNA est composé de deux branches principales: le système sympathique et le système parasympathique (Catala et Kubis, 2013). Ensemble, ces deux systèmes interagissent de façon complexe, soit en s'opposant ou en synergie selon les organes ciblés (McCorry, 2007). Le système nerveux sympathique mobilise principalement l'organisme pour l'action lorsqu'il y a un changement environnemental nouveau. Il est continuellement actif, mais son niveau d'activité varie d'un moment à un autre. À l'inverse, le système nerveux parasympathique a pour but de conserver ou d'économiser l'énergie tout en maintenant l'activité de base durant une période de repos (Stern et al., 2000). Il assure, à long terme, le maintien de l'homéostasie et la régénération des réserves pour la survie (Wehrwein et al., 2016).

1.2 Cerveau

Le cerveau est constitué de deux hémisphères (droit et gauche) séparés par un espace (scissure) interhémisphérique. Chacun de ces hémisphères, qui sont réunis par le corps calleux, contrôle les réponses motrices de la moitié du corps opposée. À l'intérieur du cerveau se trouvent des cavités remplies de liquide céphalo-rachidien, appelées ventricules, qui circule pour nourrir et protéger le cerveau. Il contribue également dans l'élimination des déchets dans le tissu (Sakka et al., 2011). Le cerveau est constitué de deux types de tissus principaux appelés substance grise et substance blanche. La substance grise, aussi appelée le cortex, contient les corps cellulaires des neurones, alors que la substance blanche contient leur axone qui forme un réseau de communication entre les aires cérébrales (Wen et Chklovskii, 2005).

1.3 Cortex cérébral

Le cortex cérébral recouvre la périphérie des deux hémisphères du cerveau et le cervelet. Il est replié en plusieurs sillons plus ou moins profonds créant des convolutions à la surface appelées gyrus. Les profonds sillons divisent le cerveau en cinq lobes cérébraux distincts, soit le lobe pariétal, le lobe occipital, le lobe temporal, le lobe frontal et le lobe insulaire. Chacun de ces lobes accomplit des fonctions différentes (Fig.1.1). Les neurones retrouvés dans le cortex cérébral sont principalement impliqués dans la réception de stimulations telles que les sensations tactiles, visuelles, et auditives. La substance grise possède des fonctions motrices pour la coordination des mouvements volontaires. D'un point de vue évolutif, le cortex cérébral chez l'humain est particulièrement développé de tout le règne animal (Rakic, 2009). Il est composé de couches nommées archicortex et paleocortex et d'une couche appelée neocortex qui est associée à l'intelligence et à l'apprentissage (Klingler, 2017).

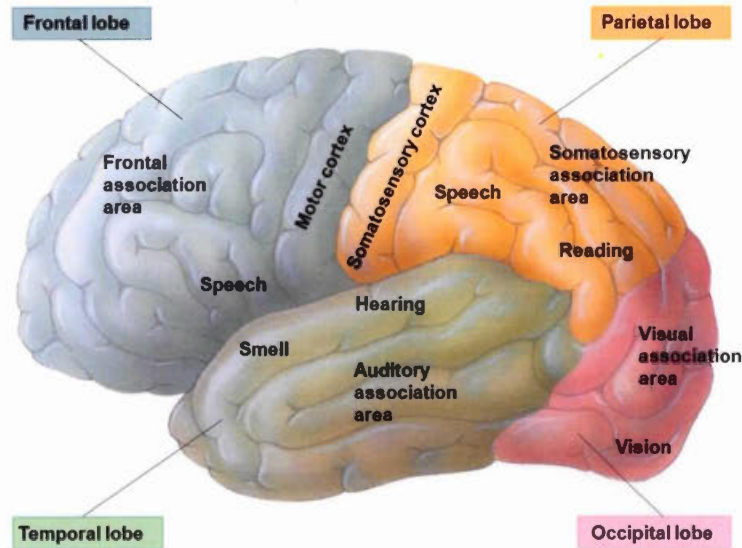


Fig 1. 1 Illustration des différents lobes du cortex cérébral humain

Chaque hémisphère du cortex cérébral est composé de cinq lobes dans lesquelles différentes fonctions sont générées. Cette figure n'illustre pas le cinquième lobe, le lobe insulaire, qui est situé à l'intérieur du sillon latéral séparant le lobe pariétal et temporal. Adapté de Campbell et al., 2007

1.4 Cellules du système nerveux central

Le tissu cérébral est formé de deux types de cellules : les cellules gliales et les neurones. Ces cellules interagissent entre elles pour permettre le fonctionnement du SNC.

1.4.1 Cellules gliales

Les cellules gliales participent au soutien morphologique et nutritionnel pour les neurones et assurent plusieurs fonctions durant le développement embryonnaire et lors de maladies du système nerveux (Attwell et al., 2010; Tsacopoulos et Magistretti, 1996). Elles ont également des rôles actifs dans la synaptogénèse, c'est-à-dire la formation des synapses (Pfrieger, 2009) Contrairement aux neurones, les cellules gliales ne sont pas électriquement excitables, mais possèdent la capacité de se diviser. Il y a trois différents types de cellules gliales dans le SNC des Vertébrés : les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies (Fig.1.2).

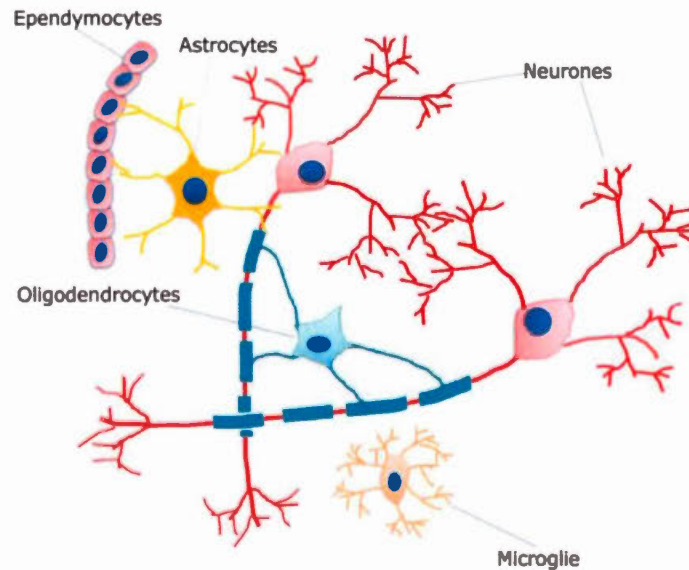


Fig 1. 2 Illustration de l'organisation des cellules gliales et des neurones du SNC
Adapté de Xiao et al., 2014.

Les astrocytes jouent plusieurs rôles durant le développement du SNC. En particulier, ils guident la migration des neurones (Powell et Geller, 1999) et assurent la formation et la plasticité des synapses entre les neurones (Vaccarino et al., 2007). Par ailleurs, ils sont reconnus pour influencer la survie et la croissance des neurones en produisant des facteurs de croissance neurotrophique (Alderson et al., 1990). Ils participent également dans la régénération et la réparation des neurones endommagés (Vaccarino et al., 2007). Il a été démontré que ces cellules contrôlent l'homéostasie des ions et des neurotransmetteurs au niveau extracellulaire. En absence d'astrocytes, les neurones en culture possèdent une faible activité synaptique (Pfrieger et Barres, 1997).

Les oligodendrocytes possèdent un rôle dans la formation de la gaine de myéline autour de l'axone des neurones. La raison de cet emballage riche en lipides permet l'accélération de la conduction nerveuse. En conséquence, la mort des

oligodendrocytes consiste en la démyélination des neurones, causant un délai ou un blocage de la conduction nerveuse des axones (McTigue et Tripathi, 2008).

Les microglies représentent le système immunitaire du cerveau. Elles sont des cellules phagocytaires qui partagent des propriétés avec les macrophages retrouvés dans d'autres tissus. En cas de lésions cérébrales ou de pathologies, les cellules microgliales interviennent pour enlever les débris cellulaires (Li et Barres, 2018). Bref, les différents types de cellules gliales possèdent des fonctions qui assurent le bon fonctionnement des neurones du SNC.

1.4.2 Neurones

Le cerveau comporte des milliards de cellules nerveuses appelées neurones qui forment un réseau complexe permettant d'accomplir des fonctions cognitives. Les neurones (Fig.1.3) sont les unités fonctionnelles de base du système nerveux. La diversité de forme cellulaire des neurones est une caractéristique bien distincte des autres cellules et leur distribution dans le système nerveux reflète leur fonction principale étant la communication. Les neurones sont en effet des cellules complexes qui sont capables de recevoir, d'intégrer et de transmettre de l'information sous forme de signaux électriques (Tahirovic et Bradke, 2009). Les neurones ont un corps cellulaire (ou soma) contenant le noyau et la majorité des organelles. Le corps cellulaire est muni de deux types de prolongement : les dendrites et un axone (Craig et Banker, 1994). Les dendrites forment des prolongements très ramifiés recouverts d'épines dendritiques qui constituent le compartiment postsynaptique receveur de l'influx nerveux des synapses chimiques. L'axone transmet l'influx à un autre neurone. Il se termine par des courtes ramifications, les télodendrons, dont les extrémités forment des corpuscules nerveux terminaux (ou boutons synaptiques) où les neurotransmetteurs sont entreposés et libérés aux autres neurones. Contrairement

aux dendrites, l'axone est entouré de gaines de myéline qui permettent d'augmenter la vitesse de propagation d'un influx nerveux (Guillery, 2005).

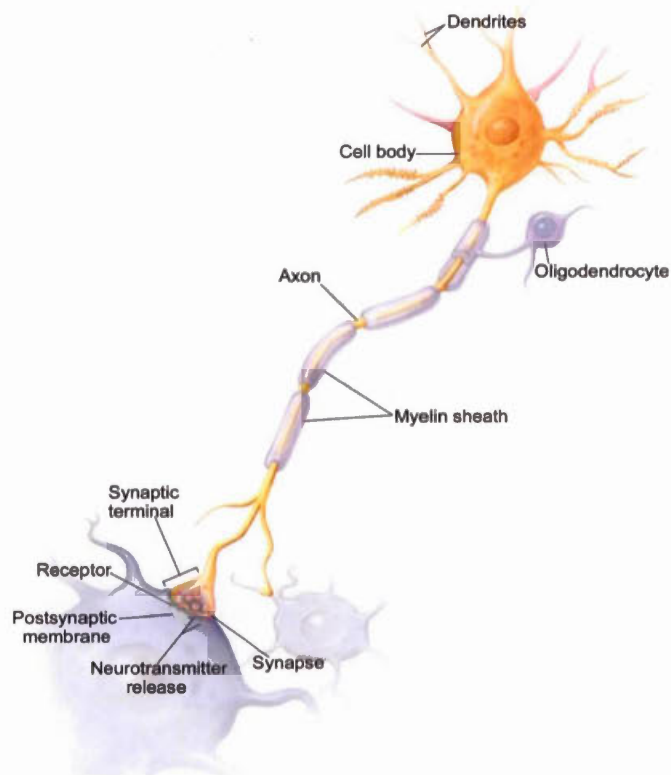


Fig 1. 3 Représentation d'un neurone typique

Les neurones possèdent des dendrites qui permettent de recevoir les influx nerveux. Ils ont également un axone entouré de gaines de myéline pour transmettre un influx nerveux jusqu'au terminal synaptique. Au niveau des synapses, les neurotransmetteurs sont relâchés pour induire un autre influx nerveux chez le neurone postsynaptique. Adapté à partir de Terese Winslow, 2001

1.5 Synapses du système nerveux central

Le fonctionnement du système nerveux se base sur la transmission de nombreuses informations entre les neurones au moyen des jonctions particulières, les

synapses. Une synapse est composée d'un compartiment présynaptique constitué de corpuscule nerveux terminal du neurone émetteur et d'un compartiment postsynaptique situé sur la dendrite ou le corps cellulaire du neurone receveur (Sudhof et Malenka, 2008). Ces deux compartiments ne sont pas en contact direct, mais sont séparés par un espace appelé fente synaptique dans le cas des synapses chimiques. Il existe en effet deux types de synapse (Fig.1.4) : la synapse chimique et la synapse électrique (Gilles, 2005). La synapse électrique permet la communication entre deux neurones par des signaux électriques sans impliquer l'action des molécules chimiques. Dans les synapses électriques, la propagation d'un influx nerveux est effectuée par le passage des ions entre deux neurones au travers des canaux ioniques appelés jonctions communicantes (Gilles, 2005). La synapse chimique, plus complexe et plus abondante que la synapse électrique, utilise la libération des neurotransmetteurs pour transmettre un influx nerveux. Dans ce cas, la neurotransmission a lieu lorsque le potentiel d'action induit au niveau de la terminaison présynaptique la fusion des vésicules remplies de neurotransmetteurs. Les neurotransmetteurs diffusent dans la fente synaptique et se fixent à leurs récepteurs-canaux spécifiques qui sont exprimés au niveau de la membrane postsynaptique. La fixation du neurotransmetteur provoque l'ouverture des canaux ioniques et permet le relai du signal à un autre neurone (Gilles, 2005). Dans la présente étude, les synapses électriques ne seront pas élaborées en détail.

En fonction du type de neurotransmetteur libéré, les synapses chimiques peuvent avoir un rôle excitateur, inhibiteur ou modulateur. En effet, le type de neurotransmetteur libéré influence l'excitabilité des neurones postsynaptiques. Dans le cas des synapses glutamatergiques, la fixation du glutamate à son récepteur, principalement AMPAR et NMDAR, favorisera la production d'un potentiel d'action, alors que les synapses inhibitrices impliquant principalement la libération de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et de la glycine vont empêcher un potentiel d'action dans le cerveau adulte. Le glutamate et le GABA sont respectivement les principaux

neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs dans le SNC (Lujan et al., 2005). La neurotransmission modulatrice a pour but de contrôler l'efficacité de la communication synaptique entre les neurones en reposant sur le relâchement des neuromodulateurs comme la dopamine, la sérotonine et les neuropeptides. À cet effet, la modulation peut se faire au niveau présynaptique en régulant la libération des neurotransmetteurs (Logsdon et al., 2006) ou au niveau postsynaptique pour ajuster la sensibilité des récepteurs (Feng et al., 2001; Sun et al., 2005). Dans le cadre de cette étude, les synapses glutamatergiques seront uniquement abordées.

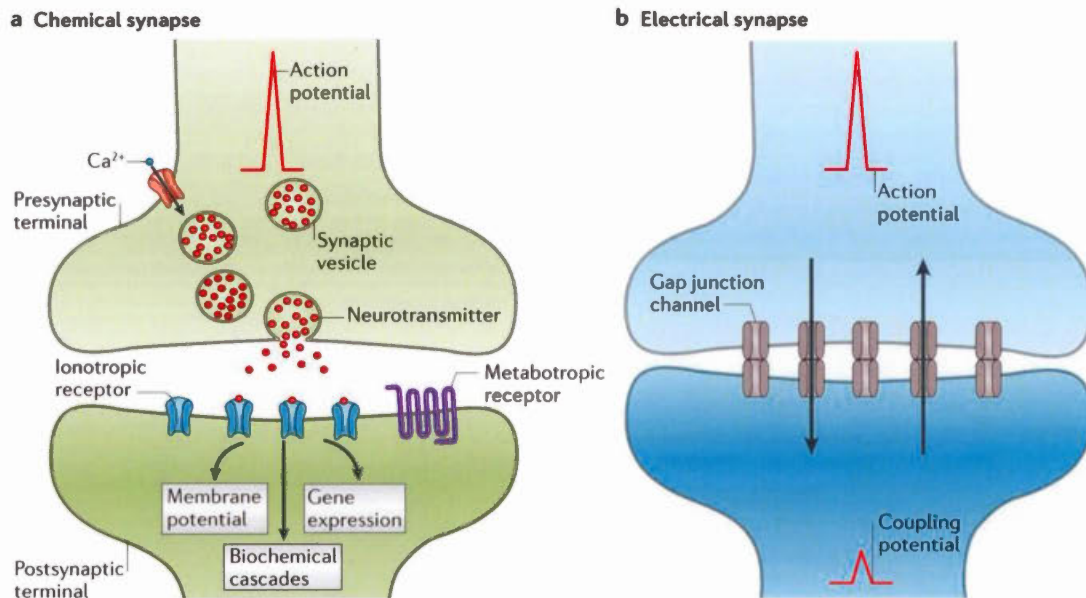


Fig 1. 4 Comparaison entre les synapses chimiques et électriques

(A) Les synapses chimiques sont basées sur le relâchement des neurotransmetteurs à l'arrivée d'un potentiel d'action. Les neurotransmetteurs libérés se fixent sur les récepteurs qui vont déclencher plusieurs processus de signalisation intracellulaire chez le neurone postsynaptique. (B) Les synapses électriques reposent sur des jonctions communicantes permettant les échanges d'information entre deux neurones adjacents. La communication se fait par le passage des ions (flèches) qui peut se faire dans deux directions. Adapté de Pereda, 2014.

1.6 Biochimie de la neurotransmission chez les mammifères.

La neurotransmission synaptique est effectuée par l'intermédiaire des molécules neuromédiatrices qui sont sécrétées par un neurone et reconnues par des récepteurs à la surface de la membrane postsynaptique du neurone distal. Les neurotransmetteurs sont synthétisés dans le cytoplasme du terminal présynaptique et accumulés dans les vésicules synaptiques à l'aide des protéines transporteuses sélectives (Sudhof, 2004). Ensuite, ces vésicules sont transportées vers une région spécifique de la membrane présynaptique. Cette région, désignée par le nom de zone active, est en fait le site de fusion vésiculaire au niveau des synapses où se retrouvent plusieurs protéines servant à diriger et à grouper les vésicules localement pour le relâchement des neurotransmetteurs par exocytose (Matteoli et De Camilli, 1991). La zone active contient également des protéines impliquées dans l'arrimage des vésicules à la membrane et dans le recyclage membranaire des vésicules après la fusion (Matteoli et De Camilli, 1991; Sudhof, 2004). Lorsqu'un potentiel d'action arrive à la terminaison présynaptique, les canaux calciques voltage-dépendants s'ouvrent au niveau de la membrane plasmique. Cette ouverture entraîne une augmentation locale de la concentration de calcium permettant la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. Ceci relâche les neurotransmetteurs dans la fente synaptique par le phénomène d'exocytose (Smith et Augustine, 1988). Une fois libérés dans la fente synaptique, les neurotransmetteurs peuvent se fixer à leur récepteur protéique. La liaison des neurotransmetteurs induit un changement conformationnel permettant l'entrée des ions à travers la membrane postsynaptique. Simultanément, les neurotransmetteurs peuvent également être recaptés par l'action des transporteurs spécifiques (Shigeri et al., 2004) (Fig 1.5). Dans le cas du glutamate, ce neurotransmetteur est recapté par des transporteurs des acides aminés excitateurs (EAAT) situés à la surface des cellules du SNC. Une fois internalisé, le glutamate peut être dégradé par des enzymes ou recyclé dans des vésicules

synaptiques à partir des transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT). Il est aussi possible que les neurotransmetteurs soient recyclés par la formation de nouvelles vésicules synaptiques par endocytose (Sudhof, 2004).

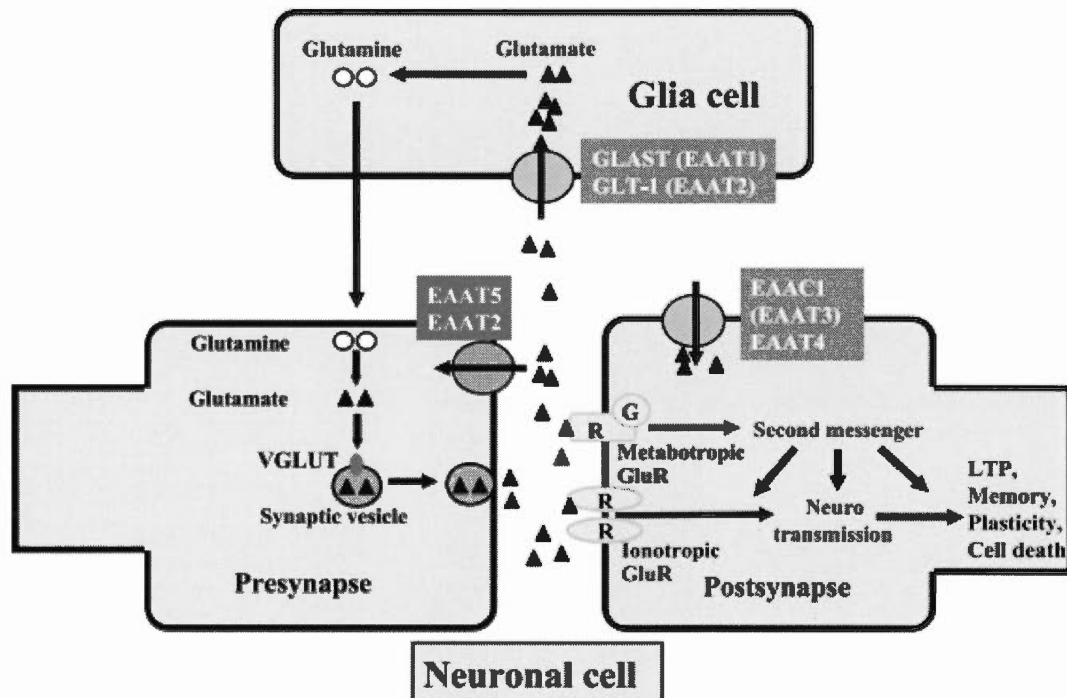


Fig 1. 5 Recyclage du glutamate synaptique

Dans la fente synaptique, la fixation du glutamate à son récepteur ionotropique engendre des processus postsynaptiques. Durant ce même temps, le glutamate peut être recapté vers l'intérieur des neurones et des cellules gliales via les transporteurs d'acide aminé excitateur (EAAT). Au niveau des cellules gliales, le glutamate est converti en glutamine, puis acheminé vers les neurones où il pourrait être reconverti en glutamate. Le glutamate recapté dans les neurones est ensuite recyclé dans des vésicules synaptiques au moyen des transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT). Adapté de Shigeri et al., 2004.

1.7 Compartiment terminal présynaptique

Situé à l'extrémité de l'axone, le terminal présynaptique ou le bouton synaptique est un compartiment dynamique ayant beaucoup d'activité de trafic vésiculaire. Le recyclage des vésicules synaptiques est un processus essentiel pour le

fonctionnement des neurones. Les processus clés du recyclage des vésicules synaptiques sont l'exocytose et l'endocytose (Fig 1.6) qui dépendent de la formation et de la dissociation des complexes protéiques. Le terminal présynaptique contient une zone active qui couvre une région de la membrane présynaptique. Cette zone est le site où les vésicules remplies de neurotransmetteurs se regroupent par arrimage et se fusionnent avec la membrane pour libérer leur contenu à l'arrivée d'un influx nerveux.

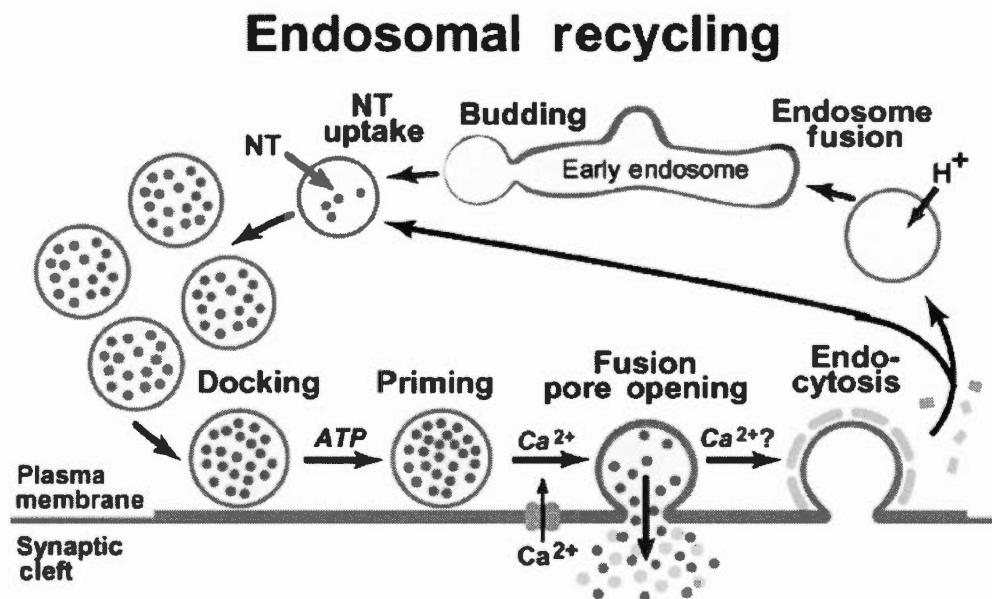


Fig 1. 6 Représentation globale du cycle de vésicules synaptiques.

Les vésicules synaptiques se remplissent de neurotransmetteurs (NT), puis s'arriment au niveau de la membrane plasmique. À l'arrivée d'un potentiel d'action, l'entrée des ions calcium (Ca^{2+}) induit la fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu par exocytose dans la fente synaptique. À l'aide des clathrines les vésicules sont régénérées par endocytose pour répéter le cycle. Adapté de Sudhof, 2004.

1.7.1 Synaptophysine

Il existe plusieurs protéines impliquées dans le processus de trafic vésiculaire au niveau des synapses des neurones. La protéine membranaire des vésicules présynaptiques la plus abondante est la synaptophysine qui représente environ 10%

des protéines vésiculaires totales (Takamori et al., 2006). Malgré qu'elle soit largement utilisée comme marqueur présynaptique, sa fonction précise reste encore à être élucidée. Plusieurs études ont montré ses rôles dans la régulation du relâchement des neurotransmetteurs et dans la plasticité synaptique (Alder et al., 1992; Edelmann et al., 1995; Janz et al., 1999). Sa capacité d'interagir avec d'autres protéines telles que les VAMPs (protéine membranaire associée aux vésicules), propose un rôle dans l'arrimage et la fusion des vésicules étant nécessaire pour l'exocytose (Calakos et Scheller, 1994). Il a été également montré qu'elle joue un rôle dans la formation et dans le recyclage des vésicules (Daly et Ziff, 2002; Thiele et al., 2000). Synaptophysine possède un rôle dans la formation de synapses durant le développement du cerveau (Leclerc et al., 1989). De plus, son niveau d'expression corrèle avec la potentialisation à long terme ce qui lui donne une implication importante dans les fonctions cognitives telles que la mémoire et l'apprentissage (Mullany et Lynch, 1997). Chez l'humain, l'expression de synaptophysine se voit diminuée au cours du vieillissement (Head et al., 2009), ce qui lui donne une importance dans la modulation du cycle de vésicule synaptique.

1.7.2 Antigène-1 des endosomes primaires (EEA1)

Après l'internalisation des neurotransmetteurs de la fente synaptique, les vésicules d'endocytose sont triées à travers des voies endosomales. Les endosomes précoces sont les compartiments majeurs pour le triage qui permet d'acheminer le contenu des vésicules vers la voie de recyclage ou vers la voie de dégradation. L'une des protéines essentielles pour accomplir le recyclage des vésicules est Antigène-1 des endosomes primaires (EEA1). Étant recrutée par Rab5 et impliqué dans la biogénèse des endosomes, elle possède un rôle dans la régulation des interactions entre les protéines SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) (Clague et Urbe, 2001). Celles-ci permettent en effet la reconnaissance entre les membranes vésiculaires et la fusion spécifique entre les

membranes (Malsam et al., 2008). Autrement dit, EEA1 joue un rôle clé dans l'arrimage des endosomes précoces avec les vésicules avant la fusion. Comparativement à synaptophysine, EEA1 n'est pas exclusivement exprimé au niveau du terminal synaptique. Au niveau des épines postsynaptiques, elle possède un rôle important dans la plasticité synaptique en s'impliquant dans l'endocytose des AMPARs (Xu et Pozzo-Miller, 2017).

1.8 Épines dendritiques

La grande majorité des synapses glutamatergiques se situe au niveau des épines dendritiques (Dickstein et al., 2013). Les épines dendritiques sont des bourgeons qui émergent de la membrane plasmique de la dendrite neuronale. Elles ont un rôle de support pour établir les synapses entre les neurones (Fiala et al., 1998). Les épines dendritiques, constituées d'une tête et d'un cou, sont classées en trois principales catégories en fonction de la forme de leur tête et de leur cou, soit fine, trapue ou champignon (Fig 1.7). Les épines fines (*thin*) sont décrites par leur cou long et fin terminant avec une petite tête à l'extrémité. Les épines trapues (*stubby*) sont courtes et dépourvues de cou. Les épines matures dites champignon (*mushroom*) sont caractérisées par un petit cou et une large tête. Bien que ces catégories soient encore utilisées jusqu'à présent, des études en microscopie en temps réel ont démontré que les épines sont des compartiments dynamiques qui peuvent changer de taille et de forme en quelques secondes (Fischer et al., 1998; Trachtenberg et al., 2002). De ce fait, il a été aussi considéré que les filopodes caractérisés par leur long cou sans tête à l'extrémité sont des précurseurs d'épines dendritiques (Skoff et Hamburger, 1974). En plus de leur variation de forme et de taille, les épines dendritiques agissent comme des compartiments semi-autonomes et ont la capacité de modifier leur composition de protéines localement (Sorra et Harris, 2000). Il a été établi qu'il existe une corrélation entre la morphologie des épines et la force synaptique. Des études ont en effet

démonstré que la grosseur de la densité postsynaptique est en fonction de la taille des épines dendritiques (Kasai et al., 2003; Tada et Sheng, 2006). Les épines larges, comme dans le cas du type champignon, possèdent une plus grande diversité de composés moléculaires et d'organelles que les autres catégories d'épines (Spacek et Harris, 1997).

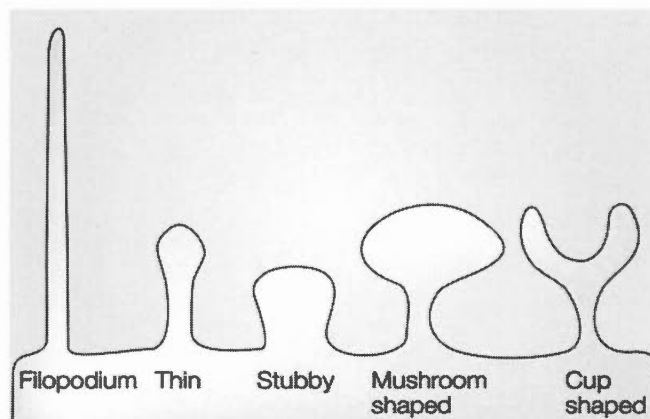


Fig 1. 7 Classification morphologique des épines dendritiques

Les épines dendritiques sont catégorisées en fonction de leur forme. La morphologie des épines dendritique change en fonction de l'activité synaptique. Adapté de Hering et Sheng, 2001

1.8.1 Densité postsynaptique

La densité postsynaptique (PSD) a été initialement identifiée par microscopie électronique. L'origine de son nom est due à sa haute teneur en protéines et en lipides qui donne une région dense aux électrons à la membrane du neurone postsynaptique (Suzuki et Tanaka, 1986) (Fig 1.8). À ce jour, des centaines de protéines ont été identifiées à la PSD dont des récepteurs-canaux, des canaux ioniques, des protéines d'échafaudage et des protéines cytosquelettiques (Bayes et al., 2011; Suzuki et al., 2011; Walikonis et al., 2000). La PSD d'un neurone glutamatergique est composée principalement de récepteurs au glutamate tels les récepteurs de type AMPA (Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) et de type NMDA (Acide N-

methyl-D-aspartique). En raison de leur importance au niveau de la plasticité synaptique, ces récepteurs sont les plus étudiés en neurobiologie.

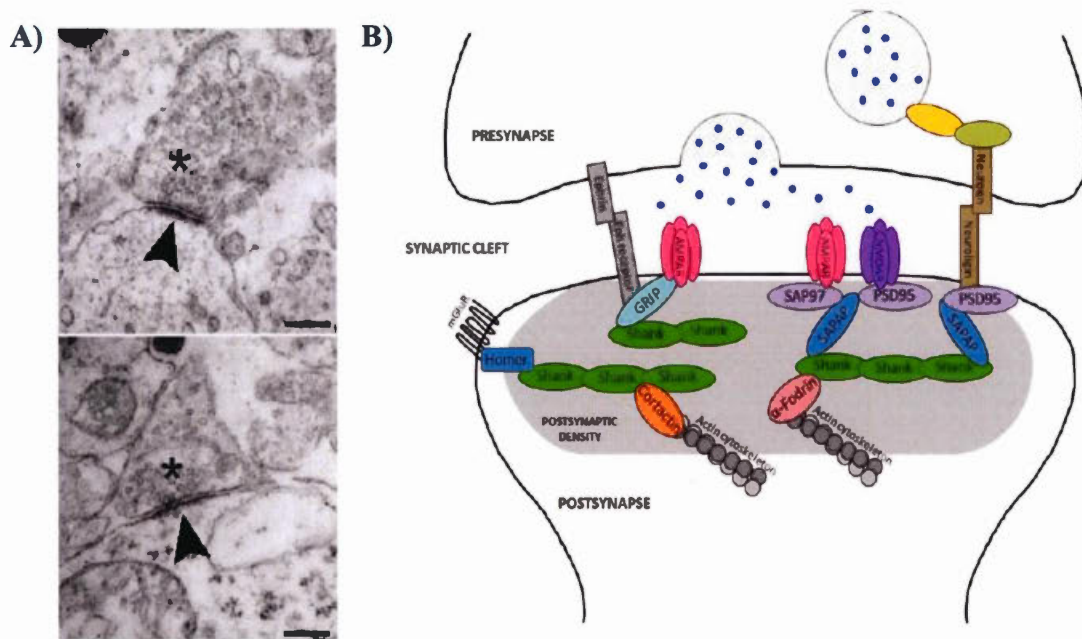


Fig 1. 8 Organisation moléculaire de la densité postsynaptique
 (A) Synaptosomes sous microscope électronique. Le compartiment présynaptique contenant des vésicules est représenté par un astérisque (*) et la densité postsynaptique est identifié par la pointe de flèche. Adapté de Heupel et al., 2008. (B) Représentation simplifiée des principales composantes protéiques de la densité postsynaptique. Adapté de Vyas et Montgomery, 2016.

1.8.2 Plasticité synaptique

Au cours des dernières décennies, plusieurs études se sont intéressées au phénomène de la plasticité synaptique en raison de l'importance dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Le phénomène de la plasticité synaptique se décrit par la capacité du système nerveux à modifier les connexions synaptiques ou la force synaptique. La preuve du mécanisme de plasticité synaptique a été basée sur la potentialisation à long terme (LTP) induite par des stimulations à haute fréquence de la synapse (Bliss et Lomo, 1973). Ces stimulations avaient causé des prolongements de potentiels postsynaptiques excitateurs qui pouvaient durer sur plusieurs heures.

L'induction du mécanisme de LTP est souvent dite dépendant des récepteurs NMDA, car elle est hautement liée à l'activation de ces récepteurs bien que d'autres protéines de la PSD soient impliquées (Bliss et Collingridge, 1993). L'ouverture des récepteurs NMDA repose sur deux phénomènes, d'une part la membrane synaptique est suffisamment dépolarisée pour libérer l'ion Mg^{2+} qui bloque l'entrée des ions Ca^{2+} et d'autre part, la liaison du glutamate au récepteur NMDA. Ces deux phénomènes doivent coïncider pour mener à l'activation du récepteur à la suite d'un influx nerveux. Les ions Ca^{2+} qui entrent par l'ouverture du récepteur canal NMDA activé agissent comme un messager secondaire induisant des voies de signalisation de la LTP au niveau postsynaptique (Luscher et Malenka, 2012). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire active plusieurs protéines particulièrement la kinase II calmoduline-dépendante (CamKII) et la protéine kinase C (PKC) (Malinow et al., 1988; Silva et al., 1992). Ces kinases, importantes dans l'induction de la LTP, favorisent l'expression des gènes et le recrutement de nouveaux récepteurs AMPA à la surface synaptique (Hayashi et al., 2000). Les nouveaux récepteurs AMPA s'insèrent à la membrane plasmique par un processus de fusion de vésicules (Park et al., 2004). L'augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la synapse va permettre l'entrée massive des ions Na^+ qui prolongent la dépolarisation de la membrane postsynaptique. Ainsi, la LTP se traduit par une augmentation des récepteurs AMPA par exocytose. À l'inverse, dans le cas de la dépression à long terme (LTD), des stimulations à faible fréquence induisent l'internalisation des récepteurs AMPA par endocytose (Wang, 2008), ce qui engendre une réduction de leur nombre à la synapse. Les mécanismes de plasticité synaptique apportent des changements morphologiques des épines dendritiques en modifiant et en réorganisant le contenu en protéines telles que les protéines d'échafaudage et du cytosquelette (Sorra et Harris, 2000).

Malgré les différentes altérations de plasticité synaptique, le système nerveux possède des mécanismes d'homéostasie synaptique permettant aux neurones de

maintenir leur activité en normalisant l'ensemble des forces synaptiques. Le principe du mécanisme de l'homéostasie synaptique se base sur des réponses négatives régulant le nombre ou la composition des sous-unités des récepteurs AMPA (Chowdhury et Hell, 2018). Ces mécanismes font appel à plusieurs modifications post-traductionnelles et avec plusieurs protéines interagissant avec les récepteurs AMPA (Traynelis et al., 2010). Les débalancements entre l'excitation et l'inhibition sont souvent associés à des maladies neurologiques.

1.8.3 Récepteurs AMPA

Autre que le glutamate, les récepteurs AMPA (AMPA receptors) sont sélectivement activés par l'agoniste glutamatergique, l'acide propionique γ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole (AMPA). Ces récepteurs sont impliqués dans l'initiation de la réponse synaptique et sont principalement responsables de la transmission synaptique rapide (Attwell et Gibb, 2005; Traynelis et al., 2010). Ces récepteurs transmembranaires généralement perméables aux ions Na^+ et K^+ sont formés de quatre sous-unités homologues (GluA1-4) qui s'assemblent en un tétramère. La plupart du temps, ils sont formés de deux sous-unités GluA1 et de deux GluA2, GluA3 ou GluA4. Les combinaisons majoritaires sont GluA1/A2 et GluA2/A3 (Lu et al., 2009). La composition de l'assemblage de sous-unités donne des propriétés biophysiques et moléculaires distinctes aux AMPARs (Greger et al., 2007). Par exemple, les AMPARs contenant GluA2 contrôlent la perméabilité aux ions Ca^{2+} (Isaac et al., 2007). Les sous-unités des AMPARs possèdent un domaine N-terminal, un domaine C-terminal, trois domaines transmembranaires et un domaine de canal (Fig 1.9). Dans le cas de la sous-unité GluA2, le domaine de canal possède un site d'édition Q/R (glutamine/arginine) qui donne la propriété à GluA2(Q) d'être perméable aux ions Ca^{2+} . Le site de liaison du glutamate est formé par le domaine N-terminal et la boucle extracellulaire (Freudenberg et al., 2015; Henley et Wilkinson, 2013). Ainsi, la fixation de quatre molécules de glutamate au total va activer

l'AMPA pour l'entrée des ions Na^+ et K^+ . Les sous-unités des AMPARs possèdent un domaine C-terminal qui est sujet à plusieurs interactions protéines et à plusieurs modifications post-traductionnelles pour la régulation de leur fonction incluant leur stabilité au niveau de la membrane, leur déplacement et leur activation (Anggono et Huganir, 2012; Henley et Wilkinson, 2013).

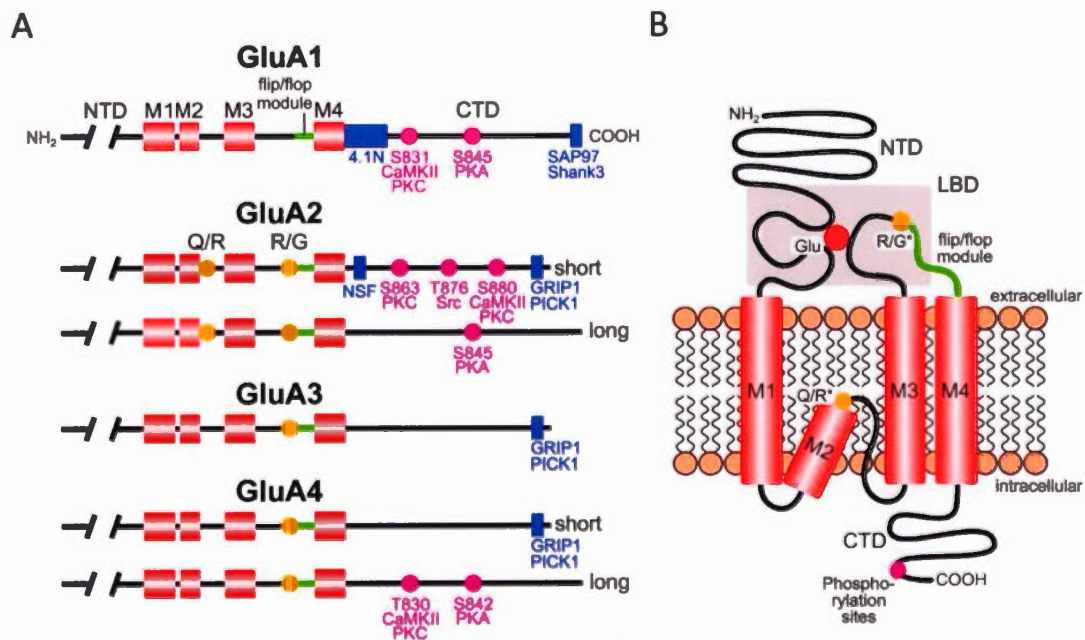


Fig 1. 9 Structure des sous-unités du AMPAR

(A) Les sous-unités du AMPAR (GluA1-4) ont des domaines transmembranaires (M1, M2 et M4), un domaine du canal (M2), un long domaine N-terminal (NTD) et d'un court domaine C-terminal (CTD) ayant plusieurs sites de modification post-traductionnelle et d'interaction avec d'autres protéines. Seul GluA2 possède un site Q/R au niveau du domaine M2 qui détermine leur perméabilité aux ions Ca^{2+} . (B) Topologie membranaire d'une sous-unité du AMPAR montrant le site de liaison du glutamate (Glu) formé par le NTD et la boucle entre les domaines M3 et M4. Adapté de Freudenberg et al., 2015.

1.8.4 Récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA (NMDARs) sont impliqués dans la fonction de la mémoire et dans le contrôle de la plasticité synaptique. Ils sont formés de trois sous-unités (GluN1-3) dont les isoformes sont issues de l'épissage alternatif (Monyer et al., 1992; Sun et al., 1998). Ces sous-unités s'assemblent en un complexe

hétérotétramérique qui permet le transit des ions Ca^{2+} . Il a été bien établi que les NMDARs sont constituées essentiellement de deux GluN1 et de deux GluN2 (Monyer et al., 1992). Des travaux ont montré son rôle important dans les processus de maturation des réseaux. En effet, lors du développement, ces récepteurs sont retrouvés sur les neurites (axone ou dendrite en croissance) pour le guidage axonal et la formation des synapses (Schmitz et al., 2009; Wang et al., 2011). Lorsque ces récepteurs sont activés par des stimulations synaptiques spécifiques, ils induisent la maturation des synapses (Frank et al., 2016). Leur activation permet également le raffinement des connexions synaptiques. En effet, il est connu que l'activation des NMDARs joue un rôle dans la plasticité synaptique en induisant la potentialisation et la dépression à long terme (Morris et al., 1986). Ces inductions apportent des modifications du nombre et du type de récepteurs, ce qui permet le réarrangement des circuits par élimination ou par stabilisation des synapses. Les NMDARs sont donc importants dans la formation du circuit neuronal (Colonnese et Constantine-Paton, 2006).

1.8.5 Les protéines d'échafaudage de la PSD

Les protéines d'échafaudage sont des régulateurs cruciaux dans la signalisation cellulaire. Au niveau de la PSD, elles jouent un rôle majeur et essentiel dans les fonctions synaptiques impliquant le trafic et l'ancrage des récepteurs de glutamate. Parmi elles, les principales protéines retrouvées sont la famille de protéines Shank et le PSD-95 (Okabe, 2007).

La protéine de la PSD de 95 kDa (PSD-95) est la protéine d'échafaudage la plus abondante et principalement localisée à la PSD. En interagissant avec plusieurs protéines comme les protéines d'adhésion et les récepteurs dont les AMPARs et les NMDARs (Beique et Andrade, 2003), la PSD-95 est impliquée dans l'organisation moléculaire du PSD en permettant principalement la stabilisation et la localisation des

AMPARe et des NMDARs à la surface des synapses. La PSD-95 possède donc un rôle essentiel dans la régulation de la force synaptique en contrôlant surtout les AMPARs (Bats et al., 2007).

Les protéines d'échafaudage Shank sont les composantes majeures de la PSD. Elles sont issues de trois gènes, Shank1-3 (Sheng et Kim, 2000). Plusieurs fonctions ont été identifiées pour ces protéines. La plupart des études ont montré que les protéines Shank sont impliquées dans la régulation du trafic des récepteurs du glutamate, du cytosquelette, de la formation des synapses, de la neurotransmission et de la plasticité synaptique (Grabrucker et al., 2011; Jiang et Ehlers, 2013). En effet, les protéines Shank contiennent plusieurs domaines d'interaction qui leur permettent de lier d'autres protéines d'échafaudage et avec le cytosquelette à base d'actine. En formant des complexes protéiques, les protéines Shank sont impliquées dans le recrutement et le regroupement des récepteurs du glutamate à la densité postsynaptique (Sheng et Kim, 2000). Elles ont aussi un rôle dans la régulation de l'activité synaptique en promouvant la maturation et l'élargissement des épines dendritiques (Roussignol et al., 2005). De plus, les membres de la famille Shank régulent la morphologie des épines dendritiques (Sala et al., 2001).

1.8.6 Cytosquelette neuronal

Tout comme les autres cellules eucaryotes, les neurones possèdent un cytosquelette qui consiste de trois polymères dont les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments d'actine. L'actine et la tubuline sont les composantes principales du cytosquelette. Les filaments d'actine sont formés d'une des trois sous-unités : alpha, bêta ou gamma actine. Les microtubules sont formés de plusieurs sous-unités de dimères d'alpha et de bêta tubuline qui donnent une certaine polarité, soit une extrémité terminant par les sous-unités alpha (-) et une extrémité terminant par les sous-unités bêta (+) (Alberts et al., 2008). Chez les cellules neuronales, elles fournissent une architecture permettant de supporter les axones et les dendrites. Mis à

part leurs rôles structuraux, ces protéines du cytosquelette forment des réseaux qui permettent le transport intracellulaire tel que le transport axonal. Comme les axones peuvent s'étendre sur de longues distances, les mécanismes de transport axonal sont nécessaires pour transporter des cargos du corps cellulaire vers les extrémités dendritiques et axonales, et vice-versa (Maday et al., 2014). Les microtubules et les filaments d'actine sont aussi requis dans l'établissement des synapses en développant les axones et les dendrites (Barnes et Polleux, 2009; Kuijpers et Hoogenraad, 2011). Enfin, au niveau de la densité postsynaptique, les filaments d'actine servent d'ancrage pour les AMPARs et les NMDARs (Allison et al., 1998) et sont essentiels pour le transport des AMPARs (Lise et al., 2006), ce qui leur donne une implication dans la plasticité synaptique (Fukazawa et al., 2003).

1.9 Présentation du projet

1.9.1 Contexte du vieillissement chez l'humain

Le vieillissement est un processus complexe et multifactoriel qui se produit à travers tous les organismes à un rythme variable entre chaque individu (Tosato et al., 2007). En effet, le degré ou le rythme du vieillissement d'un individu résulte des facteurs intrinsèques impliquant les processus d'interactions internes tels que le métabolisme, des facteurs extrinsèques associés avec les effets environnementaux et les maladies associées à l'âge (Haigis et Yankner, 2010). Chez l'humain, le vieillissement est souvent défini par un déclin graduel des capacités à répondre aux stress menant à un déséquilibre de l'homéostasie (Rodriguez-Rodero et al., 2011), ce qui affecte les cellules, les tissus et les organes des systèmes. Le vieillissement aboutit donc à des pertes de fonction de la plupart des systèmes physiologiques.

Au niveau du système nerveux, il est connu que l'âge a un impact délétère sur les fonctions cognitives et exécutives permettant d'accomplir des tâches complexes.

En effet, plusieurs modifications ont été détectées au cours du vieillissement cérébral normal chez l'humain à l'aide des techniques d'imagerie. Des études ont montré une réduction neuronale et une diminution du volume du cerveau sans affecter la densité neuronale (Mrak et al., 1997; Raz et al., 2005; Terry et al., 1987). De plus, la diminution de la circulation sanguine dans les lobes frontal et pariétal du cortex a été détectée par tomographie (Dempster, 1992; Loessner et al., 1995). Des études suggèrent également que l'activité de dégradation des neurotransmetteurs est un facteur important qui peut contribuer à la dégénération neuronale au niveau du lobe frontal (Carlsson, 1987; Petkov et al., 1988). À cet effet, il est observé qu'il y avait une baisse de la performance des tâches médiées par le lobe frontal (Kramer et al., 1999). Ces tâches impliquent les fonctions motrices, la résolution des problèmes, le comportement, le langage et la mémoire. Au niveau cellulaire, d'autres études ont montré un déclin progressif dans le SNC causé par une accumulation de dommages lié à l'altération du métabolisme et de l'homéostasie de cellulaire (Mattson et Magnus, 2006).

Avec la technologie qui a progressé considérablement depuis le dernier siècle, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées pour améliorer l'espérance de vie des individus. Cependant, cela a généré un déséquilibre entre les taux de natalité et les taux de mortalité. En conséquence, la proportion de la population âgée (plus de 65 ans) augmente, ce qui conduit à un plus grand taux prévisible de maladies associées au vieillissement. Aujourd'hui, les traitements permettent de soulager les symptômes, mais aucun traitement ne permet de guérir. Les coûts de morbidité associée au vieillissement augmentent chaque année et imposent un défi majeur aux systèmes de santé et de service social. En somme, le vieillissement mondial soulève des problématiques humaines, sociales et économiques.

1.9.2 Objectifs du projet

Au cours des dernières années, la majorité des études se concentrent sur les pathologies du vieillissement, mais peu ont été réalisées sur le vieillissement normal. Ainsi, la frontière entre le vieillissement normal et pathologique n'est pas complètement claire sur le plan clinique et biochimique. Pour avoir une meilleure compréhension des principaux facteurs de risque de développer des pathologies liées à la vieillesse, il est nécessaire de comprendre et d'établir des biomarqueurs précoces durant le vieillissement normal à partir d'un point de vue moléculaire. En s'intéressant à l'aspect cellulaire et moléculaire au niveau des synapses, l'objectif du projet est de déterminer l'effet du vieillissement normal sur l'expression des protéines impliquées dans la neurotransmission. Les résultats permettront d'éclaircir des déterminants moléculaires à la base de l'activité neuronale chez un sujet âgé sain. De plus, cette étude vise aussi à utiliser une méthode moderne et quantitative appliquée au contexte du vieillissement neuronal.

1.9.3 Problématique de l'immunobuvardage quantitatif

Pour répondre à l'objectif de l'étude, l'abondance des protéines neuronales au cours du vieillissement sera évaluée par la méthode d'immunobuvardage de type Western. Cette méthode, couramment utilisée dans les laboratoires de biochimie, consiste à séparer des échantillons protéiques par électrophorèse, puis transférer sur un support solide, soit une membrane PVDF (polyvinylidene fluoride) ou une membrane de nitrocellulose. La présence, l'absence et le niveau d'expression d'une protéine d'intérêt est ensuite révélé par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Cependant, au cours des dernières décennies, des études ont tenté de quantifier les niveaux d'expression avec des méthodes qui n'étaient pas encore mis au point pour la quantification. La négligence des critères tels que le domaine de linéarité, la qualité du transfert, la révélation et la méthode de normalisation fait en sorte que la quantification densitométrique des résultats d'immunobuvardage n'est pas optimale.

Une étude a estimé plus de 25% des figures dans les publications scientifiques sont analysées de façon inadéquate et que la majorité d'entre elles est associée à des résultats d'immunobuvardage (Editorial, 2006). Ces résultats ne sont parfois pas reproductibles non plus dû aux manques de considération des critères importants lors des étapes d'immunobuvardage.

1.9.4 Choix du modèle

Les souris mâles C57BL/6 ont été choisies comme modèle animal. Cette lignée a été élevée pour la première fois en 1948 par le fondateur du Jackson Laboratory (Bryant, 2011). Les souris C57BL/6 ont leur génome séquencé au complet (Waterston et al., 2002). Depuis, la lignée C57BL/6 est couramment utilisée comme modèle physiologique et pathologique dans les laboratoires de recherche pour les expériences *in vivo* (Bryant, 2011). Elles ont été choisies comme modèle pour les études du vieillissement humain et de diverses maladies en raison de leur grande disponibilité, de leur durée de vie et de leur similarité aux humains. En ayant peu de phénotypes indésirables, plusieurs études neurologiques ont été faites sur ces souris (Justice et Dhillon, 2016). Dans le cas de la présente étude, seuls les mâles ont été utilisés en raison de leur stabilité hormonale. Comme les hormones peuvent réguler l'expression des gènes, la stabilité hormonale est une caractéristique importante afin de tenir compte que l'effet du vieillissement sur l'expression des protéines.

CHAPITRE II

MÉTHODES

2.1 Animaux et prélèvement du cerveau

L'utilisation des souris a été approuvée par le Comité institutionnel de protection des animaux de l'Université du Québec à Montréal. Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles C57BL/6J âgées de 7 mois (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, États-Unis) et âgées de 22 mois (Réseau québécois de recherche sur le vieillissement (RQRV)). Arrivées à l'animalerie où elles ont été hébergées pour plus de 3 mois, les souris ont été hébergées selon un cycle de clarté/noirceur de 12h. Les souris avaient libre accès à l'eau et étaient nourries ad libitum. Le profil cognitif des souris n'ont pas été évalué avant l'expérience. Pour le prélèvement du cerveau, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane puis sacrifiées par décapitation. Le cerveau a été rapidement extrait à température pièce. Le cortex a été placé sur glace sèche puis conservé à -80°C pour utilisation ultérieure.

2.2 Isolation de la densité postsynaptique du cortex de souris

Lors de l'isolation de la densité postsynaptique du cortex, les opérations ont toutes été exécutées à 4°C pour minimiser la protéolyse. Tous les tampons utilisés contenaient un inhibiteur de protéase (ROCHE, cat. # 11836153001) et un mélange d'inhibiteur de phosphatase 1X (Biotool, cat. #B15001). À l'aide d'un broyeur de

tissus en verre, les cortex de souris ont été homogénéisés dans 10 mL de tampon d'homogénéisation (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 320 mM sucrose, pH 7.5) par gramme de tissu. L'homogénat a été centrifugé à 800 x g pendant 10 min pour enlever les débris. Le surnageant obtenu (fraction PNS) a été ensuite centrifugé à 9200 x g pendant 15 min pour obtenir un culot contenant les synaptosomes. Après avoir jeté le surnageant, le culot a été resuspendu dans 300 µL de tampon hypotonique (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 35.6 mM sucrose, pH 7.5) et laissé sur glace pendant 15 min. Cette suspension a été centrifugée à 30000 x g pendant 20 min pour obtenir le surnageant SV contenant majoritairement les vésicules synaptiques et le culot SPM contenant les membranes synaptosomales. Le culot SPM a été resuspendu dans 300 µL de tampon hypotonique supplémenté avec 1% de Triton X-100 puis incubé pendant 15 min sur un agitateur rotatif. Suite à l'incubation, le mélange a été centrifugé à 150 000 x g pendant 20 min pour obtenir un surnageant correspondant aux membranes synaptiques solubles dans le Triton X-100 (TxPSD) et un culot contenant le PSD. Le PSD a été resuspendu dans le tampon hypotonique. La concentration de protéines de chaque fraction a été mesurée à l'aide de la méthode de BCA (Thermo Scientific). Les aliquotes de chaque fraction ont été conservées à -80°C pour utilisation future.

2.3 Immunobuvardage de type Western

Les protéines ont été séparées sur des mini gels TGX *stain-free* de 7.5% (Bio-Rad). Après l'électrophorèse, le gel a été ensuite exposé à l'UV pendant 1 min à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc MP (Bio-Rad) pour activer le *stain-free* permettant de visualiser la séparation des protéines selon leur poids moléculaire. En utilisant un appareil de transfert Trans-Blot Turbo (Bio-Rad), les protéines séparées sur le gel ont été transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence préalablement activée dans de l'éthanol 99% pendant 5 min. Le transfert a été

effectué à 25V et 2.5A pendant 10 min à l'aide du système TransBlot Turbo (Bio-Rad). À la suite du transfert, la membrane a été incubée dans du TBS-T pendant 5 min puis exposée à l'UV avec le ChemiDoc MP pour visualiser le *stain-free* permettant d'évaluer l'efficacité du transfert. L'image de la membrane exposée est utilisée plus tard pour la normalisation. Par la suite, une étape de blocage a été effectuée en incubant la membrane dans un tampon TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,15 % Tween 20, pH 7.5) contenant 5% (m/v) de lait écrémé en poudre pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Suite au blocage, les membranes ont subi trois lavages consécutifs de 5 min avec du tampon TBS-T puis incubées avec l'anticorps primaire spécifique à la protéine d'intérêt pendant 1 h à température ambiante. Après trois lavages successifs de 5 min avec le tampon TBS-T, la membrane a été incubée pendant 1 h à température ambiante dans l'anticorps secondaire couplé à horseradish peroxydase (HRP). Finalement, la révélation des protéines a été faite par chimiluminescence à l'aide du réactif Enhanced ChemiLuminescence (ECL) Clarity (Bio-Rad) puis le signal a été détecté avec le ChemiDoc MP (Bio-Rad). Le temps d'acquisition a été déterminé automatiquement par le logiciel ImageLab 5.2 (Bio-Rad) afin d'avoir un signal chimiluminescent optimal avant l'atteint de la saturation du signal. Les anticorps utilisés sont mentionnés dans le tableau 1.

2.4 Analyse quantitative et statistique

Pour les analyses d'expression de protéines entre les souris âgées de 7 et de 22 mois, la quantification de l'intensité des bandes a été réalisée à l'aide du logiciel ImageLab 5.2. Les bandes ont été normalisées par rapport aux protéines totales en divisant l'intensité chimiluminescente par l'intensité *stain-free* sur la même membrane (Fig 2.1). L'intensité du bruit de fond a été soustraite en appliquant le *rolling disk* d'ImageLab (Fig 2.2). Les analyses statistiques ont été faites à l'aide du

logiciel GraphPad Prism 7. Les données ont été soumises à une analyse de variance à 1 facteur (one-way ANOVA) ajusté avec un post test de Dunnett (intervalle de confiance 95%). Ce test statistique a été choisi pour déterminer les différences significatives entre la moyenne du groupe contrôle (souris de 7 mois) et la moyenne groupe expérimental (souris de 22 mois). Le seuil de signification statistique a été fixé à partir de $p < 0.05$.

Tableau 1. Liste d'anticorps utilisés pour l'immunobuvardage

Anticorps	Clone	Espèce	Dilution	Référence produit	Fournisseur
GluA1	D4N9V	Lapin	1 :1000	#13185	Cell Signaling
GluA2	D39F2	Lapin	1 :1000	#5306	Cell Signaling
GluA3	D47E3	Lapin	1 :1000	#4676	Cell Signaling
GluA4	D41A11	Lapin	1 :1000	#8070	Cell Signaling
GluN1	D65B7	Lapin	1 :1000	#5704	Cell Signaling
GluN2A	-	Lapin	1 :1000	#4205	Cell Signaling
GluN2B	N69/20	Souris	1 :1000	#75-097	NeuroMab
PSD-95	D27E11	Lapin	1 :1000	#3450	Cell Signaling
(pan) Shank	N23B/49	Souris	1 :1000	MABN24	Millipore
Béta-actine	BA3R	Souris	1 :10000	G043	AbM
Alpha-tubuline	DM1A	Souris	1 :50000	G094	Sigma
Synaptophysine	D35E4	Souris	1 :1000	#5461	Cell Signaling
EEA1	C45B10	Lapin	1 :1000	#3288	Cell Signaling
Anti-IgG souris	-	Cheval	1 :10000	#7076	Cell Signaling
Anti-IgG lapin	-	Chèvre	1 :10000	#7074	Cell Signaling

La dilution des anticorps a été effectuée dans du tampon TBS-T.

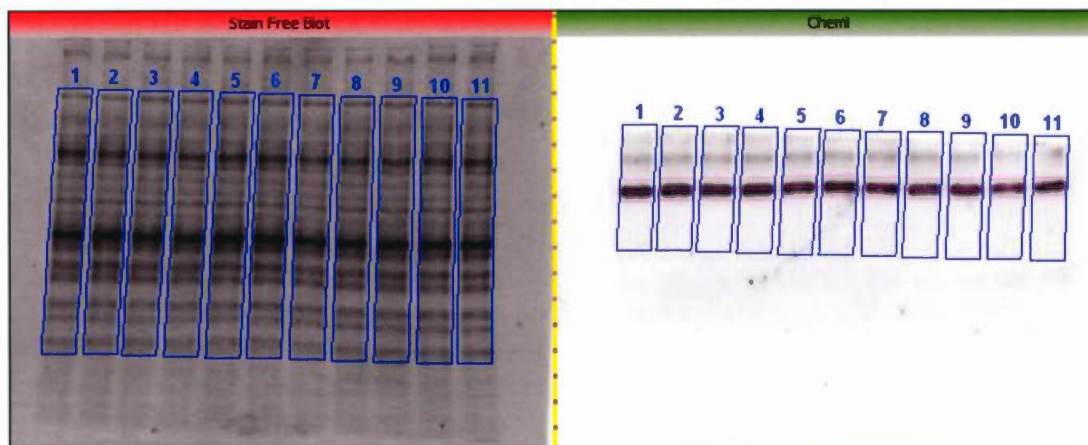


Fig 2.1 Quantification et normalisation des bandes sur ImageLab

Image à multicanal sur logiciel ImageLab (A) Image de la membrane *stain-free* obtenue suite à l'exposition aux UV à l'aide du ChemiDoc MP. L'intensité totale des protéines a été mesurée à l'intérieur des rectangles bleus pour chaque piste. (B) Image de la membrane révélée avec le réactif ECL Clarity. L'intensité des bandes chimiluminescentes a été mesurée à l'intérieur des rectangles pointillés en rose.

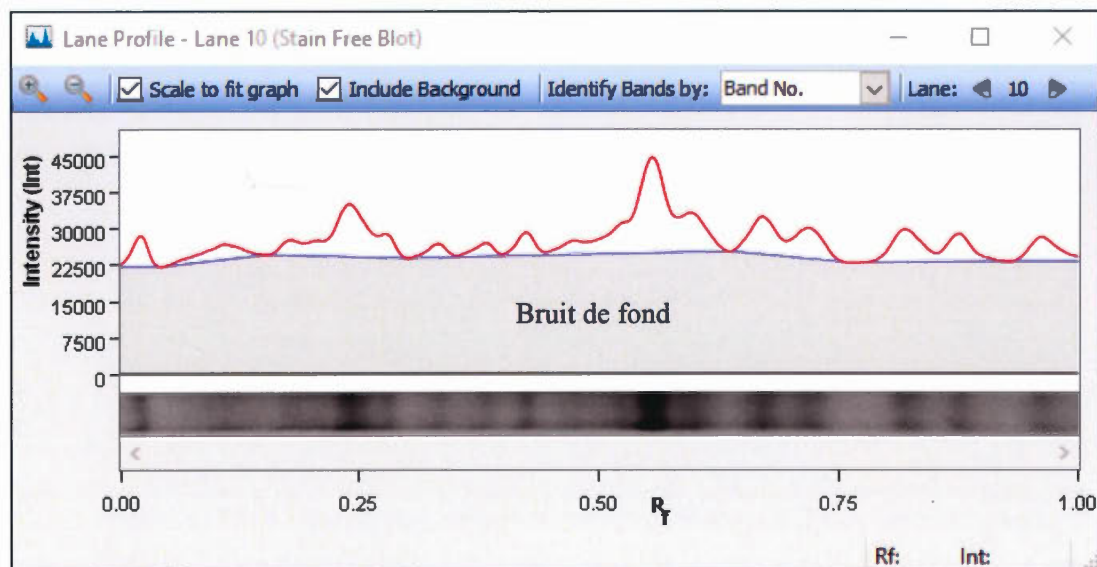


Fig 2. 2 Exemple de soustraction du bruit de fond

La soustraction de l'intensité du bruit de fond a été réalisée en appliquant la fonction *rolling disk* sur ImageLab.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Fractionnement subcellulaire du cortex de souris

Sachant que les neurones possèdent plusieurs compartiments spécifiques à leur fonction, il a été nécessaire de procéder à un fractionnement subcellulaire afin de déterminer les compartiments affectés par le vieillissement. En effectuant la procédure du fractionnement présentée à la Fig 3.1A, les résultats présentés à la Fig 3.4B démontrent la qualité de la méthode du fractionnement. En utilisant la centrifugation différentielle pour isoler la PSD à partir de l'homogénat de cortex clarifié (PNS), les sous-unités du AMPAR (GluA1-4) et du NMDAR (GluN1 et GluN2A/B) et les protéines d'échafaudages (PSD-95 et Shank) se sont retrouvées enrichies dans la fraction PSD. Aucune expression des protéines mentionnées n'a été mesurée dans les fractions des vésicules synaptiques (SV) et une faible expression de GluA1-4 et de PSD-95 a été détectée au niveau des membranes solubles au Triton (SSM). La méthode d'isolation de la PSD a également été évaluée par l'absence des protéines de vésicule (EEA1 et synaptophysine) dans la fraction PSD. Aucun signal de chimiluminescence n'a été détecté au niveau de la PSD, ce qui a montré la qualité du fractionnement de la PSD isolée. Ces résultats montrent aussi que le vieillissement n'influence pas significativement la physio-chimie du fractionnement subcellulaire.

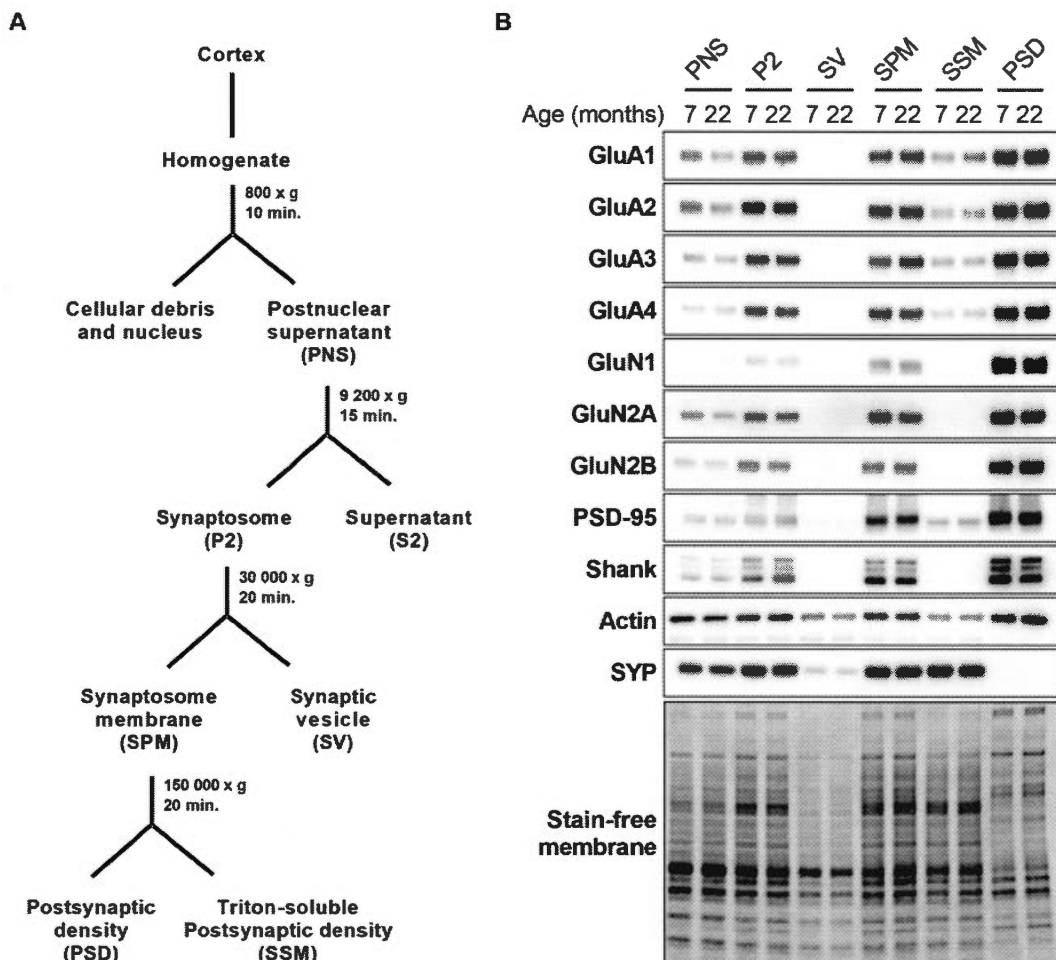


Fig 3. 1 L'âge n'affecte pas le fractionnement subcellulaire du cortex de souris

(A) Représentation des étapes du fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle. (B) 5 μ g d'échantillon de chaque fraction isolée (PNS, surnageant postnucléaire; P2, synaptosome; SV, vésicules synaptiques; SPM, membrane synaptosomales, Tx-PSD, membrane synaptosomale soluble; PSD, densité postsynaptique) ont été séparée sur gel TGX *stain-free*, puis transférée sur une membrane PVDF à faible fluorescence. L'immunobuvardage a été ensuite effectué en utilisant des anticorps spécifiques contre la protéine d'intérêt, puis les bandes ont été révélées par chimiluminescence à l'aide du ChemiDoc MP.

3.2 Domaine de quantification des protéines par immunobuvardage

Afin d'effectuer des analyses quantitatives du niveau des protéines, il est nécessaire de définir les intervalles où les signaux d'intensité de chimiluminescence sont proportionnelles à la quantité de protéines retrouvées sur la membrane. Dans le but de déterminer la quantité de protéines nécessaires à charger sur gel, des dilutions en série allant de 60 à 1 μg de protéines totales ont été effectuées à partir de la fraction PNS (surnagent post-nucléaire) du cortex de souris. L'intensité des signaux obtenus sur la membrane a été normalisée et représentée en pourcentage par rapport à 60 μg de protéines totales. Le signal fluorescent du *stain-free* montre une tendance linéaire tout au long des quantités de protéines testées (Fig 3.2), ce qui indique que le signal de la membrane peut servir de référence pour la normalisation par sa gamme de linéarité. Comme la chimiluminescence est utilisée pour évaluer l'abondance des protéines d'intérêt, le domaine de linéarité a été également déterminé pour chaque anticorps primaire employé pour l'étude en utilisant les mêmes fractions diluées en série. Selon les résultats d'immunobuvardage pour les anticorps testés pour les sous-unités du AMPAR et de NMDAR (Fig 3.2A), le domaine dynamique de linéarité du signal chimiluminescent s'étend jusqu'à environ 15 μg de protéines totales de la fraction PNS pour les anticorps testés. De plus, il a été possible d'observer un début de saturation du signal dépendamment de l'anticorps utilisé pour des quantités supérieures à 15 μg dans la fraction PNS. D'autres anticorps dirigés contre d'autres protéines impliquées dans la neurotransmission synaptique ont été testés et les résultats ont montré le même comportement de signal chimiluminescent (Fig 3.3). Afin d'assurer que la linéarité du signal chimiluminescent est maintenue, quelques anticorps ont été testés dans les autres fractions isolées en effectuant des dilutions en série à partir de 10 μg de protéines totales pour les fractions P2, SPM et SV. Pour les fractions PSD et SSM, les dilutions ont débuté à partir de 5 μg de protéines totales en raison de la petite quantité d'échantillons obtenue. Selon les résultats obtenus pour les

fractions P2 et SPM (Fig 3.5), GluA1, GluA3, l'actine, et la tubuline ont atteint un début de saturation du signal chimiluminescent à partir de 5 μg de protéines totales pour les différentes fractions testées, alors que l'EEA1, la synaptophysine la GluA2 et la GluA4 ont maintenu leur linéarité du signal jusqu'à 10 μg de protéines dans la majorité des fractions. Dans les fractions PSD et SSM, les intensités du signal chimiluminescent ont resté linéaire jusqu'à 5 μg de protéines. Par illustration du domaine de linéarité au moyen d'un graphique (Fig 3.6), les résultats démontrent que la linéarité peut différer entre les différentes fractions isolées. En somme, les résultats montrent que moins de 2.5 μg de protéines est suffisant pour se situer dans le domaine linéaire de signal chimiluminescent tout en étant aussi dans la portion linéaire du signal *stain-free* pour la normalisation.

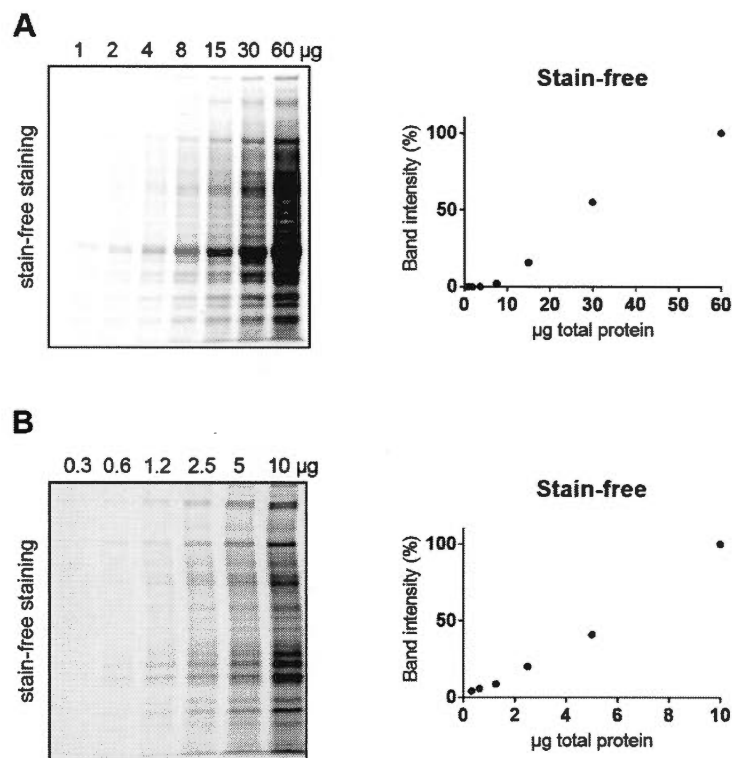


Fig 3. 2 Domaine linéaire du signal stain-free sur membrane PVDF

Différentes quantités de protéines provenant des dilutions en série de la fraction PNS (A) 60 à 1 μg et (B) 10 à 0.3 μg ont été chargées et séparées sur gel TGX *stain-free*, puis transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence. Le signal *stain-free* des protéines sur la membrane a été mesuré à l'aide de l'appareil d'imagerie ChemiDoc MP. En exprimant l'intensité du signal *stain-free* en pourcentage par rapport au puits ayant servi pour la plus grande quantité de protéines totales, la linéarité est maintenue tout au long des quantités de protéines testées.

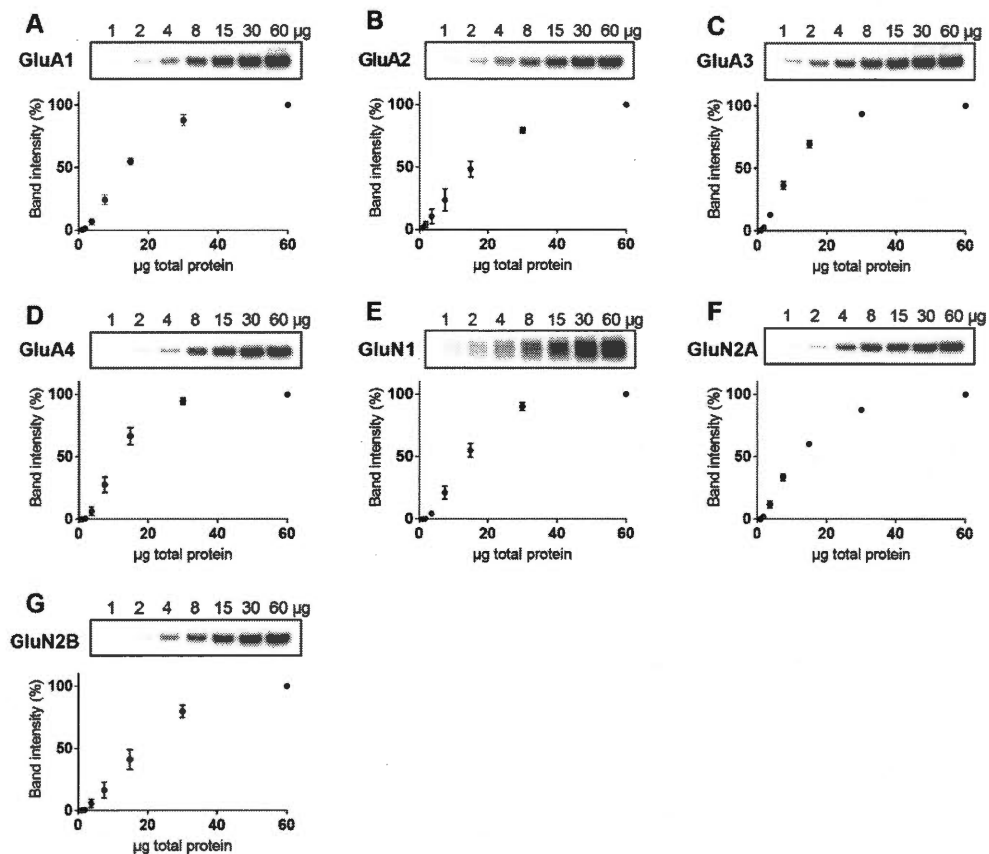


Fig 3. 3 Domaine de linéarité du signal chimiluminescent pour la quantification des sous-unités des récepteurs de glutamate

Différentes quantités de protéines provenant des dilutions en série de la fraction PNS ont été chargées et séparées sur un gel TGX *stain-free*, puis transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence. La membrane a été incubée avec des anticorps spécifiques dirigés contre les sous-unités du AMPAR (A-D) et du NMDAR (E-G), suivi d'un anticorps secondaire couplé avec une enzyme HRP. Les bandes ont été détectées par chimiluminescence et les intensités ont été normalisées en pourcentage par rapport à 60 µg de protéines. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, n=4 souris.

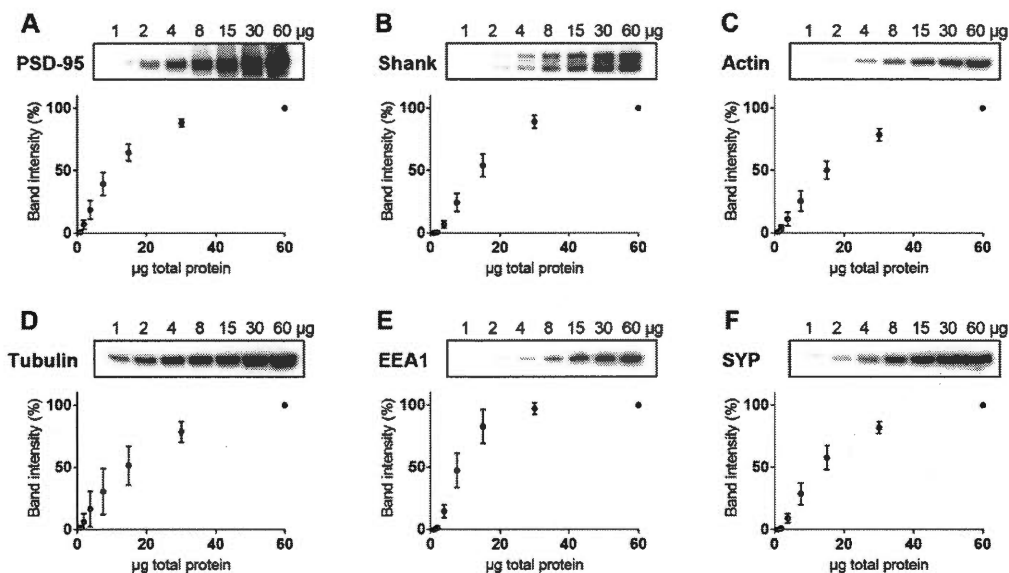


Fig 3. 4 Domaine de linéarité du signal chimiluminescent pour la quantification des protéines d'échafaudage, du cytosquelette et de vésicules.

Différentes quantités de protéines provenant des dilutions en série de la fraction PNS ont été chargées et séparées sur un gel TGX *stain-free*, puis transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence. La membrane a été incubée avec des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines d'échafaudage (A,B), du cytosquelette (C,D) et de vésicules (E,F), suivi d'un anticorps secondaire couplé avec une enzyme HRP. Les bandes ont été détectées par chimiluminescence à l'aide du ChemiDoc MP et les intensités ont été normalisées en pourcentage par rapport à 60 µg de protéines. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, n=4 souris.

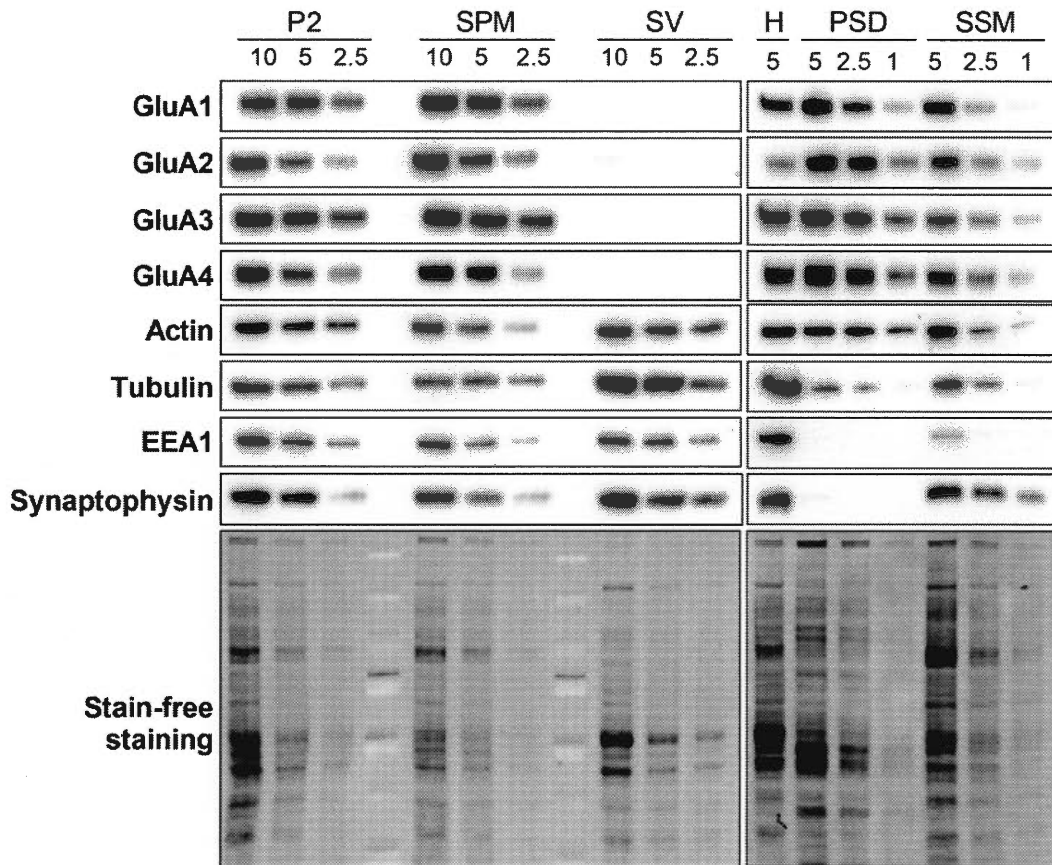


Fig 3. 5 Immunobuvardage avec les anticorps sur différentes dilutions des fractions isolées
 Différentes quantités de protéines provenant des dilutions en série des fractions isolées ont été chargées et séparées sur un gel TGX *stain-free*, puis transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence. La membrane a été incubée avec des anticorps spécifiques dirigés contre les sous-unités des AMPARs (GluA1-4), les protéines du cytosquelette (actine et tubuline) et les protéines de vésicules (EEA1 et Synaptophysine). Suite à l'incubation d'un anticorps secondaire couplé avec une enzyme HRP, les bandes ont été détectées par chimiluminescence à l'aide du ChemiDoc MP.

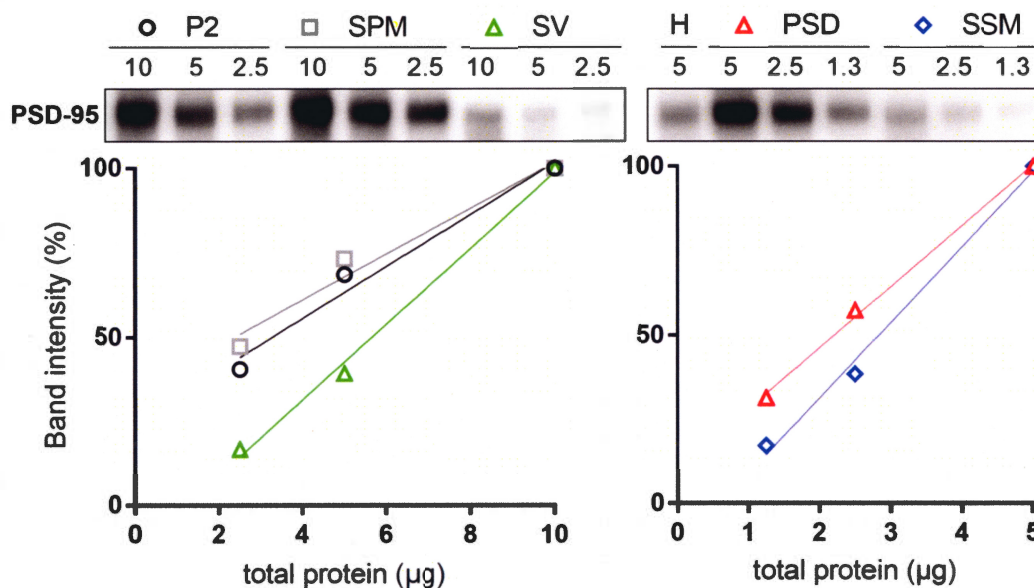


Fig 3. 6 Linéarité du signal chimiluminescent dans les différentes fractions isolées

À partir des fractions isolées, différentes quantités de protéines ont été chargées et séparées sur gel TGX *stain-free*, puis transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence. La membrane a été incubée en présence d'un anticorps spécifique dirigé contre PSD-95, puis incubée avec un anticorps secondaire couplé avec une enzyme HRP. Les bandes ont été détectées par chimiluminescence à l'aide du ChemiDoc MP. Les intensités exprimées en pourcentage ont été normalisées par rapport à la plus grande quantité de protéines testées dans chaque fraction correspondante. Le coefficient de corrélation (r^2) des droites obtenues pour les fractions P2, SPM, SV PSD et SSM sont respectivement 0.9675, 0.9755, 0.9953, 0.9975 et 0.9931.

3.3 Expression des sous-unités des AMPARs

Considérant le rôle important des AMPARs dans la plasticité synaptique, le niveau des sous-unités GluA1-4 a été analysé dans différents compartiments cellulaires. Par l'approche d'immunobuvardage quantitative, l'abondance des sous-unités du AMPAR dans la fraction P2 (Fig 3.7A) n'a pas varié chez les deux groupes de souris. Au niveau des membranes synaptosomales (Fig 3.7B), une tendance à la baisse non-significative est démontrée chez les souris de 22 mois par rapport aux souris de 7 mois pour l'expression de GluA1 (0.82 ± 0.083 et 1.00 ± 0.086 , respectivement) et GluA2 (0.84 ± 0.07 et 1.00 ± 0.05 , respectivement), alors que l'expression de GluA3 et 4 demeurent inchangée. En ce qui concerne la fraction PSD (Fig 3.7C), une tendance à la hausse non significative a été mesurée chez les souris de 22 mois par rapport aux souris de 7 mois pour l'expression de GluA2 (1.22 ± 0.05 et 1.00 ± 0.15 , respectivement). Aucune variation significative d'expression des sous-unités GluA1, 3 et 4 n'a été mesurée. Le vieillissement n'aurait donc pas d'effet sur l'expression des sous-unités du AMPAR.

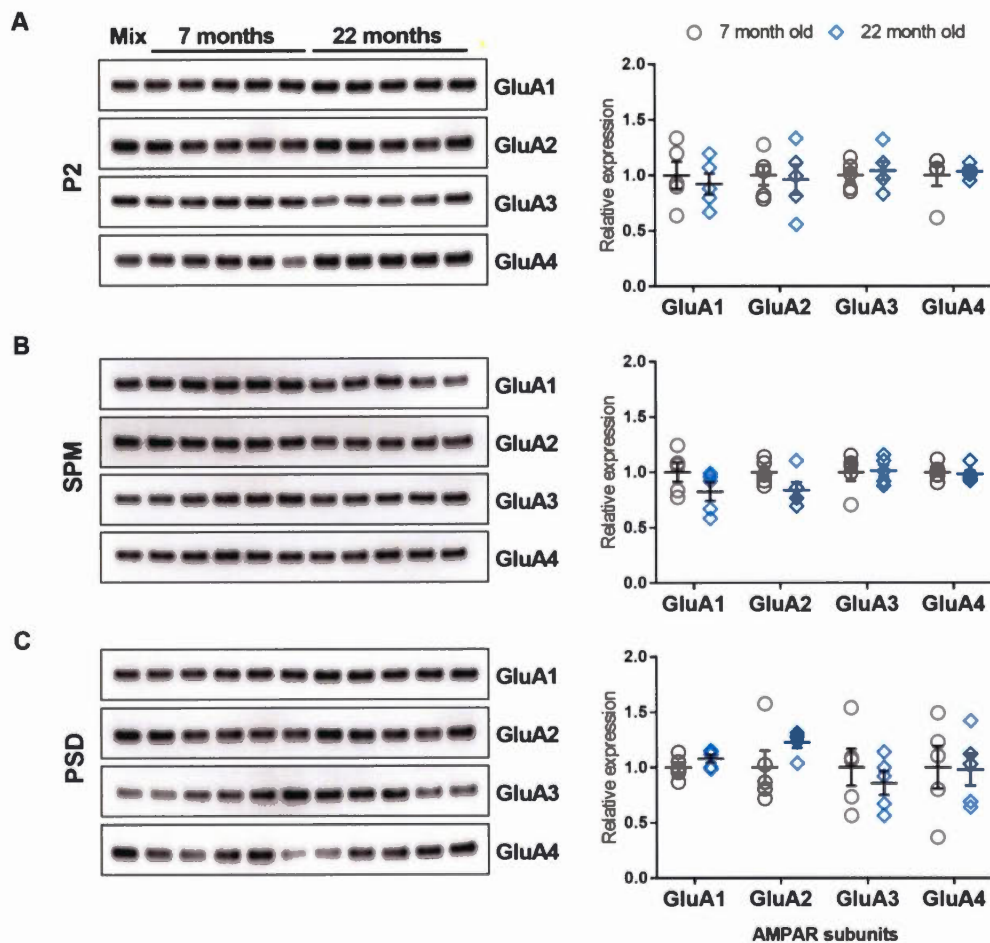


Fig 3. 7 Expression des sous-unités des AMPARs chez les souris matures et âgées (A-C) À partir de chaque fraction isolée provenant des souris âgées de 7 et de 22 mois, 2.5 μ g de protéines ont été séparées sur gel TGX *stain-free*, puis transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence. La membrane a été ensuite incubée avec un anticorps spécifique à une sous-unité du AMPAR et les bandes ont été révélées par chimiluminescence à l'aide du ChemiDoc MP. Les bandes ont été quantifiées (panneau à droite) où chaque point représente l'intensité d'une bande. Les données d'intensité sont exprimées en moyenne \pm SEM par rapport au groupe de souris âgées de 7 mois. P2, synaptosome; SPM, membrane synaptosomale; PSD, densité postsynaptique.

3.4 Expression des sous-unités des NMDARs

Les NMDARs sont connus pour leur rôle dans la régulation de la plasticité synaptique ainsi que pour leur perte de fonctionnalité dans la majorité des maladies neuronales associées au vieillissement. Pour tenter d'élucider ces altérations reliées à l'âge, l'expression des sous-unités du NMDAR a été évaluée. D'après les résultats d'immunobuvardage obtenus pour la fraction P2 (Fig 3.8A), le profil d'abondance des sous-unités GluN1 et GluN2A n'a pas varié entre les souris matures et âgées. Cependant, une diminution de 30% de l'expression de la sous-unité GluN2B a été mesurée chez les souris âgées de 22 mois en comparant à ceux de 7 mois (0.70 ± 0.06 et 1.00 ± 0.02 , respectivement). Au niveau des membranes synaptosomales (SPM) (Fig 3.8B), le niveau de GluN1 est réduite de 14% chez les souris âgées comparativement aux souris matures (0.86 ± 0.04 et 1.00 ± 0.05 , respectivement), alors que le niveau des sous-unités GluN2A et B sont demeurés constants dans cette même fraction. La tendance de cette diminution de l'expression GluN1 est également observée dans la fraction PSD (Fig 3.8C), mais la différence observée n'est pas significative. De plus, aucune variation n'a été mesurée pour GluN2A et B dans le PSD entre les souris matures et âgées. Ainsi, les résultats suggèrent que le niveau de GluN2B chez la souris serait diminué globalement au cours du vieillissement, mais les NMDARs contenant GluN2B resteraient stables à la surface de la membrane.

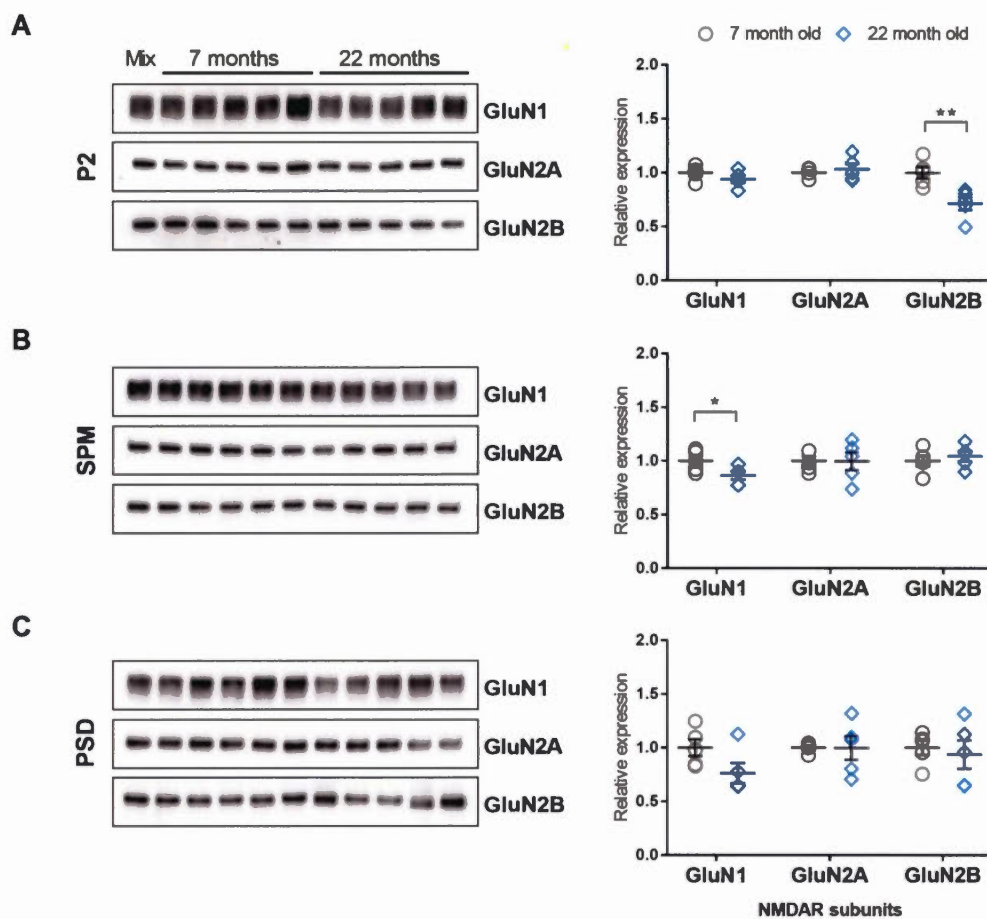


Fig 3. 8 Expression des sous-unités des NMDARs chez les souris matures et âgées

(A-C) À partir de chaque fraction isolée provenant des souris âgées de 7 et de 22 mois, 2.5 μ g de protéines ont été séparées sur gel TGX *stain-free*, puis transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence. La membrane a été ensuite incubée avec un anticorps spécifique à une sous-unité du NMDAR et les bandes ont été révélées par chimiluminescence à l'aide du ChemiDoc MP. Les bandes ont été quantifiées (panneau à droite) où chaque point représente l'intensité d'une bande. Les données d'intensité sont exprimées en moyenne \pm SEM par rapport au groupe de souris âgées de 7 mois. Pour les différences significatives par rapport aux souris de 7 mois, $p < 0.05$ (*). P2, synaptosome; SPM, membrane synaptosomale; PSD, densité postsynaptique.

3.7 Expression des protéines d'échafaudage

Il est connu que l'expression et la localisation synaptique des AMPARs et NMDARs est régulée par les protéines d'échafaudage ayant un rôle principal dans l'organisation de la PSD. Puisque le vieillissement normal ne semble pas affecter les récepteurs glutamatergiques à la surface membranaire, l'abondance des protéines d'échafaudage impliquées dans la neurotransmission a été évaluée. De plus, les protéines Shank possèdent aussi un rôle dans la maturation et dans la morphologie des épines dendritiques. Étant très enrichis au niveau des membranes postsynaptiques, le niveau de PSD-95 et la famille de protéines Shank a été analysée dans les fractions P2, SPM et PSD. Selon les résultats obtenus (Fig 3.9), aucune variation d'abondance de la protéine PSD-95 a été observée dans les trois compartiments analysés. En ce qui concerne de l'abondance des protéines Shank, le niveau n'a pas varié dans la fraction synaptosomale (Fig 3.9A). Toutefois, les souris âgées de 22 mois présentent une baisse significative de 27% de Shank pour l'expression des protéines dans la fraction SPM (0.73 ± 0.05 et 1 ± 0.11) et une hausse d'expression de 31% dans la fraction PSD (1.31 ± 0.10 et 1 ± 0.07) par rapport aux souris de 7 mois (Fig 3.9B-C). Ces résultats suggèrent que l'augmentation des protéines Shank au niveau du PSD pourrait être un phénomène compensatoire pour le maintien de l'expression synaptique des récepteurs de glutamate et que la diminution d'expression de Shank serait liée à un changement de la morphologie ou du nombre d'épines dendritiques.

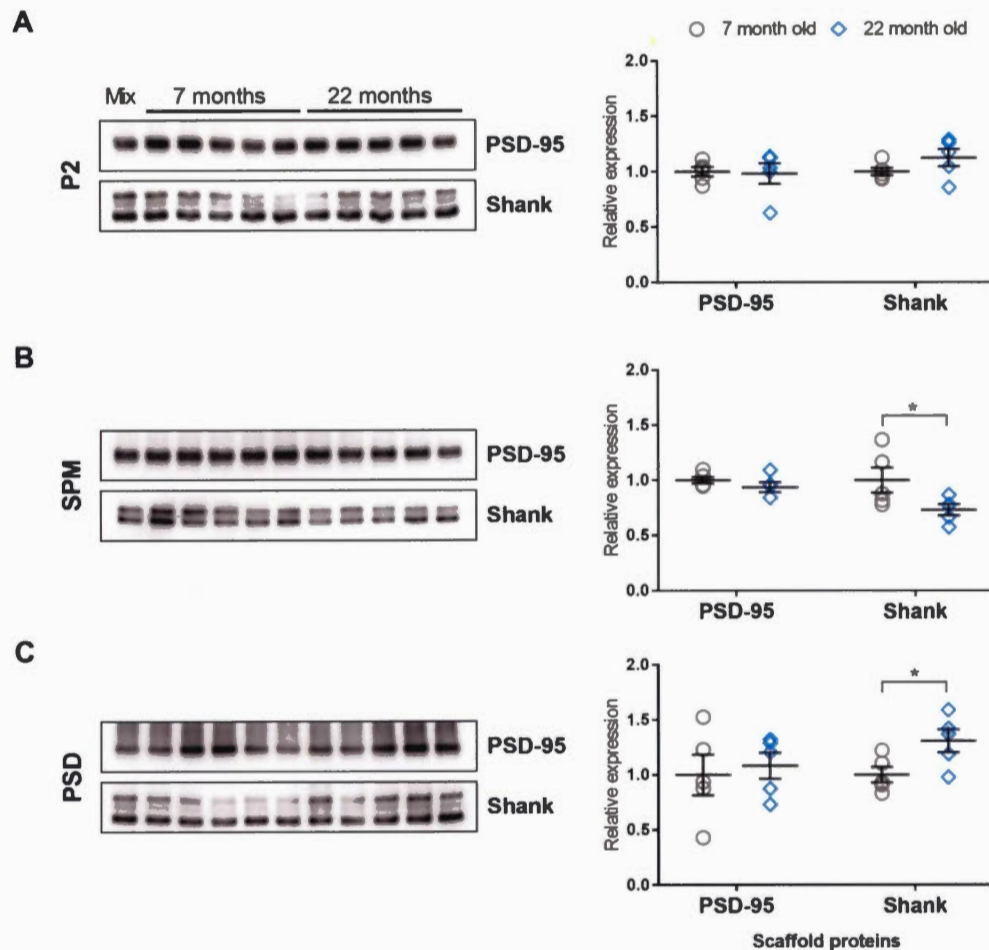


Fig 3. 9 Expression des protéines d'échafaudage au cours du vieillissement des neurones corticaux chez la souris

(A-C) À partir de chaque fraction isolée provenant des souris âgées de 7 et de 22 mois, 2.5 µg de protéines ont été séparées sur gel TGX *stain-free*, puis transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence. La membrane a été ensuite incubée avec un anticorps spécifique à PSD-95 et les protéines Shank. Les bandes ont été révélées par chimiluminescence à l'aide du ChemiDoc MP et ont été quantifiées (panneau à droite) où chaque point représente l'intensité d'une bande. Les données d'intensité sont exprimées en moyenne ± SEM par rapport au groupe de souris âgées de 7 mois. Pour les différences significatives par rapport aux souris de 7 mois, $p < 0.05$ (*). P2, synaptosome; SPM, membrane synaptosomale; PSD, densité postsynaptique.

3.8 Expression des protéines cytosquelettiques

La majorité de l'excitation synaptique se produit au niveau des épines dendritiques supportées par les protéines du cytosquelette. Outre leur rôle de support structural, les protéines du cytosquelette peuvent contrôler la force de la transmission synaptique en participant dans le recyclage des récepteurs du glutamate (Hanley, 2014). Des études ont établi qu'il y a une perte de ramification des dendrites chez l'humain au cours du vieillissement dans les conditions non pathologiques (de Brabander et al. 1998, Nakamura et al. 1985, Scheibel et al. 1975), et il est de même chez les souris (Shimada et al. 2006). Afin de voir le lien avec les résultats d'expression de Shank, la relation entre le vieillissement et l'expression de la β -actine et de la tubuline a été évaluée. Selon les analyses d'immunobuvardage dans la fraction P2 (Fig 3.10A), le niveau de β -actine et de la tubuline n'a pas diminué significativement chez les souris âgées par rapport aux souris de 7 mois. Dans la fraction SPM (Fig 3.10B), le niveau de la β -actine est réduit chez les souris âgées de 22 mois (0.84 ± 0.03 , expression relative par rapport aux souris de 7 mois) et le niveau de la tubuline est augmenté (1.26 ± 0.08). Au niveau de la PSD (Fig 3.10C), le niveau d'expression de la β -actine est également diminué chez les souris âgées par rapport aux souris matures (0.76 ± 0.05), alors que l'abondance de la tubuline n'a pas varié significativement.

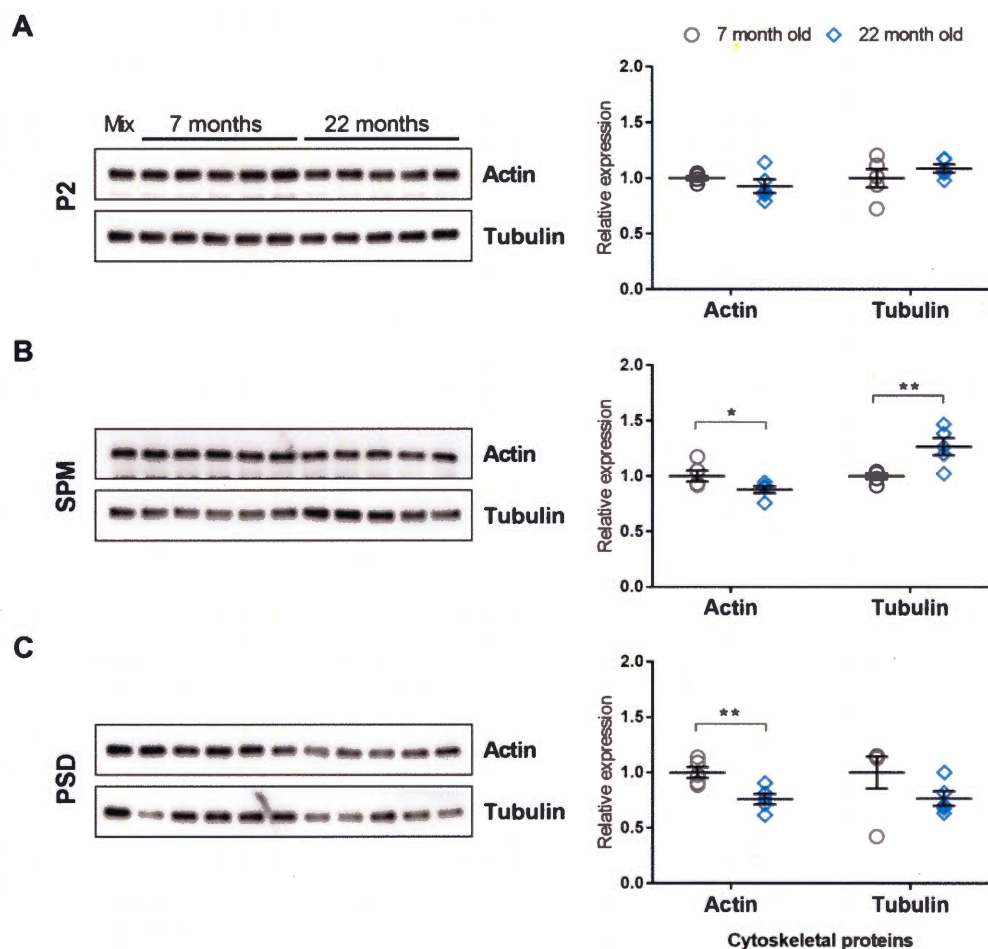


Fig 3. 10 Expression des protéines du cytosquelette chez les souris matures et âgées (A-C) À partir de chaque fraction isolée provenant des souris âgées de 7 et de 22 mois, 2.5 µg de protéines ont été séparées sur gel TGX *stain-free*, puis transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence. La membrane a été ensuite incubée avec un anticorps spécifique à l'actine et à la tubuline. Les bandes ont été révélées par chimiluminescence à l'aide du ChemiDoc MP et elles ont été quantifiées (panneau à droite) où chaque point représente l'intensité d'une bande. Les données d'intensité sont exprimées en moyenne \pm SEM par rapport au groupe de souris âgées de 7 mois. Pour les différences significatives par rapport aux souris de 7 mois, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**). P2, synaptosome; SPM, membrane synaptosomale; PSD, densité postsynaptique.

3.9 Expression des protéines de vésicule

Les résultats obtenus présentent peu de changement et ont été observé au niveau du compartiment postsynaptique entre les souris matures et âgées. L'effet du vieillissement est alors analysé au niveau du compartiment présynaptique, en particulier les protéines de vésicules impliquées dans le relargage des neurotransmetteurs, dont synaptophysine jouant un rôle dans l'arrimage des vésicules à la zone active de la membrane présynaptique. Étant donné que les protéines de vésicules ne sont pas présentes dans la fraction PSD (Fig 3.4B), la fraction des membranes solubles au Triton-X (SSM) a été analysée ainsi que la fraction des vésicules synaptiques (SV) où elles sont enrichies. En analysant la fraction P2 (Fig 3.11A), les résultats d'immunobuvardage montrent que l'expression de EEA1 n'a pas variée au cours du vieillissement tandis que l'expression de synaptophysine chez les souris âgées de 22 mois diminue par rapport aux souris de 7 mois (0.69 ± 0.08 et 1.00 ± 0.10 , respectivement). Dans la fraction SPM (Fig 3.11B), l'expression de EEA1 est augmentée significativement de 79% en comparant avec les souris de 7 mois (1.79 ± 0.06 et 1.00 ± 0.09 , respectivement) et l'expression de synaptophysine a baissée de 40% (0.60 ± 0.11 et 1.0 ± 0.05). Dans la fraction SV (Fig 3.11C), l'expression de EEA1 chez les souris âgées a augmenté significativement par rapport à celles de 7 mois (0.85 ± 0.03 et 1.00 ± 0.04 , respectivement). Une diminution d'expression de synaptophysine a été mesurée chez les souris de 22 mois comparativement aux souris de 7 mois (1.35 ± 0.09 et 1.00 ± 0.10 , respectivement). Enfin, l'immunobuvardage de la fraction SSM (Fig 3.11D) a montré une baisse d'expression de synaptophysine par rapport aux souris de 7 mois (0.57 ± 0.06 et 1.00 ± 0.06).

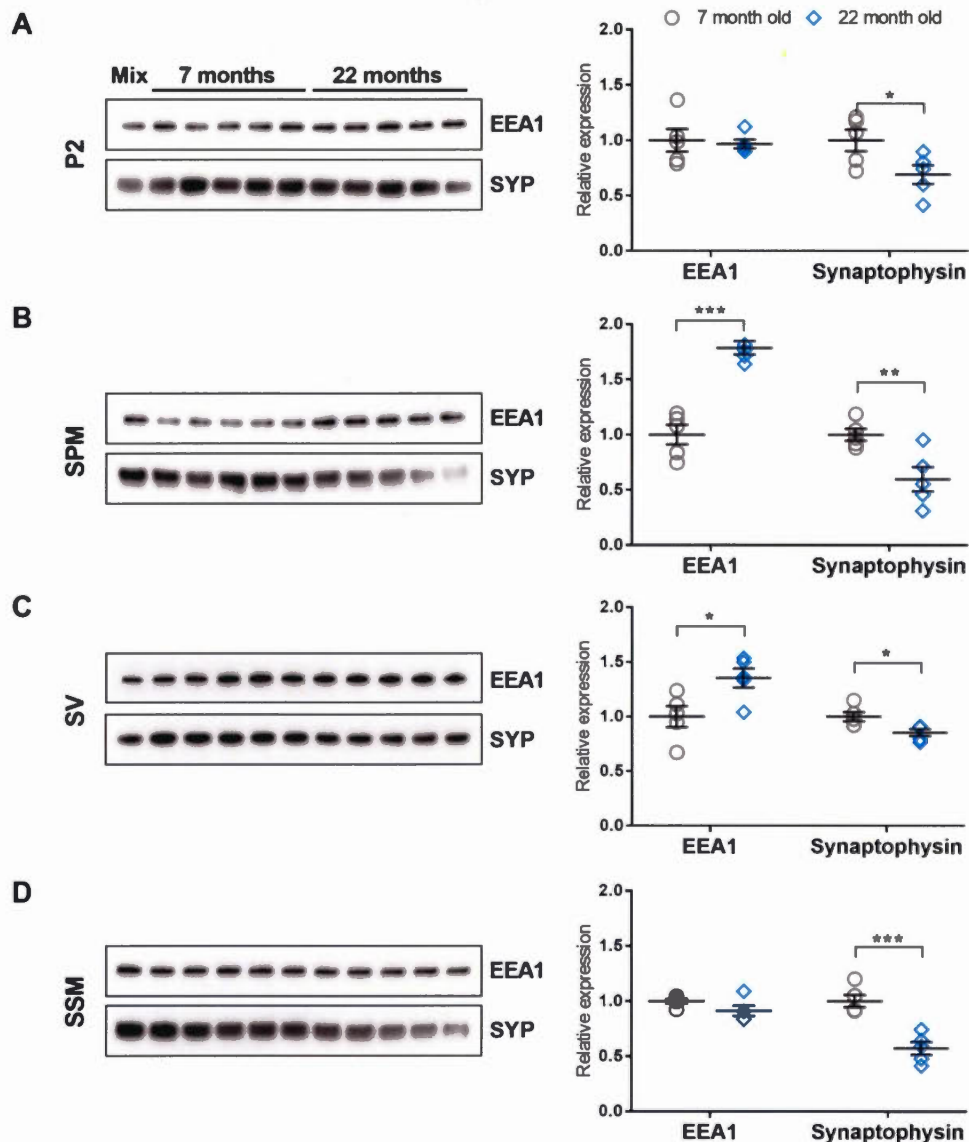


Fig 3. 11 Le vieillissement normal a un effet au niveau du compartiment présynaptique (A-D) À partir de chaque fraction isolée provenant des souris âgées de 7 et de 22 mois, 2.5 µg de protéines ont été séparées sur gel TGX *stain-free*, puis transférées sur une membrane PVDF à faible fluorescence. La membrane a été ensuite incubée avec un anticorps spécifique à une sous-unité du NMDAR et les bandes ont été révélées par chimiluminescence à l'aide du ChemiDoc MP. Les bandes ont été quantifiées (panneau à droite) où chaque point représente l'intensité d'une bande. Les données d'intensité sont exprimées en moyenne ± SEM par rapport au groupe de souris âgées de 7 mois. Pour les différences significatives par rapport aux souris de 7 mois, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)). EEA1, Early endosome antigène-1; SYP, synaptophysine. P2, synaptosome; SPM, membrane synaptosomale; SV, vésicule synaptique; SSM, membrane soluble au Triton.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le vieillissement amène des changements au niveau des fonctions cognitives, mais il n'est pas encore clair comment les processus sont mis en place ou impliqués dans le déclin cognitif (Murman, 2015). La plupart des études s'intéressent à l'évolution et aux altérations des maladies neurologiques reliées au vieillissement, mais peu d'entre elles s'intéressent au vieillissement en absence de conditions pathologiques (Harada et al., 2013). Ainsi, la présente étude vise à déterminer quelques altérations associées au vieillissement sur l'expression des protéines synaptiques chez les individus âgés. En effectuant le fractionnement cellulaire du cortex murin, il a été possible d'isoler les boutons synaptiques (synaptosomes) pour ensuite analyser les membranes synaptiques. En combinant le fractionnement cellulaire avec l'immunobuvardage quantitatif, les résultats ont permis de déterminer les effets du vieillissement sur le niveau de protéines impliquées dans la neurotransmission excitatrice.

Pour effectuer un immunobuvardage quantitatif, un contrôle de chargement est nécessaire pour compenser les erreurs (1) de chargement d'échantillon, (2) associées à un transfert non uniforme des protéines sur membrane PVDF, (3) d'estimation de la concentration protéique (Ghosh et al., 2014). Encore aujourd'hui, la principale méthode de normalisation s'effectue par rapport à l'expression des gènes de référence stables (*housekeeping genes*) tel que la β -actine, l' α -tubuline et la

GAPDH. Toutefois, il a été montré que ces protéines de références peuvent varier selon les conditions expérimentales et les tissus (Ferguson et al., 2005; Rodriguez-Mulero et Montanya, 2005; Ruan et Lai, 2007). Puisque l'abondance de ces protéines est relativement élevée et que le domaine linéaire de l'immunodétection par les anticorps est étroit, le signal de détection tend rapidement à être saturé, ce qui fait en sorte que les changements d'expression ne sont pas observables pour ces protéines. Une attention particulière doit donc être prise en considération pour assurer que la quantité de protéines chargée soit située à l'intérieur du domaine linéaire pour la protéine de référence et pour la protéine d'intérêt (Ghosh et al., 2014; Taylor et al., 2013). Généralement, après la détection des protéines d'intérêt, une étape de décapage (ou *stripping*) permettant la dissociation des anticorps des protéines immobilisées sur la membrane est effectuée. Cette même membrane est ensuite réincubée avec un autre anticorps primaire dirigé contre les protéines de référence. Cependant, durant l'étape de décapage, il est inévitable que des protéines se dissocient de la membrane en raison des réactifs utilisés dans le tampon de décapage, ce qui peut ainsi avoir un impact sur la quantification (Alegria-Schaffer et al., 2009). Ainsi, l'utilisation des protéines de références n'est pas une méthode optimale pour la quantification d'un immunobuvardage. D'une autre façon, la normalisation des bandes détectées peut aussi se faire par rapport à la quantité de protéines totales chargée dans chaque puits en utilisant la méthode de coloration Ponceau ou de SYPRO Ruby. Ces deux méthodes permettent d'avoir un grand intervalle de linéarité comparativement aux protéines de référence (Aldridge et al., 2008). Cependant, la majorité des méthodes emploient des réactifs coûteux et nécessitent plusieurs procédures afin d'obtenir la coloration qui peut engendrer des bruits de fond non uniforme (Ghosh et al., 2014). De plus, ces méthodes ne permettent pas de détecter des problèmes avant le début des étapes d'immunobuvardage (Colella et al., 2012).

La technologie *stain-free* a été utilisée pour l'immunobuvardage quantitatif afin d'évaluer les impacts du vieillissement sur l'expression des protéines impliquées

dans la neurotransmission excitatrice. Comparativement aux gels de polyacrylamide traditionnels, les gels *stain-free* contiennent un composé chimique trihalogène. Les composés chimiques trihalogènes comme le 2,2,2-trichloroéthanol permettent de visualiser les protéines dans le gel d'électrophorèse lorsqu'il forme une liaison avec les tryptophanes de la protéine suite à une exposition de courte durée à l'UV (Ladner et al., 2004). Cette liaison covalente du composé avec le tryptophane permet l'émission de fluorescence qui peut être captée par un système d'imagerie utilisant une caméra digitale. Cela donne comme avantage la possibilité d'évaluer la qualité de chargement sur gel à la suite de l'électrophorèse et du transfert durant les processus d'immunobuvardage. Cependant, la modification des résidus tryptophanes peut perturber l'interaction entre anticorps-antigène dans le cas où l'anticorps utilisé cible une séquence peptidique contenant du tryptophane (Gilda et Gomes, 2013).

La quantification des protéines peut également se faire par la spectrométrie de masse (Zhang et al., 2010). Comparativement à l'immunobuvardage qui dépend de la spécificité de l'anticorps, la spectrométrie de masse se base sur plusieurs paramètres comme le temps de rétention, le rapport masse sur charge de l'ion précurseur et le fragment du peptide ionisé (Bennett et al., 2017). Cependant, ces paramètres sont affectés par des aspects techniques à considérer tels que l'extraction des protéines, la digestion protéolytique et les modifications apportées sur protéines lors de la préparation de l'échantillon. La détermination des protéines à la base de leurs peptides peut impliquer des incertitudes au niveau de l'identification (1) si elles partagent des homologies comme les sous-unités des AMPARs, ou (2) si le peptide provient d'une autre protéine (Kohl et al., 2008). La spectrométrie de masse offre une meilleure reproductibilité et qualité des données, alors que l'immunobuvardage permet une bonne accessibilité et sensibilité en fonction de l'anticorps utilisé (Bennett et al., 2017). Cependant, la quantité de protéines obtenue dans les différents échantillons du fractionnement cellulaire impose une limitation pour la spectrométrie de masse (Cox et Emili, 2006). Il aurait nécessité plus de quantité de matériels de

départ (cortex). Ainsi, l'immunobuvardage a été utilisé dans cette étude pour analyser le niveau des protéines.

Outre la détermination du domaine linéaire de quantification pour chaque anticorps utilisé et la quantité de protéines à charger sur gel d'électrophorèse, la qualité de l'anticorps utilisé est un autre facteur critique à prendre en considération pour l'immunobuvardage (Gilda et al., 2015; Signore et al., 2017; Taylor et al., 2013). Comme l'immunobuvardage se base ultimement sur une interaction spécifique entre anticorps et l'antigène, un anticorps primaire hautement sensible et spécifique permet d'analyser la protéine d'intérêt avec une certitude. Malgré qu'ils soient dispendieux, les anticorps de qualité permettent d'obtenir des résultats d'immunobuvardages constants. D'ailleurs, la dilution des anticorps doit être considérée afin d'obtenir un signal de détection adéquat (Taylor et al., 2013).

Depuis les dernières décennies, plusieurs avancements ont contribué aux connaissances sur le dynamisme des AMPARs dans les scénarios pathologiques, mais les mécanismes de régulation et les variations associées au vieillissement restent encore inconnus. Contrairement à la majorité des études qui se concentrent sur l'hippocampe jouant un rôle central dans la mémoire, la présente étude décrit l'expression de plusieurs protéines exprimées dans le cortex de souris âgées. Les résultats obtenus montrent que le niveau de GluA1-4 ne varie pas entre les souris matures et âgées peu importe le compartiment analysé. En comparant avec les études qui ont été faites sur l'hippocampe, les niveaux de GluA1 et GluA2 à la surface membranaire sont diminuées chez les rats âgés (Yang et al., 2015; Yu et al., 2011). Cette comparaison suggère que les effets du vieillissement sont différents selon les régions du cerveau ou selon l'espèce étudiée. Par ailleurs, l'abondance et la localisation des AMPARs à la surface membranaire dépendent en partie des modifications post-traductionnelles au niveau du domaine C-terminale (Henley et al., 2011; Haganir et Nicoll, 2013). Bien que le niveau des AMPARs ne varie pas avec

l'âge dans la présente étude, il est possible que le vieillissement ait un effet sur les mécanismes des modifications post-traductionnelles menant à une dérégulation de routage intracellulaire. Cependant, les résultats présents ne permettent pas de conclure cette hypothèse. Basé sur les connaissances actuelles des différentes fonctions des modifications post-traductionnelles, il n'est pas encore compris si ces dernières sont régulées différemment chez les individus âgés et comment ces changements contribuent au déclin cognitif au cours du vieillissement (Jurado, 2017).

L'abondance des AMPARs est régulée d'une part par l'activation des NMDARs qui sont impliqués dans les mécanismes de plasticité synaptique (Henley et Wilkinson, 2013; Hunt et Castillo, 2012). GluN1, GluN2A et GluN2B sont exprimées majoritairement au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe (Magnusson et al., 2007). Ces sous-unités du NMDAR sont synthétisées et assemblées en tétramère dans le réticulum endoplasmique avant d'être exportées à la surface synaptique (Horak et al., 2014). Les NMDARs contenant GluN2B ont la particularité d'avoir une meilleure affinité pour le glutamate et d'avoir une longue durée d'ouverture du canal pour l'entrée des ions Ca^{2+} pouvant induire la LTP (Erreger et al., 2005). Cependant, il est connu que le niveau de GluN2B est élevée à la naissance et diminue au cours du développement, alors que le niveau de GluN2A augmente durant ce même temps (Dumas, 2005; Monyer et al., 1994). En conséquence, il a été établi que le déclin de la mémoire et des fonctions cognitives relié au vieillissement du cerveau est associé au changement de la composition des sous-unités NMDARs (Clayton et al., 2002; Kuehl-Kovarik et al., 2000) et à l'atténuation de la LTP dépendentes des NMDARs (Boric et al., 2008). Effectivement, des études ont rapporté une diminution d'expression de GluN2B en fonction de l'âge (Clayton et Browning, 2001; Magnusson, 2000). La diminution d'ARNm de GluN2B, qui pourrait être causée par une inhibition de la transcription au cours du vieillissement (Magnusson, 2012), peut expliquer la diminution d'expression de GluN2B dans la fraction synaptosomale obtenue chez les souris âgées de 22 mois (Fig 3.8A). Ce résultat concorde également

avec une étude qui a observé une diminution d'expression de GluN2B dans la fraction synaptosomale (Magnusson et al., 2007). Certaines études ont observé une réduction d'expression de GluN2A au niveau des membranes synaptosomales (Kuehl-Kovarik et al., 2000; Magnusson, 2000; Wenk et Barnes, 2000), mais les résultats dans cette étude n'ont montré aucune variation dans les fractions analysées chez les souris âgées. L'effet du vieillissement sur l'abondance de GluN1 est variable chez les souris. Des études ont montré une réduction significative de l'ARNm et de l'expression protéique avec l'âge (Magnusson, 2000; Magnusson et al., 2002) et d'autres n'ont observé aucune différence (Magnusson, 2001). La différence de ces résultats est expliquée par l'ajout d'une expérience comportementale, ce qui indique que l'expression de GluN1 n'est pas seulement variable en fonction de l'âge, mais aussi en fonction des facteurs environnementaux (Magnusson, 2001). Dans le cas de la présente étude, le niveau de GluN1 a diminué faiblement, mais significativement. En considérant qu'il n'y a pas eu de variation d'expression des sous-unités de NMDAR à la PSD chez les souris âgées, le déclin cognitif associé au vieillissement n'est pas seulement causé par la diminution d'expression des NMDARs synaptiques ou la perte de neurones, mais possiblement par la baisse d'activité fonctionnelle (Newcomer et al., 2000). L'expression des NMDARs à la surface synaptique est aussi régulée par les modifications post-traductionnelles qui peuvent changer l'interaction des protéines de la PSD. Par exemple, il est connu que la CK2 (caséine kinase 2) peut phosphoryler la Ser1480 de GluN2B pour empêcher son interaction avec PSD-95 (Chung et al., 2004; Sanz-Clemente et al., 2010), ce qui induit l'endocytose médiée par la clathrine. L'abondance synaptique des NMDARs contenant GluN2B peut aussi être régulée à partir de la phosphorylation de la Tyr1472 par les kinases de la famille Src qui vont inhiber l'internalisation du récepteur en empêchant son interaction avec la protéine adaptatrice de la clathrine AP-2 (Lavezzari et al., 2003; Roche et al., 2001). Il est alors possible que le vieillissement entraîne des effets sur l'internalisation des NMDARs, ce qui explique le même niveau de ceux-ci à la PSD chez les 2 groupes de souris (Zhao et al., 2009). Puisque la dérégulation des

modifications post-traductionnelles est associée avec le processus de vieillissement (Cloos et Christgau, 2004), des études futures utilisant l'immunoprécipitation pourraient permettre de voir le niveau d'interaction entre GluN2B et PSD-95 ou AP2 chez les souris âgées. Il serait également pertinent d'évaluer la phosphorylation des sous-unités du NMDAR par spectrométrie de masse.

La PSD-95 possède un rôle important dans l'ancrage des NMDAR et d'autres protéines synaptiques à la surface de la PSD. Contrairement à l'hypothèse initiale où il était attendu que le niveau de PSD-95 diminue avec l'âge, les résultats de la présente étude ne concordent pas avec cette hypothèse. À l'inverse, une étude a démontré que l'expression de cette protéine diminue avec l'âge en analysant les synaptosomes d'hippocampe par immunobuvardage des rats âgés de 12 mois et 28 mois (VanGuilder et al., 2011). Par contre leur résultat d'analyse par qPCR n'a pas montré de différence au niveau de la transcription en fonction de l'âge, ce qui suggère un changement dans la régulation ou dans la stabilité dans la PSD au cours du vieillissement. Une autre étude a montré une augmentation d'expression de PSD-95 dans le cortex des humains âgés par des analyses d'immunobuvardages (Head et al., 2009). De manière intéressante, des études ont observé une augmentation d'expression de PSD-95 lorsque les rongeurs étaient placés dans une cage avec un environnement enrichi pour une longue durée (Nithianantharajah et al., 2004; Xu et al., 2009). Cette hausse induite par des facteurs externes aurait un effet neuroprotecteur ou serait associée à un mécanisme compensatoire pour pallier aux déficits synaptiques (Savioz et al., 2014). L'abondance de PSD-95 au niveau de la PSD peut donc être modifiée en fonction de plusieurs facteurs et serait ainsi dépendante de l'activité neuronale (Zhang et Lisman, 2012).

Il est connu que le vieillissement entraîne des changements morphologiques aux neurones chez l'humain, ainsi que d'autres espèces comme *Caenorhabditis elegans* (Pannese, 2011; Toth et al., 2012). L'un des changements observés se

retrouve au niveau des épines dendritiques qui agissent comme principal site des synapses glutamatergiques et de la formation de la plasticité synaptique (Dickstein et al., 2013). Shank1, Shank2 et Shank3 forment une famille de protéines d'échafaudage dans la PSD des synapses glutamatergiques. En interagissant avec plusieurs partenaires pour le remodelage du cytosquelette d'actine, chacune d'elles possèdent des fonctions différentes dans la morphologie, la maturation des épines dendritiques et l'organisation structurale de la PSD (Grabrucker et al., 2011; Sala et al., 2001). À partir des résultats d'immunobuvardage mesuré dans la présente étude, le niveau d'expression des protéines Shank peut informer sur l'effet du vieillissement sur les épines dendritiques. D'après plusieurs études chez différents modèles animaux, il a été démontré que le vieillissement entraîne une diminution de la densité d'épines à la surface des dendrites (Cupp et Uemura, 1980; Duan et al., 2003; Dumitriu et al., 2010). Ces diminutions étaient reliées avec la baisse d'expression de Shank (Hung et al., 2008). Des études ont rapporté que les rongeurs ayant l'expression de Shank atténuée avaient une réduction du nombre d'épines. Basé sur le résultat de la fraction SPM (Fig 3.8B), une diminution du niveau de Shank chez les souris âgées a été observée, ce qui reflète les mêmes observations que les autres études (Hung et al., 2008; Schmeisser et al., 2012; Wang et al., 2016). Cependant, l'analyse de la PSD issue de la fraction SPM (Fig 3.8D) a montré une augmentation de Shank chez les souris âgées, ce qui pourrait suggérer que la tête des épines dendritiques ou la taille de la PSD est plus grande que chez les souris matures (Sala et al., 2001). Il est à noter que dans le cas de la présente étude, l'anticorps utilisé (anti pan-Shank de NeuroMab) reconnaît les trois protéines (Shank1-3) simultanément lors de l'immunobuvardage. De vue d'ensemble, les résultats obtenus pour cette analyse sont exprimés par la somme des intensités de Shank1-3. À la base de ces résultats, il n'est pas possible d'avoir une quantification fiable pour chacune des bandes avec l'anticorps employé. Il aurait fallu alors analyser avec un anticorps spécifique pour chaque protéine de la famille. Par contre, en raison de leur homologie de séquence et de domaine, les fonctions spécifiques pour chacune d'elles ne sont pas complètement bien élucidées

(Jiang et Ehlers, 2013). Des études futures utilisant la spectrométrie de masse pourraient permettre de répondre à cette intrigante observation.

L'actine est reconnue comme composante du cytosquelette prédominante dans les épines dendritiques (Fifkova et Delay, 1982). L'un des rôles associés au cytosquelette d'actine est la modulation structurale des épines dendritiques en réponse de l'activité synaptique (Star et al., 2002). Des évidences ont montré que l'activité des récepteurs de glutamate à la PSD influence le dynamisme local de l'actine, ce qui affecte ainsi la morphologie des épines (Fischer et al., 2000; Halpain et al., 1998; Matsuzaki et al., 2004). De plus, la morphologie de l'épine et l'abondance des récepteurs de glutamate sont influencées par le degré de polymérisation de l'actine (Cingolani et Goda, 2008; Zhou et al., 2001). Sachant que les épines dendritiques sont riches en actine (Landis et Reese, 1983), la baisse d'actine dans les fractions SPM et PSD (Fig 3.10BC) peut également indiquer une diminution du nombre d'épines dendritiques chez les souris âgées. Ce résultat s'aligne avec la diminution de Shank dont la réduction d'expression est reliée avec une baisse du niveau d'actine localisé dans les épines dendritiques (MacGillavry et al., 2016). Basé sur les résultats de la présente étude, le vieillissement est accompagné d'une diminution d'épines dendritiques.

Les microtubules formés de sous-unités tubuline sont principalement responsables de l'arborisation des axones et des dendrites (Baas et al., 1991). Toutefois, des études montrent que les microtubules peuvent se retrouver dans les épines dendritiques de manière transitoire pour induire des changements morphologiques en fonction de l'activité synaptique (Gu et al., 2008; Hu et al., 2008; Jaworski et al., 2009). Les évidences de ces études indiquent qu'il existe des fractions de microtubule dynamiquement instable au niveau des dendrites (Baas et al., 1991; Brown et al., 1993) et que le dynamisme de ces microtubules a une importance dans la plasticité synaptique (Jaworski et al., 2009). Durant le vieillissement, la régression

des dendrites de neurones corticales a été associée à la perte de stabilité et de dynamisme des microtubules (Duan et al., 2003; Jacobs et al., 2001). Les résultats obtenus (Fig 3.10B) montrent une augmentation de niveau de tubuline, ce qui ne concorde pas à la régression des dendrites lors du vieillissement. Cependant, selon des analyses de morphométrie, Caselli et al. démontrent que la densité des microtubules dans les axones augmente en fonction de l'âge chez les rats âgés entre 3 et 12 mois et que cette densité demeure stable jusqu'à l'âge de 30 mois (Caselli et al., 1999). L'augmentation de la tubuline pourrait alors suggérer que le diamètre des axones et des dendrites sont plus grand chez les souris âgées. Bien que la stabilité des microtubules soit importante pour maintenir la morphologie des neurones ainsi que l'intégrité synaptique, le dynamisme reste important pour réguler la morphologie et la plasticité structurale des épines dendritiques (Jaworski et al., 2009). Dans cette étude, il n'est pas possible d'évaluer l'instabilité dynamique des microtubules par immunobuvardage dirigé contre la tubuline. Il aurait fallu par exemple analyser l'abondance des protéines associées aux microtubules (MAP) comme MAP2 et Tau qui régulent la stabilité des microtubules (Marya et al., 1994; Serrano et al., 1984).

La force des synapses excitatrices dépend à la fois de la probabilité du relâchement de neurotransmetteurs et du nombre de récepteurs présents à la surface de la membrane (Rosenmund et Stevens, 1996). En analysant le compartiment présynaptique, les résultats obtenus dans la présente étude (Fig 3.11) correspondent à ce qui a été observé chez les animaux âgés présentant une faible expression de synaptophysine, une protéine qui participe à l'arrimage des vésicules à la zone active de la membrane synaptique (Calakos et Scheller, 1994; Canas et al., 2009; Haley et al., 2010). La différence d'abondance de synaptophysine peut indiquer que le nombre de synapses ou de vésicules synaptiques, ou la quantité de synaptophysine à la surface des vésicules est réduit (Frick et Fernandez, 2003). D'un autre point de vue, la diminution de synaptophysine dans la fraction des membranes synaptosomales peut être associée à une diminution de densité de la zone active (Rosenmund et Stevens,

1996), où les vésicules s'arriment pour relargage des neurotransmetteurs. La baisse du niveau de synaptophysine dans les fractions membranaires peut également indiquer une diminution d'abondance des protéines impliquées dans l'arrimage des vésicules au niveau de la membrane plasmique. Il a été en effet, démontré qu'il avait une diminution d'expression de SNAP-25 (*Synaptosomal nerve-associated protein 25 kDa*) chez les souris âgées (Canas et al., 2009; VanGuilder et al., 2010). Ainsi, les résultats obtenus suggèrent que le vieillissement aurait un impact sur la neurotransmission par une diminution de relâchement de neurotransmetteurs chez les souris âgées.

La protéine endosomale EEA1 assume un rôle critique dans la fusion des vésicules durant le processus d'endocytose. Dans la fraction SPM, le niveau d'EEA1 est augmenté significativement chez les souris âgées. Puisqu'elle est ubiquitaire, cette protéine endosomale peut se retrouver dans les compartiments présynaptiques et postsynaptiques. En considérant la méthode employée pour effectuer le fractionnement sous-cellulaire, il est difficile de savoir comment EEA1 est affecté par le vieillissement dans chacun des compartiments. Il est connu que la surexpression d'EEA1 induit l'activité de fusion des endosomes, menant à une augmentation de taille des vésicules (Ramanathan et al., 2013). D'un point de vue présynaptique, EEA1 est impliqué dans la fusion des vésicules emmagasinant les neurotransmetteurs. En apposition avec la diminution du niveau de synaptophysine qui décroît le relâchement des neurotransmetteurs par exocytose, l'augmentation du niveau d'EEA1 suggère un effet compensatoire pour maximiser la libération des neurotransmetteurs via des vésicules plus larges. Cette hypothèse peut être appuyée par des études en protéomique du vieillissement qui ont également observé plusieurs variations d'expression de protéines impliquées dans le trafic des endosomes (Head et al., 2009; Majdi et al., 2009; VanGuilder et al., 2010). Par exemple, l'expression des protéines impliquées dans la fusion des vésicules à la membrane, VAMP2 et syntaxine 1, est diminuée chez les rats âgés (VanGuilder et al., 2010). Ces études

laissent croire qu'il existe différents mécanismes de fusion vésiculaire affecté par l'âge. Au niveau postsynaptique, EEA1 est impliqué dans la modulation de l'activité synaptique. Son augmentation d'abondance serait reliée à une hausse d'activité d'internalisation des AMPAR dans les endosomes précoces (Xu et Pozzo-Miller, 2017). Avec la hausse du niveau de EEA1, il serait possible que les endosomes soient dirigés vers la voie de recyclage pour maintenir le nombre de récepteur à la membrane synaptique. Cela pourrait expliquer le même niveau d'expression des AMPARs dans la PSD entre les souris âgées de 7 et de 22 mois (Fig 3.4) et la faible variation des NMDARs (Fig. 3.7).

Basé sur les résultats obtenus dans la présente étude, un modèle du vieillissement neuronal a été proposé (Fig 4.1). Sachant que l'actine est enrichie dans les épines dendritiques, les résultats d'analyse montrant la diminution du niveau d'actine supporte l'idée qu'il y a une réduction de taille et/ou du nombre d'épines dendritiques chez les souris âgées. L'altération de la dynamique des filaments d'actine serait un élément qui mène à la perte des synapses durant le vieillissement (Duan et al., 2003; Mack et al., 2016). Au niveau du compartiment présynaptique, la diminution de synaptophysine indiquerait une réduction du nombre de vésicules synaptiques chez les souris âgées par rapport aux souris matures (Hatanpaa et al., 1999). En revanche, la taille des vésicules synaptiques serait agrandie avec l'augmentation d'expression de EEA1 chez les souris âgées. Puisque EEA1 pourrait également être impliqué dans la libération des neurotransmetteurs, son augmentation du niveau pourrait compenser la diminution de synaptophysine. Cependant, il n'y a présentement aucune étude qui peut supporter cette hypothèse en affirmant la relation entre EEA1 et synaptophysine. Au niveau du compartiment postsynaptique Shank peut interagir indirectement avec les AMPARs et NMDARs. L'augmentation du niveau de Shank permettrait une plus grande expression synaptique de ces récepteurs. D'ailleurs, l'augmentation de Shank au niveau de la PSD indiquerait une plus grande surface de la PSD qui corrèlerait avec le nombre de récepteurs de glutamate

(Shinohara et Hirase, 2009). Dans l'optique de bien voir les changements des épines dendritiques au cours du vieillissement, il serait pertinent d'élargir la fenêtre de temps en ajoutant un groupe de souris âgées de 2 mois correspondant à un humain âgé de 20 ans. L'ajout d'un groupe de souris âgées de 2 mois permettra alors d'enrichir le modèle hypothétique en comparant l'expression différentielle avec les groupes de souris âgées de 7 et 22 mois.

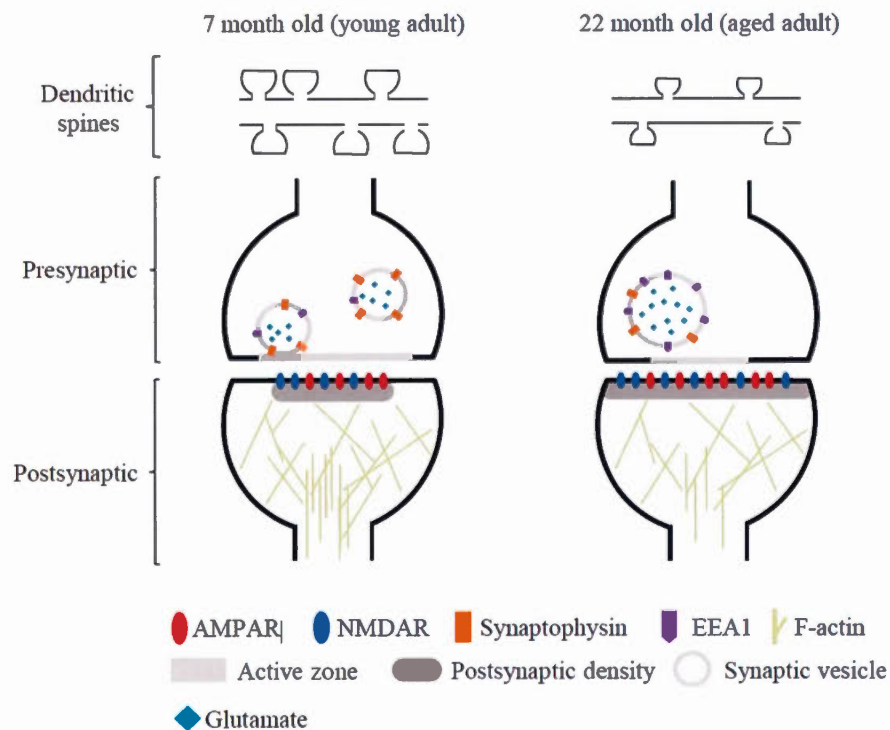


Fig 4. 1 Modèle proposé des changements durant le vieillissement normal chez la souris

Basés sur les résultats obtenus, la taille et le nombre d'épines dendritiques seraient réduits chez les souris âgées de 22 mois par rapport aux souris de 7 mois. Pour compenser ces effets, les épines dendritiques possèderaient une plus grande surface de densité postsynaptique pour maintenir un plus grand nombre de AMPARs et de NMDARs synaptiques comparativement aux souris matures. Au niveau présynaptique, il serait possible que les souris âgées aient peu de vésicules synaptiques, mais elles sont de plus grandes tailles et emmagasinent beaucoup de neurotransmetteurs.

En conclusion, le vieillissement est un processus complexe qui varie selon chaque individu en fonction des facteurs génétiques et environnementaux. En neurobiologie, la majorité des études sur le vieillissement se concentrent sur les maladies neurodégénératives, mais peu ont été effectuées dans un contexte non pathologique. Sachant que le vieillissement est le principal facteur de risque de maladie neurologique, la compréhension de ses effets chez les individus sains est important afin d'établir des biomarqueurs potentiels permettent de délimiter la frontière entre le vieillissement normal et pathologique. En s'intéressant aux aspects moléculaires et cellulaires, les impacts du vieillissement sur l'expression des protéines synaptiques ont été déterminés en combinant le fractionnement cellulaire, la technologie *stain-free* et l'immunobuvardage. En tenant plusieurs critères en considération pour la fiabilité de la quantification (le domaine de linéarité, la référence de normalisation et l'anticorps utilisé), il a été possible d'évaluer l'expression de plusieurs protéines synaptiques du cortex et la distribution dans différents compartiments neuronaux issue du fractionnement par centrifugation différentielle. Les résultats d'immunobuvardage ont montré peu d'effet du vieillissement normal sur l'expression des récepteurs du glutamate (AMPA et NMDAR). Par contre, les variations d'expression de la protéine d'échafaudage Shank dans différents compartiments ont permis de déterminer les effet de l'âge sur l'organisation de la PSD et la morphologie des épines dendritique. Le vieillissement a également affecté l'expression des protéines du cytosquelette (actine et tubuline) et surtout les protéines de vésicules (EEA1 et synaptophysine). Dans une vue d'ensemble des résultats tout en tenant compte du nombre de souris utilisées et de la quantité restreinte d'échantillons, les effets du vieillissement normal observé dans la présente étude supporte un modèle où il y a une désorganisation structurale de la synapse et avec l'altération du trafic intracellulaire des protéines synaptiques. Cependant, le nombre de souris étudiées dans cette étude ne permet pas de tracer une conclusion définitive. Davantage de recherches seront nécessaires en analysant d'autres marqueurs protéiques afin de mieux comprendre les effets du vieillissement

et d'émettre une conclusion mécanistique à la base de l'activité neuronale, tout en appliquant d'autres techniques, telle que la spectrométrie de masse pouvant compléter les résultats obtenus. De plus, l'analyse des modifications post-traductionnelles des protéines synaptiques en utilisant des anticorps spécifiques pourrait fournir des informations complémentaires et intéressantes sur l'altération des synapses chez les sujets âgés.

RÉFÉRENCES

- Alberts, B., J. Wilson, and T. Hunt. 2008. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.
- Alder, J., Z.P. Xie, F. Valtorta, P. Greengard, and M. Poo. 1992. Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron*. 9:759-768.
- Alderson, R.F., A.L. Alterman, Y.A. Barde, and R.M. Lindsay. 1990. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron*. 5:297-306.
- Aldridge, G.M., D.M. Podrebarac, W.T. Greenough, and I.J. Weiler. 2008. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods*. 172:250-254.
- Alegria-Schaffer, A., A. Lodge, and K. Vattem. 2009. Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods in enzymology*. 463:573-599.
- Allison, D.W., V.I. Gelfand, I. Spector, and A.M. Craig. 1998. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18:2423-2436.
- Anggono, V., and R.L. Huganir. 2012. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology*. 22:461-469.
- Attwell, D., A.M. Buchan, S. Chrapak, M. Lauritzen, B.A. Macvicar, and E.A. Newman. 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 468:232-243.
- Attwell, D., and A. Gibb. 2005. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nature reviews. Neuroscience*. 6:841-849.
- Baas, P.W., T. Slaughter, A. Brown, and M.M. Black. 1991. Microtubule dynamics in axons and dendrites. *Journal of neuroscience research*. 30:134-153.
- Barnes, A.P., and F. Polleux. 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annual review of neuroscience*. 32:347-381.

- Bats, C., L. Groc, and D. Choquet. 2007. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron*. 53:719-734.
- Bayes, A., L.N. van de Lagemaat, M.O. Collins, M.D. Croning, I.R. Whittle, J.S. Choudhary, and S.G. Grant. 2011. Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density. *Nature neuroscience*. 14:19-21.
- Beique, J.C., and R. Andrade. 2003. PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. *The Journal of physiology*. 546:859-867.
- Bennett, R.J., D.M. Simpson, S.W. Holman, S. Ryan, P. Brownridge, C.E. Eyers, J. Colyer, and R.J. Beynon. 2017. DOSCATs: Double standards for protein quantification. *Scientific reports*. 7:45570.
- Bliss, T.V., and G.L. Collingridge. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361:31-39.
- Bliss, T.V., and T. Lomo. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*. 232:331-356.
- Boric, K., P. Munoz, M. Gallagher, and A. Kirkwood. 2008. Potential adaptive function for altered long-term potentiation mechanisms in aging hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:8034-8039.
- Brown, A., Y. Li, T. Slaughter, and M.M. Black. 1993. Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules. *Journal of cell science*. 104 (Pt 2):339-352.
- Bryant, C.D. 2011. The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1245:31-33.
- Calakos, N., and R.H. Scheller. 1994. Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *The Journal of biological chemistry*. 269:24534-24537.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, R. Lachaine, and M. Bosset. 2007. *Biologie*. Pearson education France, Paris. 1334 pp.
- Canas, P.M., J.M. Duarte, R.J. Rodrigues, A. Kofalvi, and R.A. Cunha. 2009. Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus. *Neurobiology of aging*. 30:1877-1884.
- Carlsson, A. 1987. Brain neurotransmitters in aging and dementia: similar changes across diagnostic dementia groups. *Gerontology*. 33:159-167.
- Caselli, U., C. Bertoni-Freddari, R. Paoloni, P. Fattoretti, T. Casoli, and W. Meier-Ruge. 1999. Morphometry of axon cytoskeleton at internodal regions of rat sciatic nerve during aging. *Gerontology*. 45:307-311.

- Catala, M., and N. Kubis. 2013. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handbook of clinical neurology*. 115:29-41.
- Chowdhury, D., and J.W. Hell. 2018. Homeostatic synaptic scaling: molecular regulators of synaptic AMPA-type glutamate receptors. *F1000Research*. 7:234.
- Chung, H.J., Y.H. Huang, L.F. Lau, and R.L. Huganir. 2004. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 24:10248-10259.
- Cingolani, L.A., and Y. Goda. 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature reviews. Neuroscience*. 9:344-356.
- Clague, M.J., and S. Urbe. 2001. The interface of receptor trafficking and signalling. *Journal of cell science*. 114:3075-3081.
- Clayton, D.A., and M.D. Browning. 2001. Deficits in the expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats. *Neurobiology of aging*. 22:165-168.
- Clayton, D.A., D.R. Grosshans, and M.D. Browning. 2002. Aging and surface expression of hippocampal NMDA receptors. *The Journal of biological chemistry*. 277:14367-14369.
- Cloos, P.A., and S. Christgau. 2004. Post-translational modifications of proteins: implications for aging, antigen recognition, and autoimmunity. *Biogerontology*. 5:139-158.
- Colella, A.D., N. Chegenii, M.N. Tea, I.L. Gibbins, K.A. Williams, and T.K. Chataway. 2012. Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Analytical biochemistry*. 430:108-110.
- Colonnese, M.T., and M. Constantine-Paton. 2006. Developmental period for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent synapse elimination correlated with visuotopic map refinement. *The Journal of comparative neurology*. 494:738-751.
- Cox, B., and A. Emili. 2006. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nature protocols*. 1:1872-1878.
- Craig, A.M., and G. Banker. 1994. Neuronal polarity. *Annual review of neuroscience*. 17:267-310.
- Cupp, C.J., and E. Uemura. 1980. Age-related changes in prefrontal cortex of Macaca mulatta: quantitative analysis of dendritic branching patterns. *Experimental neurology*. 69:143-163.

- Daly, C., and E.B. Ziff. 2002. Ca²⁺-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 277:9010-9015.
- Dempster, F.N. 1992. The Rise and Fall of the Inhibitory Mechanism: toward a unified theory of cognitive development and aging. 45-75 pp.
- Dickstein, D.L., C.M. Weaver, J.I. Luebke, and P.R. Hof. 2013. Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neuroscience*. 251:21-32.
- Duan, H., S.L. Wearne, A.B. Rocher, A. Macedo, J.H. Morrison, and P.R. Hof. 2003. Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb Cortex*. 13:950-961.
- Dumas, T.C. 2005. Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Progress in neurobiology*. 76:189-211.
- Dumitriu, D., J. Hao, Y. Hara, J. Kaufmann, W.G. Janssen, W. Lou, P.R. Rapp, and J.H. Morrison. 2010. Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:7507-7515.
- Edelmann, L., P.I. Hanson, E.R. Chapman, and R. Jahn. 1995. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *The EMBO journal*. 14:224-231.
- Editorial. 2006. A picture worth a thousand words (of explanation). *Nature Methods*. 3:237.
- Erreger, K., S.M. Dravid, T.G. Banke, D.J. Wyllie, and S.F. Traynelis. 2005. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *The Journal of physiology*. 563:345-358.
- Feng, J., X. Cai, J. Zhao, and Z. Yan. 2001. Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 21:6502-6511.
- Ferguson, R.E., H.P. Carroll, A. Harris, E.R. Maher, P.J. Selby, and R.E. Banks. 2005. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*. 5:566-571.
- Fiala, J.C., M. Feinberg, V. Popov, and K.M. Harris. 1998. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18:8900-8911.

- Fifkova, E., and R.J. Delay. 1982. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *The Journal of cell biology*. 95:345-350.
- Fischer, M., S. Kaech, D. Knutti, and A. Matus. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*. 20:847-854.
- Fischer, M., S. Kaech, U. Wagner, H. Brinkhaus, and A. Matus. 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nature neuroscience*. 3:887-894.
- Frank, R.A., N.H. Komiyama, T.J. Ryan, F. Zhu, T.J. O'Dell, and S.G. Grant. 2016. NMDA receptors are selectively partitioned into complexes and supercomplexes during synapse maturation. *Nature communications*. 7:11264.
- Freudenberg, F., T. Celikel, and A. Reif. 2015. The role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors in depression: central mediators of pathophysiology and antidepressant activity? *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 52:193-206.
- Frick, K.M., and S.M. Fernandez. 2003. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiology of aging*. 24:615-626.
- Fukazawa, Y., Y. Saitoh, F. Ozawa, Y. Ohta, K. Mizuno, and K. Inokuchi. 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*. 38:447-460.
- Ghosh, R., J.E. Gilda, and A.V. Gomes. 2014. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert review of proteomics*. 11:549-560.
- Gilda, J.E., R. Ghosh, J.X. Cheah, T.M. West, S.C. Bodine, and A.V. Gomes. 2015. Western Blotting Inaccuracies with Unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS). *PloS one*. 10:e0135392.
- Gilda, J.E., and A.V. Gomes. 2013. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots. *Analytical biochemistry*. 440:186-188.
- Gilles, R. 2005. Physiologie animale. De Boeck, Bruxelles.
- Grabrucker, A.M., M.J. Schmeisser, M. Schoen, and T.M. Boeckers. 2011. Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies. *Trends in cell biology*. 21:594-603.
- Greger, I.H., E.B. Ziff, and A.C. Penn. 2007. Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends in neurosciences*. 30:407-416.

- Gu, J., B.L. Firestein, and J.Q. Zheng. 2008. Microtubules in dendritic spine development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:12120-12124.
- Guillery, R.W. 2005. Observations of synaptic structures: origins of the neuron doctrine and its current status. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 360:1281-1307.
- Haigis, M.C., and B.A. Yankner. 2010. The aging stress response. *Molecular cell*. 40:333-344.
- Haley, G.E., S.G. Kohama, H.F. Urbanski, and J. Raber. 2010. Age-related decreases in SYN levels associated with increases in MAP-2, apoE, and GFAP levels in the rhesus macaque prefrontal cortex and hippocampus. *Age (Dordr)*. 32:283-296.
- Halpain, S., A. Hipolito, and L. Saffer. 1998. Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18:9835-9844.
- Hanley, J.G. 2014. Actin-dependent mechanisms in AMPA receptor trafficking. *Frontiers in cellular neuroscience*. 8:381.
- Harada, C.N., M.C. Natelson Love, and K.L. Triebel. 2013. Normal cognitive aging. *Clinics in geriatric medicine*. 29:737-752.
- Hatanpaa, K., K.R. Isaacs, T. Shirao, D.R. Brady, and S.I. Rapoport. 1999. Loss of proteins regulating synaptic plasticity in normal aging of the human brain and in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 58:637-643.
- Hayashi, Y., S.H. Shi, J.A. Esteban, A. Piccini, J.C. Poncer, and R. Malinow. 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science*. 287:2262-2267.
- Head, E., M.M. Corrada, K. Kahle-Wroblewski, R.C. Kim, F. Sarsoza, M. Goodus, and C.H. Kawas. 2009. Synaptic proteins, neuropathology and cognitive status in the oldest-old. *Neurobiology of aging*. 30:1125-1134.
- Henley, J.M., E.A. Barker, and O.O. Glebov. 2011. Routes, destinations and delays: recent advances in AMPA receptor trafficking. *Trends in neurosciences*. 34:258-268.
- Henley, J.M., and K.A. Wilkinson. 2013. AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues in clinical neuroscience*. 15:11-27.
- Hering, H., and M. Sheng. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature reviews. Neuroscience*. 2:880-888.

- Heupel, K., V. Sargsyan, J.J. Plomp, M. Rickmann, F. Varoqueaux, W. Zhang, and K. Kriegstein. 2008. Loss of transforming growth factor-beta 2 leads to impairment of central synapse function. *Neural development*. 3:25.
- Horak, M., R.S. Petralia, M. Kaniakova, and N. Sans. 2014. ER to synapse trafficking of NMDA receptors. *Frontiers in cellular neuroscience*. 8:394.
- Hu, X., C. Viesselmann, S. Nam, E. Merriam, and E.W. Dent. 2008. Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:13094-13105.
- Huganir, R.L., and R.A. Nicoll. 2013. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*. 80:704-717.
- Hung, A.Y., K. Futai, C. Sala, J.G. Valtschanoff, J. Ryu, M.A. Woodworth, F.L. Kidd, C.C. Sung, T. Miyakawa, M.F. Bear, R.J. Weinberg, and M. Sheng. 2008. Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:1697-1708.
- Hunt, D.L., and P.E. Castillo. 2012. Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Current opinion in neurobiology*. 22:496-508.
- Isaac, J.T., M.C. Ashby, and C.J. McBain. 2007. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. 54:859-871.
- Jacobs, B., M. Schall, M. Prather, E. Kapler, L. Driscoll, S. Baca, J. Jacobs, K. Ford, M. Wainwright, and M. Trembl. 2001. Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative golgi study. *Cereb Cortex*. 11:558-571.
- Janz, R., T.C. Sudhof, R.E. Hammer, V. Unni, S.A. Siegelbaum, and V.Y. Bolshakov. 1999. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron*. 24:687-700.
- Jaworski, J., L.C. Kapitein, S.M. Gouveia, B.R. Dortland, P.S. Wulf, I. Grigoriev, P. Camera, S.A. Spangler, P. Di Stefano, J. Demmers, H. Krugers, P. Defilippi, A. Akhmanova, and C.C. Hoogenraad. 2009. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron*. 61:85-100.
- Jiang, Y.H., and M.D. Ehlers. 2013. Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron*. 78:8-27.
- Jurado, S. 2017. AMPA Receptor Trafficking in Natural and Pathological Aging. *Frontiers in molecular neuroscience*. 10:446.
- Justice, M.J., and P. Dhillon. 2016. Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Disease Models & Mechanisms*. 9:101-103.

- Kasai, H., M. Matsuzaki, J. Noguchi, N. Yasumatsu, and H. Nakahara. 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in neurosciences*. 26:360-368.
- Klingler, E. 2017. Development and Organization of the Evolutionarily Conserved Three-Layered Olfactory Cortex. *eNeuro*. 4.
- Kohl, M., R. Gorden, E. Martin, S. Anke, H. E. Meyer, and et al. 2008. Automated Calculation of Unique Peptide Sequences for Unambiguous Identification of Highly Homologous Proteins by Mass Spectrometry.
- Kramer, A.F., S. Hahn, N.J. Cohen, M.T. Banich, E. McAuley, C.R. Harrison, J. Chason, E. Vakil, L. Bardell, R.A. Boileau, and A. Colcombe. 1999. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature*. 400:418-419.
- Kuehl-Kovarik, M.C., K.R. Magnusson, L.S. Premkumar, and K.M. Partin. 2000. Electrophysiological analysis of NMDA receptor subunit changes in the aging mouse cortex. *Mechanisms of ageing and development*. 115:39-59.
- Kuijpers, M., and C.C. Hoogenraad. 2011. Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Molecular and cellular neurosciences*. 48:349-358.
- Ladner, C.L., J. Yang, R.J. Turner, and R.A. Edwards. 2004. Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Analytical biochemistry*. 326:13-20.
- Landis, D.M., and T.S. Reese. 1983. Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *The Journal of cell biology*. 97:1169-1178.
- Lavezzari, G., J. McCallum, R. Lee, and K.W. Roche. 2003. Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology*. 45:729-737.
- Leclerc, N., P.W. Beesley, I. Brown, M. Colonnier, J.W. Gurd, T. Paladino, and R. Hawkes. 1989. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *The Journal of comparative neurology*. 280:197-212.
- Li, Q., and B.A. Barres. 2018. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature reviews. Immunology*. 18:225-242.
- Lise, M.F., T.P. Wong, A. Trinh, R.M. Hines, L. Liu, R. Kang, D.J. Hines, J. Lu, J.R. Goldenring, Y.T. Wang, and A. El-Husseini. 2006. Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking. *The Journal of biological chemistry*. 281:3669-3678.
- Loessner, A., A. Alavi, K.U. Lewandrowski, D. Mozley, E. Souder, and R.E. Gur. 1995. Regional cerebral function determined by FDG-PET in healthy volunteers: normal patterns and changes with age. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 36:1141-1149.

- Logsdon, S., A.F. Johnstone, K. Viele, and R.L. Cooper. 2006. Regulation of synaptic vesicles pools within motor nerve terminals during short-term facilitation and neuromodulation. *J Appl Physiol (1985)*. 100:662-671.
- Lu, W., Y. Shi, A.C. Jackson, K. Bjorgan, M.J. Doring, R. Sprengel, P.H. Seeburg, and R.A. Nicoll. 2009. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron*. 62:254-268.
- Lujan, R., R. Shigemoto, and G. Lopez-Bendito. 2005. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*. 130:567-580.
- Luscher, C., and R.C. Malenka. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 4.
- MacGillavry, H.D., J.M. Kerr, J. Kassner, N.A. Frost, and T.A. Blanpied. 2016. Shank-cortactin interactions control actin dynamics to maintain flexibility of neuronal spines and synapses. *The European journal of neuroscience*. 43:179-193.
- Mack, T.G., P. Kreis, and B.J. Eickholt. 2016. Defective actin dynamics in dendritic spines: cause or consequence of age-induced cognitive decline? *Biological chemistry*. 397:223-229.
- Maday, S., A.E. Twelvetrees, A.J. Moughamian, and E.L. Holzbaur. 2014. Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron*. 84:292-309.
- Magnusson, K.R. 2000. Declines in mRNA expression of different subunits may account for differential effects of aging on agonist and antagonist binding to the NMDA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 20:1666-1674.
- Magnusson, K.R. 2001. Influence of diet restriction on NMDA receptor subunits and learning during aging. *Neurobiology of aging*. 22:613-627.
- Magnusson, K.R. 2012. Aging of the NMDA receptor: from a mouse's point of view. *Future neurology*. 7:627-637.
- Magnusson, K.R., S.E. Nelson, and A.B. Young. 2002. Age-related changes in the protein expression of subunits of the NMDA receptor. *Brain research. Molecular brain research*. 99:40-45.
- Magnusson, K.R., B. Scruggs, X. Zhao, and R. Hammersmark. 2007. Age-related declines in a two-day reference memory task are associated with changes in NMDA receptor subunits in mice. *BMC neuroscience*. 8:43.
- Majdi, M., A. Ribeiro-da-Silva, and A.C. Cuello. 2009. Variations in excitatory and inhibitory postsynaptic protein content in rat cerebral cortex with respect to aging and cognitive status. *Neuroscience*. 159:896-907.

- Malinow, R., D.V. Madison, and R.W. Tsien. 1988. Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature*. 335:820-824.
- Malsam, J., S. Kreye, and T.H. Sollner. 2008. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 65:2814-2832.
- Marya, P.K., Z. Syed, P.E. Fraylich, and P.A. Eagles. 1994. Kinesin and tau bind to distinct sites on microtubules. *Journal of cell science*. 107 (Pt 1):339-344.
- Matsuzaki, M., N. Honkura, G.C. Ellis-Davies, and H. Kasai. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*. 429:761-766.
- Matteoli, M., and P. De Camilli. 1991. Molecular mechanisms in neurotransmitter release. *Current opinion in neurobiology*. 1:91-97.
- Mattson, M.P., and T. Magnus. 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nature reviews. Neuroscience*. 7:278-294.
- McCorry, L.K. 2007. Physiology of the autonomic nervous system. *American journal of pharmaceutical education*. 71:78.
- McTigue, D.M., and R.B. Tripathi. 2008. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of neurochemistry*. 107:1-19.
- Monyer, H., N. Burnashev, D.J. Laurie, B. Sakmann, and P.H. Seeburg. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 12:529-540.
- Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann, and P.H. Seeburg. 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*. 256:1217-1221.
- Morris, R.G., E. Anderson, G.S. Lynch, and M. Baudry. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 319:774-776.
- Mota, B., and S. Herculano-Houzel. 2014. All brains are made of this: a fundamental building block of brain matter with matching neuronal and glial masses. *Frontiers in Neuroanatomy*. 8:127.
- Mrak, R.E., S.T. Griffin, and D.I. Graham. 1997. Aging-associated changes in human brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 56:1269-1275.
- Mullany, P., and M.A. Lynch. 1997. Changes in protein synthesis and synthesis of the synaptic vesicle protein, synaptophysin, in entorhinal cortex following induction of long-term potentiation in dentate gyrus: an age-related study in the rat. *Neuropharmacology*. 36:973-980.
- Murman, D.L. 2015. The Impact of Age on Cognition. *Seminars in hearing*. 36:111-121.
- Newcomer, J.W., N.B. Farber, and J.W. Olney. 2000. NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2:219-232.

- Nithianantharajah, J., H. Levis, and M. Murphy. 2004. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiology of learning and memory*. 81:200-210.
- Okabe, S. 2007. Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Molecular and cellular neurosciences*. 34:503-518.
- Pannese, E. 2011. Morphological changes in nerve cells during normal aging. *Brain structure & function*. 216:85-89.
- Park, M., E.C. Penick, J.G. Edwards, J.A. Kauer, and M.D. Ehlers. 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science*. 305:1972-1975.
- Pereda, A.E. 2014. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature reviews. Neuroscience*. 15:250-263.
- Petkov, V.D., V.V. Petkov, and S.L. Stancheva. 1988. Age-related changes in brain neurotransmission. *Gerontology*. 34:14-21.
- Pfrieger, F.W. 2009. Roles of glial cells in synapse development. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 66:2037-2047.
- Pfrieger, F.W., and B.A. Barres. 1997. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science*. 277:1684-1687.
- Powell, E.M., and H.M. Geller. 1999. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia*. 26:73-83.
- Rakic, P. 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nature reviews. Neuroscience*. 10:724-735.
- Ramanathan, H.N., G. Zhang, and Y. Ye. 2013. Monoubiquitination of EEA1 regulates endosome fusion and trafficking. *Cell & bioscience*. 3:24.
- Raz, N., U. Lindenberger, K.M. Rodrigue, K.M. Kennedy, D. Head, A. Williamson, C. Dahle, D. Gerstorf, and J.D. Acker. 2005. Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. *Cereb Cortex*. 15:1676-1689.
- Roche, K.W., S. Standley, J. McCallum, C. Dune Ly, M.D. Ehlers, and R.J. Wenthold. 2001. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nature neuroscience*. 4:794-802.
- Rodriguez-Mulero, S., and E. Montanya. 2005. Selection of a suitable internal control gene for expression studies in pancreatic islet grafts. *Transplantation*. 80:650-652.
- Rodriguez-Rodero, S., J.L. Fernandez-Morera, E. Menendez-Torre, V. Calvanese, A.F. Fernandez, and M.F. Fraga. 2011. Aging genetics and aging. *Aging and disease*. 2:186-195.
- Rosenmund, C., and C.F. Stevens. 1996. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*. 16:1197-1207.

- Roussignol, G., F. Ango, S. Romorini, J.C. Tu, C. Sala, P.F. Worley, J. Bockaert, and L. Fagni. 2005. Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:3560-3570.
- Ruan, W., and M. Lai. 2007. Actin, a reliable marker of internal control? *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 385:1-5.
- Sakka, L., G. Coll, and J. Chazal. 2011. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases*. 128:309-316.
- Sala, C., V. Piech, N.R. Wilson, M. Passafaro, G. Liu, and M. Sheng. 2001. Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*. 31:115-130.
- Sanz-Clemente, A., J.A. Matta, J.T. Isaac, and K.W. Roche. 2010. Casein kinase 2 regulates the NR2 subunit composition of synaptic NMDA receptors. *Neuron*. 67:984-996.
- Savioz, A., G. Leuba, and P.G. Vallet. 2014. A framework to understand the variations of PSD-95 expression in brain aging and in Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*. 18:86-94.
- Schmeisser, M.J., E. Ey, S. Wegener, J. Bockmann, A.V. Stempel, A. Kuebler, A.L. Janssen, P.T. Udvardi, E. Shiban, C. Spilker, D. Balschun, B.V. Skryabin, S. Dieck, K.H. Smalla, D. Montag, C.S. Leblond, P. Faure, N. Torquet, A.M. Le Sourd, R. Toro, A.M. Grabrucker, S.A. Shoichet, D. Schmitz, M.R. Kreutz, T. Bourgeron, E.D. Gundelfinger, and T.M. Boeckers. 2012. Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature*. 486:256-260.
- Schmitz, Y., J. Luccarelli, M. Kim, M. Wang, and D. Sulzer. 2009. Glutamate controls growth rate and branching of dopaminergic axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 29:11973-11981.
- Serrano, L., J. de la Torre, R.B. Maccioni, and J. Avila. 1984. Involvement of the carboxyl-terminal domain of tubulin in the regulation of its assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81:5989-5993.
- Sheng, M., and E. Kim. 2000. The Shank family of scaffold proteins. *Journal of cell science*. 113 (Pt 11):1851-1856.
- Shigeri, Y., R.P. Seal, and K. Shimamoto. 2004. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain research. Brain research reviews*. 45:250-265.

- Shinohara, Y., and H. Hirase. 2009. Size and Receptor Density of Glutamatergic Synapses: A Viewpoint from Left-Right Asymmetry of CA3-CA1 Connections. *Front Neuroanat.* 3:10.
- Signore, M., V. Manganelli, and A. Hodge. 2017. Antibody Validation by Western Blotting. *Methods Mol Biol.* 1606:51-70.
- Silva, A.J., C.F. Stevens, S. Tonegawa, and Y. Wang. 1992. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 257:201-206.
- Skoff, R.P., and V. Hamburger. 1974. Fine structure of dendritic and axonal growth cones in embryonic chick spinal cord. *The Journal of comparative neurology.* 153:107-147.
- Smith, S.J., and G.J. Augustine. 1988. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends in neurosciences.* 11:458-464.
- Sorra, K.E., and K.M. Harris. 2000. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus.* 10:501-511.
- Spacek, J., and K.M. Harris. 1997. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 17:190-203.
- Star, E.N., D.J. Kwiatkowski, and V.N. Murthy. 2002. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature neuroscience.* 5:239-246.
- Stern, R.M., K.L. Kock, and E.R. Muth. 2000. The gastrointestinal system. Cambridge University Press, New York, NY, US. xiii, 1039-xiii, 1039 pp.
- Sudhof, T.C. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annual review of neuroscience.* 27:509-547.
- Sudhof, T.C., and R.C. Malenka. 2008. Understanding synapses: past, present, and future. *Neuron.* 60:469-476.
- Sun, L., F.L. Margolis, M.T. Shipley, and M.S. Lidow. 1998. Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS letters.* 441:392-396.
- Sun, X., Y. Zhao, and M.E. Wolf. 2005. Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 25:7342-7351.
- Suzuki, T., and R. Tanaka. 1986. Postsynaptic density visualized by whole mount electron microscopy. *Neuroscience research.* 3:226-236.

- Suzuki, T., J. Zhang, S. Miyazawa, Q. Liu, M.R. Farzan, and W.D. Yao. 2011. Association of membrane rafts and postsynaptic density: proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. *Journal of neurochemistry*. 119:64-77.
- Tada, T., and M. Sheng. 2006. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current opinion in neurobiology*. 16:95-101.
- Tahirovic, S., and F. Bradke. 2009. Neuronal polarity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 1:a001644.
- Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E.A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S.A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J.S. Hub, B.L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland, and R. Jahn. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*. 127:831-846.
- Taylor, S.C., T. Berkelman, G. Yadav, and M. Hammond. 2013. A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Molecular biotechnology*. 55:217-226.
- Terry, R.D., R. DeTeresa, and L.A. Hansen. 1987. Neocortical cell counts in normal human adult aging. *Annals of neurology*. 21:530-539.
- Thiele, C., M.J. Hannah, F. Fahrenholz, and W.B. Huttner. 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nature cell biology*. 2:42-49.
- Tosato, M., V. Zamboni, A. Ferrini, and M. Cesari. 2007. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clinical interventions in aging*. 2:401-412.
- Toth, M.L., I. Melentijevic, L. Shah, A. Bhatia, K. Lu, A. Talwar, H. Najji, C. Ibanez-Ventoso, P. Ghose, A. Jevince, J. Xue, L.A. Herndon, G. Bhanot, C. Rongo, D.H. Hall, and M. Driscoll. 2012. Neurite sprouting and synapse deterioration in the aging *Caenorhabditis elegans* nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 32:8778-8790.
- Trachtenberg, J.T., B.E. Chen, G.W. Knott, G. Feng, J.R. Sanes, E. Welker, and K. Svoboda. 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*. 420:788-794.
- Traynelis, S.F., L.P. Wollmuth, C.J. McBain, F.S. Menniti, K.M. Vance, K.K. Ogden, K.B. Hansen, H. Yuan, S.J. Myers, and R. Dingledine. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*. 62:405-496.
- Tsacopoulos, M., and P.J. Magistretti. 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 16:877-885.

- Vaccarino, F.M., D.M. Fagel, Y. Ganat, M.E. Maragnoli, L.R. Ment, Y. Ohkubo, M.L. Schwartz, J. Silbereis, and K.M. Smith. 2007. Astroglial cells in development, regeneration, and repair. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 13:173-185.
- VanGuilder, H.D., J.A. Farley, H. Yan, C.A. Van Kirk, M. Mitschelen, W.E. Sonntag, and W.M. Freeman. 2011. Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiology of disease*. 43:201-212.
- VanGuilder, H.D., H. Yan, J.A. Farley, W.E. Sonntag, and W.M. Freeman. 2010. Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. *Journal of neurochemistry*. 113:1577-1588.
- Vyas, Y., and J.M. Montgomery. 2016. The role of postsynaptic density proteins in neural degeneration and regeneration. *Neural regeneration research*. 11:906-907.
- Walikonis, R.S., O.N. Jensen, M. Mann, D.W. Provan, Jr., J.A. Mercer, and M.B. Kennedy. 2000. Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 20:4069-4080.
- Wang, P.Y., R.S. Petralia, Y.X. Wang, R.J. Wenthold, and S.D. Brenowitz. 2011. Functional NMDA receptors at axonal growth cones of young hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:9289-9297.
- Wang, X., A.L. Bey, B.M. Katz, A. Badea, N. Kim, L.K. David, L.J. Duffney, S. Kumar, S.D. Mague, S.W. Hulbert, N. Dutta, V. Hayrapetyan, C. Yu, E. Gaidis, S. Zhao, J.D. Ding, Q. Xu, L. Chung, R.M. Rodriguiz, F. Wang, R.J. Weinberg, W.C. Wetsel, K. Dzirasa, H. Yin, and Y.H. Jiang. 2016. Altered mGluR5-Homer scaffolds and corticostriatal connectivity in a Shank3 complete knockout model of autism. *Nature communications*. 7:11459.
- Wang, Y.T. 2008. Probing the role of AMPAR endocytosis and long-term depression in behavioural sensitization: relevance to treatment of brain disorders, including drug addiction. *British journal of pharmacology*. 153 Suppl 1:S389-395.
- Waterston, R.H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S.E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M.R. Brent, D.G. Brown, S.D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R.D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A.T. Chinwalla, D.M. Church, M. Clamp, C. Clee, F.S. Collins, L.L. Cook, R.R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K.D. Delehaunty, J. Deri,

- E.T. Dermitzakis, C. Dewey, N.J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D.M. Dunn, S.R. Eddy, L. Elnitski, R.D. Emes, P. Esvara, E. Eyraas, A. Felsenfeld, G.A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W.N. Frankel, L.A. Fulton, R.S. Fulton, T.S. Furey, D. Gage, R.A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T.A. Graves, E.D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R.C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L.W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D.B. Jaffe, L.S. Johnson, M. Jones, T.A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E.K. Karlsson, et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420:520-562.
- Wehrwein, E.A., H.S. Orer, and S.M. Barman. 2016. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Comprehensive Physiology*. 6:1239-1278.
- Wen, Q., and D.B. Chklovskii. 2005. Segregation of the brain into gray and white matter: a design minimizing conduction delays. *PLoS computational biology*. 1:e78.
- Wenk, G.L., and C.A. Barnes. 2000. Regional changes in the hippocampal density of AMPA and NMDA receptors across the lifespan of the rat. *Brain research*. 885:1-5.
- Xiao, L., C. Saiki, and R. Ide. 2014. Stem cell therapy for central nerve system injuries: glial cells hold the key. *Neural regeneration research*. 9:1253-1260.
- Xu, X., and L. Pozzo-Miller. 2017. EEA1 restores homeostatic synaptic plasticity in hippocampal neurons from Rett syndrome mice. *The Journal of physiology*. 595:5699-5712.
- Xu, X., L. Ye, and Q. Ruan. 2009. Environmental enrichment induces synaptic structural modification after transient focal cerebral ischemia in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 234:296-305.
- Yang, Y.J., H.B. Chen, B. Wei, W. Wang, P.L. Zhou, J.Q. Zhan, M.R. Hu, K. Yan, B. Hu, and B. Yu. 2015. Cognitive decline is associated with reduced surface GluR1 expression in the hippocampus of aged rats. *Neuroscience letters*. 591:176-181.
- Yu, D.F., P.F. Wu, H. Fu, J. Cheng, Y.J. Yang, T. Chen, L.H. Long, J.G. Chen, and F. Wang. 2011. Aging-related alterations in the expression and distribution of GluR2 and PICK1 in the rat hippocampus. *Neuroscience letters*. 497:42-45.
- Zhang, G., B.M. Ueberheide, S. Waldemarson, S. Myung, K. Molloy, J. Eriksson, B.T. Chait, T.A. Neubert, and D. Fenyö. 2010. Protein Quantitation Using Mass Spectrometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 673:211-222.
- Zhang, P., and J.E. Lisman. 2012. Activity-dependent regulation of synaptic strength by PSD-95 in CA1 neurons. *Journal of neurophysiology*. 107:1058-1066.

- Zhao, X., R. Rosenke, D. Kronemann, B. Brim, S.R. Das, A.W. Dunah, and K.R. Magnusson. 2009. The effects of aging on N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the synaptic membrane and relationships to long-term spatial memory. *Neuroscience*. 162:933-945.
- Zhou, Q., M. Xiao, and R.A. Nicoll. 2001. Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:1261-1266.