

## Modifications morphologiques associées à la plasticité synaptique

TONI, Nicolas

### Abstract

Dans l'hippocampe, la potentiation à long terme (LTP), une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique, est une forme de plasticité synaptique considérée comme un modèle physiologique d'apprentissage et de mémorisation. Dans cette étude, nous avons testé l'hypothèse qu'une modification morphologique des synapses activées puisse contribuer au maintien à long terme de la potentiation. Ce travail a été réalisé à l'aide de différentes techniques de microscopie électronique à transmission. Les résultats montrent que l'induction de la LTP est suivie, après environ 30 minutes, par d'importants remodelages des membranes postsynaptiques aboutissant à un élargissement et un fractionnement de la zone de transmission synaptique. Cet effet est transitoire et est suivi, environ 60 minutes après induction de la LTP, par le dédoublement des synapses activées. Une telle synaptogenèse spécifique aux sites activés pourrait contribuer au maintien à long terme de la LTP.

### Reference

TONI, Nicolas. *Modifications morphologiques associées à la plasticité synaptique*.  
Thèse de doctorat : Univ. Genève, 2000, no. Sc. 3203

DOI : [10.13097/archive-ouverte/unige:552](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:552)

Available at:

<http://archive-ouverte.unige.ch/unige:552>

Disclaimer: layout of this document may differ from the published version.



UNIVERSITÉ  
DE GENÈVE

UNIVERSITE DE GENEVE

Section de zoologie et biologie animale

Département de pharmacologie

FACULTE DES SCIENCES

Professeur J.-L. BENY

FACULTE DE MEDECINE

Professeur D.MULLER

---

**MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES ASSOCIEES A LA  
PLASTICITE SYNAPTIQUE**

**THESE**

présentée à la faculté des Sciences de l'Université de Genève  
pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences, mention biologique

Par

**Nicolas TONI**  
de  
Commugny (VD)

Thèse No

Genève

2000

# TABLE DES MATIERES

	Page
▪ <b>INTRODUCTION</b>	1
▪ <b>ANATOMIE DE L'HIPPOCAMPE</b>	1
▪ <b>STRUCTURE INTERNE</b>	2
▪ <b>CONNECTIVITE</b>	6
▪ <b>Afférences internes</b>	6
▪ <b>Afférences externes</b>	6
▪ <b>Efférences hippocampales</b>	8
▪ <b>FONCTION DE L'HIPPOCAMPE</b>	10
▪ <b>LE GLUTAMATE</b>	10
▪ <b>RECEPTEURS IONOTROPIQUES</b>	11
▪ <b>Le récepteur Kainate</b>	11
▪ <b>Le récepteur AMPA</b>	12
▪ <b>Le récepteur NMDA</b>	12
▪ <b>RECEPTEURS METABOTROPIQUES</b>	13
▪ <b>LA PLASTICITE SYNAPTIQUE</b>	14
▪ <b>Mécanismes de la LTP</b>	17
▪ <b>LA SYNAPSE</b>	20
▪ <b>LES EPINES DENDRITIQUES</b>	21
▪ <b>Structure fine</b>	21
▪ <b>Composants moléculaires</b>	23
▪ <b>Différents types d'épines</b>	26
▪ <b>Rôle des épines et de leur diversité</b>	28
▪ <b>Modifications de la structure des épines</b>	29
▪ <i>Modifications liées au développement et à l'âge</i>	29
▪ <i>Modifications liées à l'état hormonal</i>	30
▪ <i>Modifications liées à l'activité</i>	31

▪ <i>Modifications liées à l'expérience</i>	33
▪ <i>Modifications liées à la LTP</i>	34
▪ <b>RESULTATS</b>	37
▪ OBJECTIFS ET RESUME DE CE TRAVAIL	37
▪ PARTIE 1 : LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite.	39
▪ <b>ABSTRACT</b>	40
▪ <b>RESULTS</b>	41
▪ <b>METHODS</b>	44
▪ <b>FIGURES</b>	46
▪ PARTIE 2 : Remodeling of synaptic membranes following LTP induction.	50
▪ <b>ABSTRACT</b>	51
▪ <b>INTRODUCTION</b>	52
▪ <b>RESULTS</b>	53
▪ <b>DISCUSSION</b>	56
▪ <b>MATERIALS AND METHODS</b>	59
▪ <b>FIGURES</b>	60
▪ <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	66
▪ <b>BIBLIOGRAPHIE</b>	70
▪ BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE	70
▪ REFERENCES	71

## Remerciements

Je tiens à adresser ici mes synapses les plus chaleureuses aux différentes personnes qui, de près ou de loin, ont participé, collaboré, encouragé, conseillé, parrainé ou dirigé le présent travail.

A commencer par Dominique Muller, dit le Zidane des neurones, qui m'a accueilli dans son équipe pendant de si longues années et transmis ses connaissances et son enthousiasme si caractéristiques pour l'éthologie synaptique. Pour ta disponibilité aussi, ta patience et ton esprit didactique dont la réputation n'est plus à faire et qui m'ont été si précieux.

A Yves Dunant, le grand manitou, pour m'avoir accueilli dans son grand tipi de la pharmacologie et passé avec moi de nombreux pow-wow à causer, critiquer, questionner et se creuser, toujours dans la bonne humeur.

A Michel Shorderet et Joseph Kiss, pour avoir parrainé le présent travail. Pour leur disponibilité et leurs conseils toujours judicieux.

A Pierre-Alain Buchs, dit Calcium man, pour avoir développé cette superbe technique de microscopie électronique permettant la visualisation du calcium, point de départ de ce projet. Pour ton aide, tes conseils et ton enseignement aussi, dispensés avec la patience et la clarté qui te caractérisent.

A Lorena Parisi, la magicienne aux doigts de fée, qui couperait une synapse en dix, les yeux fermés et par une nuit orageuse. Pour ton enseignement, ton soutien, ta collaboration et ta disponibilité, mais aussi et surtout pour ton sourire et ton amitié.

A Marlyse Moosmayer, l'autre magicienne aux doigts de fée, qui d'un coup de baguette magique, fixe, déshydrate et enrobe tout ce qui peut contenir des synapses. Pour ton soutien et ton savoir faire si précieux.

A Fred Pillonel, l'homme qui tire plus vite que son ombre. Pour les milliers de photos, mais aussi pour ton humour et ta philosophie, entre un agrandissement et un virage.

A Patrick Sors, Philippe Henchoz et Tino, pour leur assistance technique auprès de cet instrument si capricieux qu'est le microscope électronique.

A mes collègues et amis, pour avoir partagé avec moi bureau, bench, publis, mars, biscuits, mousse au choc, rêves de montagne et de voyage, montagne, voyages, photos, souvenirs, congrès, chambre d'hôtel à Miami ou Los Angeles (voire lit), spice boys, rires, amitié, bref tout ce qui fait que la science est bien plus que de la science.

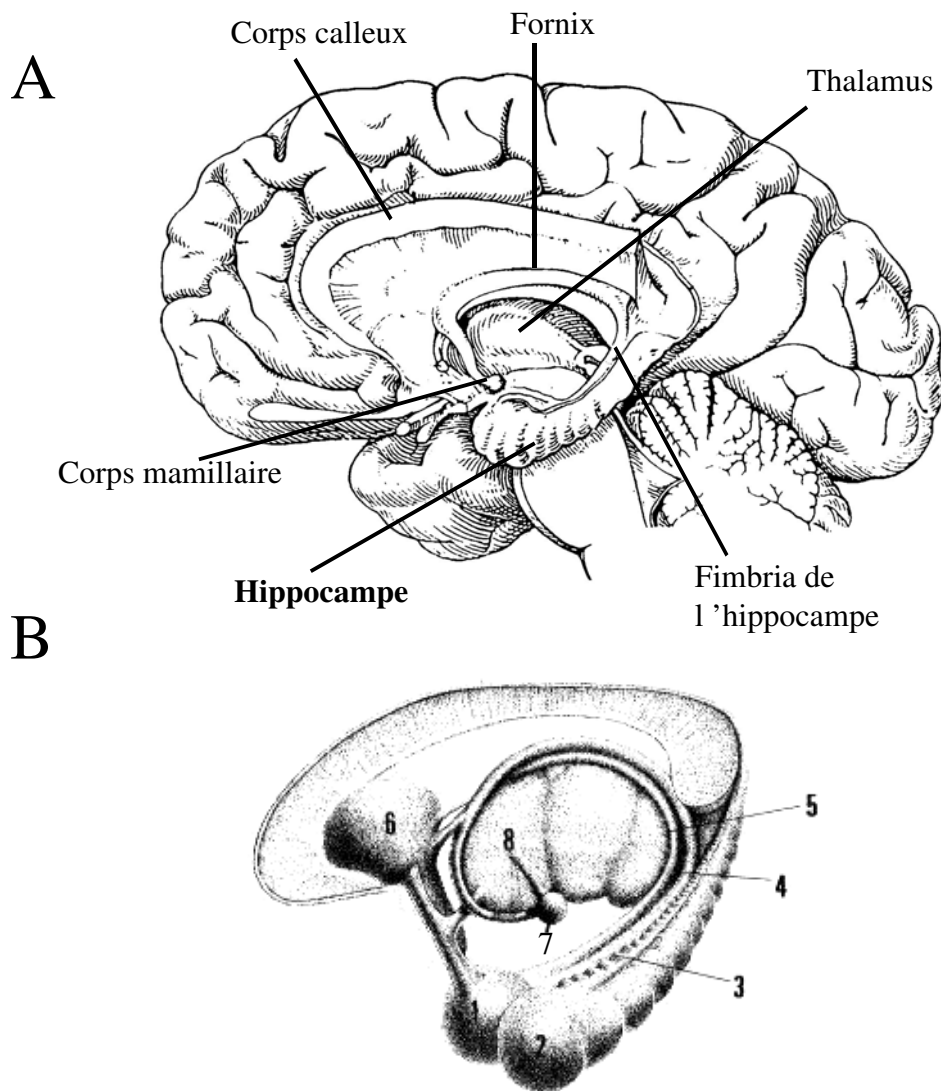
A mes parents, à qui je dédie ce manuscrit, pour leur soutien constant et sans limites, tant au niveau moral et affectif, que culinaire, logistique, technologique, humoristique, ...

A toi enfin, ô lecteur, d'avoir bien voulu prendre un peu de ton précieux temps pour poser ton regard sur le présent travail qui est le résumé de 6 années passionnantes de ma vie de synapsologue.

# **INTRODUCTION**

## ANATOMIE DE L'HIPPOCAMPE

Chez les mammifères supérieurs, l'hippocampe est une petite structure sous-corticale enroulée sur elle-même et occupant la face médiane du lobe temporal (figure 1A). Situé légèrement en profondeur et saillant dans le ventricule latéral, il est recouvert en grande partie par la circonvolution parahippocampale à laquelle il est relié par le subiculum et le cortex entorhinal. Attaché à la face dorsale de l'hippocampe se trouve un ruban épais de fibres, la fimbria de l'hippocampe, qui constitue le fornix et se termine au niveau du corps mamillaire. Connectées à l'amygdale, au septum et au thalamus, ces structures constituent les éléments principaux du système limbique, jouant un rôle fondamental dans l'apprentissage et les émotions (figure 1B).

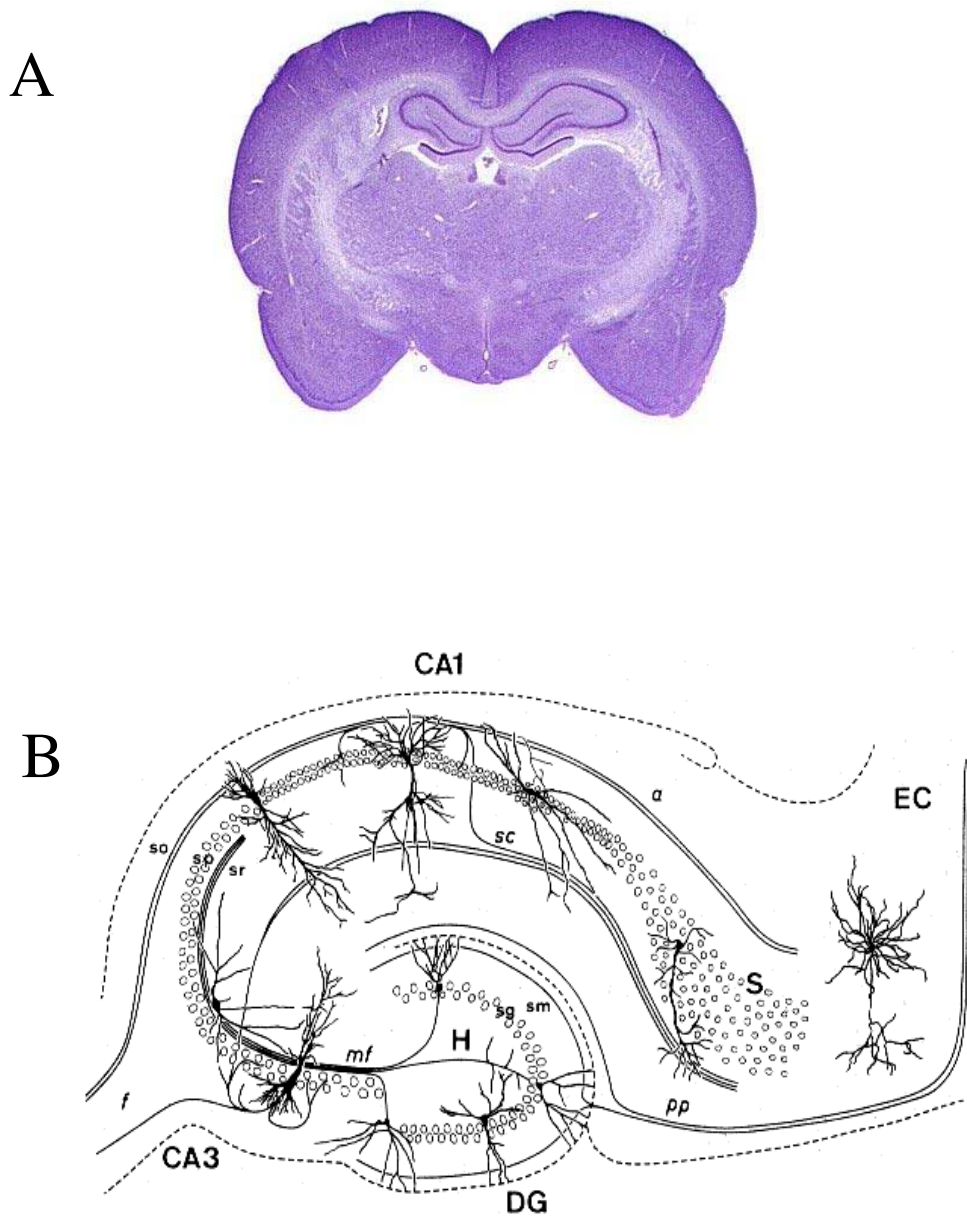


**Figure 1 A :** *Hippocampe humain après ablation de l'hémisphère gauche*  
**B :** *Le système limbique : 1. Amygdale 2. Hippocampe 3. Fimbria 4. Fornix 5. Strie terminale 6. Septum 7. Corps mamillaire 8. Thalamus*

## STRUCTURE INTERNE

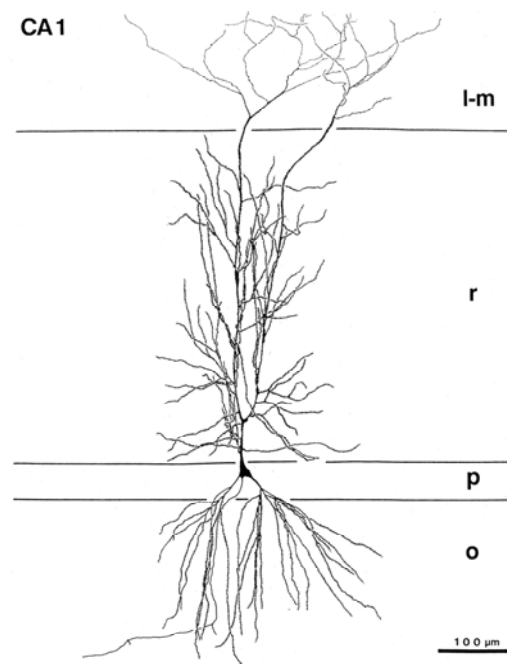
En coupe transversale, on peut observer que l'hippocampe est formé de deux structures en forme de U inversés (figure 2), le **gyrus denté** et la **corne d'Ammon** (Cajal 1911, Lorente de No 1934 ). Sur la base de différences morphologiques et de ses connexions synaptiques, la corne d'Ammon est encore subdivisée en trois parties : CA3, CA2 et CA1. Au lieu des 6 couches cellulaires principales du néocortex, l'hippocampe en contient 5 : *L'alveus*, contenant les axones des cellules pyramidales dirigées vers la *fimbria* ou le *subiculum*, le *stratum oriens*, situé entre l'*alveus* et les cellules pyramidales et contenant les dendrites basales de ces dernières, ainsi que des cellules en corbeille et quelques afférences du septum. Le *stratum pyramidale*, contient les corps cellulaires des cellules pyramidales de la corne d'Ammon et les *stratum radiatum* et *stratum lacunosum/moleculare* en contiennent les segments respectivement proximaux et distaux de l'arbre dendritique apical. Dans le CA3, une couche supplémentaire est reconnue : le *stratum lucidum*, situé entre les *stratum pyramidale* et *stratum radiatum*, recevant les fibres moussues des cellules granulaires. Dans le gyrus denté, par contre, on distingue 3 couches : le *stratum granulosum*, contenant les corps cellulaires des cellules granulaires, la **couche moléculaire**, formée par les dendrites apicales des cellules granulaires et leurs afférences et enfin la **couche polymorphique**, formée par les segments initiaux des axones des cellules granulaires alors qu'elles se rassemblent pour donner naissance aux fibres moussues, ainsi que par quelques cellules en corbeille.





**Figure 2** : **A** : Coupe transversale de cerveau de rat au niveau des hippocampes (coloration de Nissl). **B** : Structure interne de l'hippocampe. **DG** : Gyrus denté, **CA** : corne d'Ammon, **EC** : Cortex entorhinal, **pp** : voie perforante, **sm** ou **l-m** : stratum moleculare, **sg** : stratum granulosum, **mf** : fibres moussues, **so** : stratum oriens, **sp** : stratum pyramidale, **sr** : stratum radiatum, **sc** : collatérales de Shaffer, **S** : subiculum, **H** : hile.

Différents types de cellules sont présents dans l'hippocampe, comme dans la majorité du système nerveux central. Les cellules ayant la plus évidente importance physiologique sont les **neurones pyramidaux**, appelés ainsi à cause de leur forme (figure 3). Ce sont des neurones excitateurs glutamatergiques. Ils constituent la majeure partie des cellules du *stratum pyramidale* de la corne d'Ammon et sont également majoritaires dans diverses régions corticales. Comme nous le verrons plus tard, ils sont en contact avec diverses cellules de l'hippocampe et du cortex. Ces cellules peuvent avoir un diamètre variable. En effet, les neurones pyramidaux du CA3-CA2 sont nettement plus larges et moins condensés que dans le CA1. Dans le gyrus denté, les neurones principaux sont les **cellules granulaires**. Plus petites et de forme arrondie, elles ne comportent pas de dendrites basales. Les cellules granulaires envoient leurs projections axonales, appelées les fibres moussues, vers le *stratum radiatum* du CA3.



**Figure 3 :** Neurone pyramidal du CA1 et les différentes couches de l'hippocampe qu'il recouvre. *l-m* : Stratum lacunosum-moleculare, *r* : stratum radiatum, *p* : stratum pyramidale, *o* : stratum oriens. Tiré de Ishizuka et al. 1995.

Environ 12% des neurones hippocampaux sont des cellules dites non-pyramidales (Caeser et al. 1991), c'est à dire n'appartenant ni à la classe des cellules pyramidales, ni aux cellules granulaires. Leur classification est basée sur la localisation et l'apparence de ces cellules, la principale caractéristique morphologique étant que leurs dendrites n'ont pas de processus spinaux. De plus, leur noyau contient des bâtonnets et est entouré d'une membrane nucléaire largement invaginée. On distingue 5 types de cellules non-pyramidales : les **cellules en corbeille**, situées dans le *stratum oriens*, les **neurones fusiformes**, dans la région du hile, les **cellules en corbeille de type pyramidal**, dans le *stratum granulosum* du gyrus denté, les **cellules bipolaires et multipolaires**, principalement situées dans le *stratum pyramidale*. L'axone des cellules non-pyramidales ne suit pas les voies des fibres intrinsèques et leurs ramifications sont clairement différentes de celles des cellules pyramidales et granulaires. La plupart des cellules non-pyramidales ont été décrites comme des interneurons utilisant le GABA comme neurotransmetteur principal et donc exerçant une action inhibitrice sur les réseaux avoisinants. Plusieurs de ces interneurons pourraient également contenir des neuropeptides comme la cholécystokinine (Greenwood et al. 1981), le VIP (Loren et al. 1979) ou encore la substance P (Vincent et al. 1981). Signalons également la présence transitoire de neurones non-pyramidaux appelés **cellules de Cajal-Retzius**. Encore largement méconnues, ces cellules joueraient un rôle dans l'établissement des premières connexions synaptiques de l'hippocampe avec le cortex entorhinal ainsi que dans la migration neuronale (Del Rio et al. 1997). In vivo, ces cellules disparaissent après environ 3 semaines ou donnent lieu à d'autres cellules non-pyramidales. Certains exemplaires ont néanmoins été retrouvés dans l'hippocampe de patients atteints d'épilepsies du lobe temporal, où elles pourraient participer aux processus de remodelage liés à la lésion (Super et al. 1997).

Quatre types de cellules gliales ont été décrits dans l'hippocampe : les **astrocytes**, qui représentent environ 75% des cellules non-neuronales (Beach et al. 1982), sont identifiés par la présence de glycogène et d'une protéine, le GFAP (glial fibrillary acid protein) ainsi que par leur morphologie caractéristique : les astrocytes de type I sont des astrocytes fibreux, qui montrent une morphologie de type neuronal par leurs prolongements fins et irréguliers. Les astrocytes de type II sont plus compacts, larges et plats et présentent un cytoplasme plus clair en microscopie électronique. Les astrocytes sont en contact avec les vaisseaux sanguins par leurs filopodes et participent ainsi à la constitution de la barrière hémato-encéphalique. On pense qu'ils jouent également un rôle important dans la nutrition des neurones. Les **oligodendrocytes** sont de larges cellules avec de longues et fines excroissances excessivement ramifiées. Ils sont impliqués dans la myélinisation des plus grosses fibres axonales. La **microglie**, largement mobile, impliquée dans la phagocytose d'éventuels déchets cellulaires. Les **fibroblastes**, cellules de soutien larges et plates, sans excroissance.

## CONNECTIVITE

### Afférences internes

Les principaux neurones de l'hippocampe et du cortex entorhinal sont interconnectés de manière relativement régulière et organisée. Au début des années 1970, il a été proposé que les principales voies excitatrices de l'hippocampe étaient organisées de manière lamellaire le long de 4 groupes de neurones et perpendiculairement à l'axe principal de l'hippocampe (Andersen et al. 1971). Bien que cette organisation lamellaire ne soit que partielle et que des connexions excitatrices et inhibitrices transverses puissent jouer un rôle fonctionnel important, il semble que d'étroites bandes de cortex hippocampal puissent opérer comme des unités fonctionnelles indépendantes. Cette particularité fait de l'hippocampe un modèle intéressant pour des études fonctionnelles in vitro, sur des tranches fraîchement disséquées comme sur des cultures organotypiques (figure 4A).

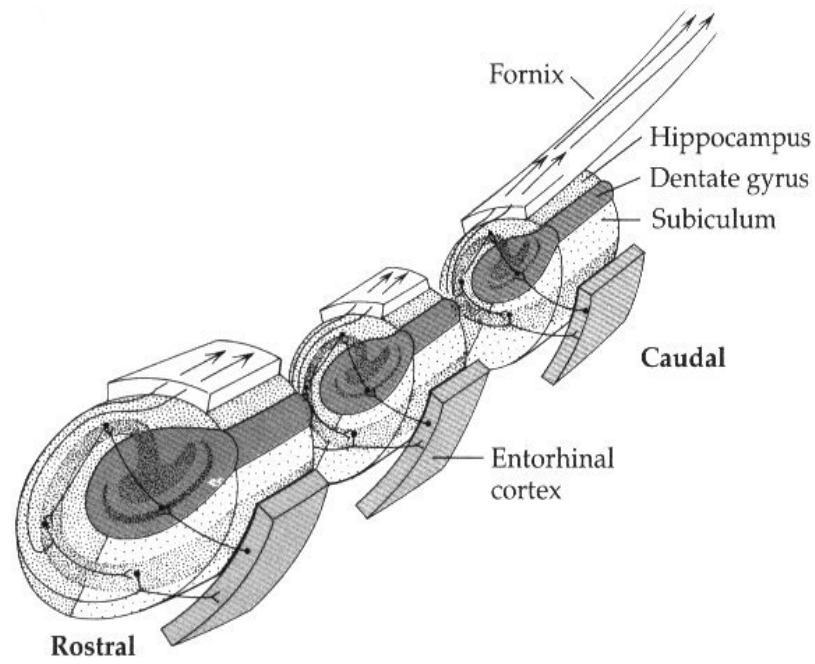
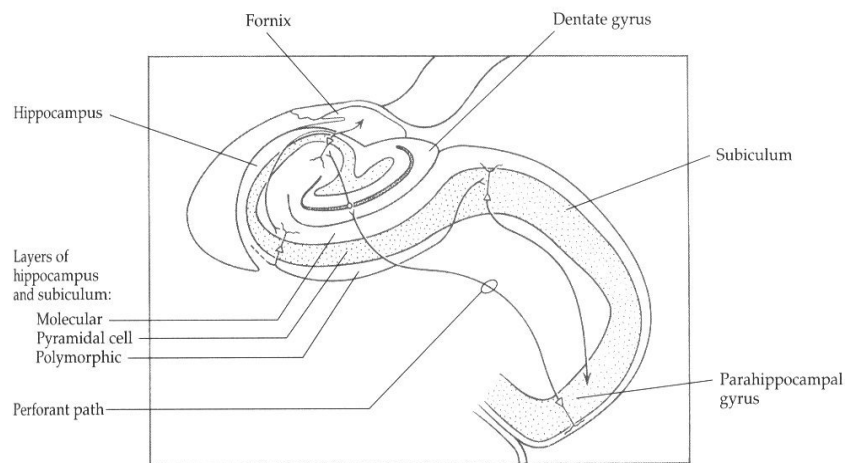
Le flux d'informations à travers l'hippocampe est unidirectionnel. Le circuit le plus simple est constitué d'une voie principale excitatrice trisynaptique mettant en jeu 4 groupes de neurones : les cellules pyramidales du cortex entorhinal envoient leurs axones, formant la **voie perforante**, vers le gyrus denté pour contacter les cellules granulaires. Les axones des cellules granulaires, les **fibres moussues**, contactent les cellules pyramidales du CA3 qui, à leur tour, envoient des axones, appelés les **collatérales de Schaffer**, à travers le stratum pyramidale vers l'aire du CA1. Ces derniers neurones envoient leurs projections hors de l'hippocampe, vers le subiculum qui contacte en retour le cortex entorhinal, formant ainsi une boucle anatomique. Outre cette voie trisynaptique, d'autres régions de l'hippocampe sont également contactées par le cortex entorhinal, telles que le CA1 et le CA3, ainsi que le subiculum.

### Afférences externes

L'hippocampe reçoit des afférences de 4 régions principales : l'hippocampe controlatéral, le cortex entorhinal, l'aire du septum médian et différents sites du tronc cérébral.

Les afférences commissurales, comme on appelle les différentes connexions entre l'hippocampe gauche et l'hippocampe droit, se font par l'intermédiaire de fibres courant le long de la fimbria. Il existe une certaine spécificité homotopique des connexions entre les deux sites : le CA3 projette vers le CA3, le CA1 antérieur vers le CA1 antérieur, le CA1 postérieur, par contre, ainsi que le gyrus denté, reçoivent des afférences non-homotopiques du CA3.

Les afférences émanant du cortex entorhinal font principalement partie de la voie perforante (figure 4B). Cette dernière est issue du cortex entorhinal latéral, traverse le subiculum puis pénètre soit directement dans la corne d'Ammon ou perfore la fissure hippocampale vers le gyrus denté. Une faible proportion des afférences entorhinales sont controlatérales. Ces connexions sont organisées de manière topographique. En effet, une cellule granulaire est contactée à des niveaux différents de son arborisation dendritique selon l'origine des afférences. Elle peut ainsi déterminer d'où vient son afférence selon quelle portion de son arborisation dendritique est connectée. Le cortex entorhinal reçoit des informations de différentes aires corticales : du cortex préfrontal et de la circonvolution du cingulum, du présubiculum, du cortex temporal, des aires pariétales, du cortex pyriforme, des systèmes sensoriels visuel et olfactif, bien que l'importance de cette dernière diminue

**A****B**

**Figure 4 :** Organisation lamellaire de l'hippocampe (A) et ses principales afférences (B).  
Tiré de Zigmond et al. 1999.

avec le développement phylogénétique. Enfin, l'amygdale projette vers le cortex entorhinal et le subiculum. Toutes ces sources d'informations sont très spécifiques topographiquement. Ainsi, le cortex prépyriforme contacte l'aire latérale du cortex entorhinal, de même que le cortex orbito-frontal. Le cortex entorhinal peut donc être considéré comme un centre de convergence de modalités sensorielles provenant de différentes aires associatives du néocortex.

Les afférences du tronc cérébral émanent de différentes aires : le noyau médian du Raphé, sérotoninergique, exerce une action inhibitrice sur les cellules pyramidales du CA1, du CA3 et du gyrus denté qu'il contacte via la fimbria. Le locus coeruleus, noradrénergique, influence de manière inhibitrice les zones du stratum lacunosum moléculaire des CA1, CA3 et denté qu'il contacte via le cortex retrosplénial.

Les afférences du septum médian, cholinergique, se feraient vraisemblablement via la fimbria et le fornix. Elles connectent les neurones pyramidaux et les interneurons des stratum oriens et radiatum de la corne d'Ammon et du gyrus denté. Ces afférences pourraient être responsables de la genèse du rythme thêta.

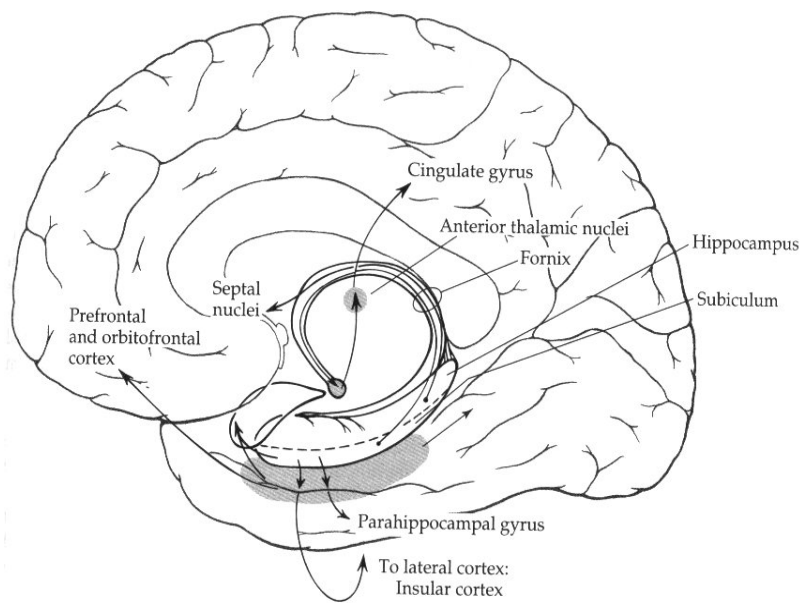
Une telle variété des afférences hippocampales suggère que l'hippocampe n'est pas concerné spécifiquement par les informations émanant d'une modalité sensorielle particulière, mais plutôt par des informations hautement analysées, extraites de toutes les modalités.

### **Efférences hippocampales**

La principale voie efférente de l'hippocampe est le fornix (figure 4A, 5). Les neurones pyramidaux concentrent leurs axones dans ce faisceau qui projette vers d'autres structures du télencéphale et du diencephale telles que le noyau accumbens, la formation réticulée, l'aire préoptique, le tronc cérébral. Une telle efférence est représentée par le circuit de Papez : il part du subiculum pour contacter les corps mamillaires de l'hypothalamus, qui connectent le thalamus, puis la circonvolution du cingulum. Cette dernière fournit des informations au cortex entorhinal qui contacte en retour l'hippocampe. Cette boucle anatomique est un élément majeur, avec l'amygdale, du système limbique décrit par Pierre Paul Broca au 19<sup>ème</sup> siècle comme jouant un rôle important dans les émotions et la mémoire. L'hippocampe contacte également le septum, qui renvoie des projections GABAergiques et cholinergiques sur la formation hippocampale et est supposé jouer un rôle régulateur de l'hippocampe dans certains comportements tels que la reproduction ou la nutrition.

Une autre voie efférente de l'hippocampe part du subiculum qui projette vers le cortex entorhinal qui, à son tour, contacte différentes aires associatives du néocortex telles que le cortex préfrontal, le cortex orbitofrontal, la circonvolution parahippocampale et la circonvolution du cingulum.

Comme on le voit, l'hippocampe se trouve à un carrefour lui donnant accès à des informations spécialisées provenant de différentes modalités sensorielles. Il pourrait ainsi être impliqué dans l'organisation, le triage et la synthèse de ces informations pour influencer en retour des phénomènes endocriniens, viscéraux, moteurs, affectifs et cognitifs. De plus, la force des connections synaptiques dans une partie de ces différents circuits peut être modifiée par l'activité neuronale, indiquant les capacités adaptatives du système. Toutefois, nous ne savons pas encore quelles informations sont modifiées, dans quelle mesure et de quelle manière cette plasticité synaptique aide l'hippocampe à consolider la mémoire à court terme en mémoire à long terme.



**Figure 5 :** Principales voies efférentes de l'hippocampe. Tiré de Zigmond et al. 1999.

## **FONCTION DE L'HIPPOCAMPE**

Les anatomistes du début du siècle dernier ont identifié un homologue de l'hippocampe des mammifères dans tous les vertébrés jusqu'au plus primitif d'entre eux, le cyclostome, bien qu'il ne garde pas la même structure dans ces différents organismes. Son rôle varie également selon les espèces, mais il est généralement impliqué dans les processus de mémorisation tels que la mémoire spatiale chez le rat, la mémoire olfactive chez les reptiles ou sémantique chez l'être humain.

Les premières données importantes concernant la fonction de l'hippocampe chez l'être humain sont apparues grâce à l'observation de patients ayant subi des atteintes du cortex hippocampal. Au cours du 19<sup>ème</sup> siècle, un neuroanatomiste Allemand, Alois Alzheimer, reconnut des modifications morphologiques spécifiquement associées à une forme de démence amnésique. Ces changements étaient les plus notables dans l'hippocampe. Plus tard, vers 1950, les études d'un patient appelé H.M., de l'institut neurologique de Montréal, aboutirent à des observations intéressantes. Souffrant d'une grave épilepsie incurable, H.M. a subi à l'âge de 27 ans une ablation bilatérale des lobes temporaux. Les conséquences de cette ablation furent dramatiques : depuis lors, H.M. souffre d'une très sévère amnésie antérograde. Bien que ses capacités intellectuelles au-dessus de la moyenne ainsi que ses souvenirs antérieurs à l'intervention soient restés intacts, le patient souffre d'une incapacité à retenir de nouvelles informations. De plus, certaines tâches d'apprentissage sont elles aussi restées intactes, telles qu'apprendre à recopier un dessin en regardant sa main dans un miroir alors qu'il ne se souvient pas quand il a appris de tels gestes, ni même d'avoir passé ce test.

Il semble ainsi que l'hippocampe, bien qu'il ne soit pas le siège des souvenirs, joue un rôle critique dans leur formation et plus précisément dans la mémoire des événements, dite mémoire explicite ou déclarative, par opposition à la mémoire de savoir-faire, appelée mémoire implicite ou procédurale, qui dépend d'autres structures du cerveau telles que les ganglions de la base.

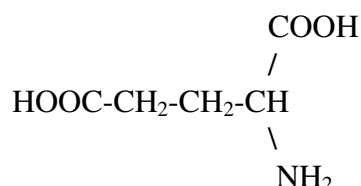
## **LE GLUTAMATE**

Dans le courant des années 1960, les travaux de Curtis (Curtis 1960) démontrèrent pour la première fois que certains acides aminés tels que l'aspartate et le glutamate (fig. 6A) pouvaient exercer un rôle excitateur sur des neurones de la moelle épinière. Il a ensuite été démontré que l'un d'entre eux, le glutamate, était le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central (Fonnum et al. 1984). Cet acide aminé répond en effet aux critères de neurotransmetteur : il est localisé dans les vésicules synaptiques (Storm-Mathisen et al. 1979, 1983), une stimulation électrique provoque sa libération de manière calcium-dépendante (Malthe-Sorensen et al. 1979), il existe une recapture à haute affinité du glutamate au niveau des terminaisons nerveuses (Storm-Mathisen et al. 1975) et il produit une dépolarisation des neurones postsynaptiques en application locale (Dudar et al. 1974, Schwartzkroin et al. 1975). Dans l'hippocampe, il est responsable de la transmission entre les collatérales de Schaffer et les dendrites des cellules pyramidales du CA1, comme le montrent de nombreuses études immunohistochimiques et pharmacologiques (Racca et al. 2000, Hollmann et al. 1994, Takumi et al. 1999).



Comme pour d'autres acides aminés tels que le L-aspartate, le L-homocystéate et la L-cystéine sulphinatée, l'effet dépolarisant du glutamate est rapide, ce qui suggère qu'il agit sur des récepteurs-canaux. En fait, le glutamate agit sur 2 groupes de récepteurs (fig. 6B) : les récepteurs ionotropiques, qui sont des canaux ioniques dont l'ouverture dépend de la liaison du ligand et les récepteurs métabotropiques, qui sont couplés à une protéine G et une cascade de messagers secondaires.

**A**



**B**

	Agonistes (outre le glutamate)	Antagonistes
NMDA	NMDA, Quisqualate	MK801, PCP, AP5, AP7
AMPA	AMPA, Quisqualate, Kainate	CNQX, NBQX
Kainate	Kainate, Quisqualate, Acide domoïque	CNQX, NBQX
Métabotrope	Quisqualate, tACPD	L-AP3/4

**Figure 6** : **A** : Structure du glutamate. Sa synthèse s'effectue à partir du glucose par le cycle de Krebs, à l'aide de la glutamate déshydrogénase. **B** : Agonistes et antagonistes sélectifs des récepteurs au glutamate. NMDA : N-méthyl-D-aspartate. AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalone-propionate.

## RECEPTEURS IONOTROPIQUES

Les récepteurs ionotropiques sont classés selon leur sensibilité sélective aux agonistes et antagonistes des acides aminés excitateurs (fig. 6B), leur sensibilité au voltage et leur distribution et ils sont désignés selon le nom de leur agoniste principal. Ainsi trois classes principales de récepteurs-canaux sensibles au glutamate ont été décrites et sont colocalisées sur les mêmes synapses : les récepteurs NMDA (activé par le N-méthyl-D-aspartate), AMPA (activés par le  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate) et Kainate.

### Le récepteur Kainate

est associé à un canal perméable au potassium, au sodium et au calcium. Il contient deux sites de liaison au kainate, d'affinité différente. Il n'existe pas encore d'antagoniste sélectif pour ce récepteur et de plus le récepteur AMPA montre également une faible affinité pour le kainate, ce qui explique que ces deux récepteurs ont longtemps été confondus et que le récepteur kainate est encore relativement peu connu. 5 sous-unités ont cependant été clonées : 3 sous-unités de faible affinité pour le Kainate, GluR5-7 et 2 sous-unités de plus forte affinité pour l'agoniste, KA1-2. Il semble qu'elles soient réparties préférentiellement au niveau présynaptique, dans les

fibres moussues par exemple, où elles joueraient un rôle modulateur de la libération du glutamate. Le récepteur kaïnate se retrouve également en forte concentration dans les cellules pyramidales du CA3. Sa fonction exacte reste toutefois encore assez floue : aucune des sous-unités KA1 ou KA2 ne peuvent former de canal fonctionnel. Par contre la sous-unité KA2 semble pouvoir s'associer avec la sous-unité GluR6 pour former un récepteur fonctionnel sensible à l'AMPA alors qu'aucune des deux sous-unités seule ne puisse répondre à cet agoniste (Herb et al. 1992).

### **Le récepteur AMPA**

est associé à un canal perméable principalement aux ions sodium et potassium et est responsable de la transmission synaptique rapide (Mayer et al. 1987, Ascher et al. 1988). Le récepteur serait pentamérique et 4 sous-unités différentes ont été clonées et nommées GluR1-4, qui peuvent se combiner pour former des récepteurs qui pourraient avoir, selon leur composition, des propriétés fonctionnelles différentes. De plus, chacune de ces sous-unités peut exister sous deux formes moléculaires qui diffèrent au niveau d'une région C-terminale : les formes flip et flop, qui sont le résultat d'un épissage alternatif (Sommer et al. 1990). Ces deux formes diffèrent par le taux de désensibilisation au glutamate ainsi que par les amplitudes des courants ainsi activés, mais pas dans leurs propriétés de liaison. Le passage d'une forme à l'autre pourrait constituer un système de régulation postsynaptique des réponses au glutamate et jouer un rôle dans la plasticité synaptique. Notons toutefois que les cellules pyramidales du CA1 de l'hippocampe expriment principalement la forme flop, la plus désensibilisante.

Il a été récemment démontré que les sous-unités du récepteur AMPA ne contiennent pas 4 domaines transmembranaires comme longtemps imaginé, mais uniquement 3 plus un domaine fixé sur la face intracellulaire de la membrane (Wo et al. 1995). Les sites de liaison pour les agonistes se trouvent dans le domaine extracellulaire N-terminal et au niveau intracellulaire seraient placés 3 sites de phosphorylation par la protéine kinase A (Greengard et al. 1991, Raymond et al. 1993), un site pour la protéine kinase C (Tan et al. 1994), ainsi qu'un site pour la protéine kinase calcium-calmoduline-dépendante (CamKII) (Barria et al. 1997, Yakel et al. 1995), qui permettent également de moduler la fonction du récepteur.

### **Le récepteur NMDA**

contient un canal perméable aux ions potassium, sodium et calcium et est responsable de la phase tardive du potentiel postsynaptique exciteur. Outre le site de liaison principal aux agonistes, ce récepteur contient également un site allostérique qui lie la glycine laquelle potentialise l'effet du glutamate (Forsythe et al. 1988). L'activation de ce site est nécessaire au fonctionnement du récepteur NMDA. A l'intérieur du canal, deux sites peuvent bloquer l'influx ionique : un site cationique voltage-dépendant, fixant l'ion magnésium et un site de liaison fixant des médicaments psychotropes ou des antagonistes non-compétitifs (TCP, PCP, MK801) (Wong et al. 1991). Il existe 5 sous-unités du récepteur NMDA. La sous-unité NMDA-R1, qui a 8 variants issus d'un épissage différentiel et ayant chacun une fonction différente et les sous-unités NMDA-R2a, b, c, d. Le récepteur NMDA serait pentamérique et doit contenir au moins une sous-unité NMDA-R1 pour être fonctionnel. Chaque sous-unité serait vraisemblablement constituée de 4 domaines transmembranaires, mais on envisage actuellement qu'elles puissent avoir la même configuration que les sous-unités du récepteur AMPA. Le domaine intracellulaire possède des sites de

phosphorylation pour les protéines kinases C, CamKII et tyrosine kinase qui pourraient moduler l'excitabilité de ce récepteur (Bading et al. 1991, Moss et al. 1993, Kitamura et al. 1993, Wang et al. 1994).

Au repos, le récepteur NMDA participe peu à la transmission synaptique, le canal étant bloqué par la présence d'ions magnésium. Ce blocage est sensible au voltage et une dépolarisation membranaire permet d'enlever le bouchon magnésique et d'ouvrir le canal NMDA. Ce mécanisme, suivi de l'augmentation postsynaptique du calcium et l'activation consécutive de messagers secondaires, joue un rôle fondamental dans l'expression de divers mécanismes de développement (Kleckner et al. 1991), de neurotoxicité (Nadler et al. 1981, Rothman et al. 1987, Meldrum et al. 1990) ou encore de plasticité synaptique (Collingridge et al. 1987, Larson et al. 1988).

Dans le CA1 de l'hippocampe, il semble que les récepteurs AMPA ne soient exprimés que dans 75 % des synapses alors que les récepteurs NMDA le sont dans près de 100 % des synapses (Takumi et al. 1999). Dans une configuration où les deux types de récepteurs sont exprimés, seule une activation assez forte des récepteurs AMPA permet une dépolarisation suffisante pour supprimer le bloc magnésique des canaux NMDA. Toutefois, 25 % des synapses de l'hippocampe adulte n'expriment que des récepteurs NMDA. Bien qu'il semble que le bloc magnésique ne soit que partiel et donc qu'une proportion de canaux NMDA puissent être réactifs au glutamate, cette proportion est vraisemblablement trop faible pour permettre à la transmission synaptique de s'effectuer. De telles synapses sont alors considérées comme inactives ou silencieuses (Liao et al. 1995, Isaac et al. 1995). Il est apparu récemment que des synapses néoformées sont principalement de type silencieux et que la maturation de telles synapses implique l'expression des récepteurs AMPA (Petralia et al. 1999, Liao et al. 1999, Gomperts et al. 1998).

## **RECEPTEURS METABOTROPIQUES**

Ce récepteur est formé de 7 domaines transmembranaires, d'un domaine intracellulaire et d'un domaine extracellulaire. Il existe au moins 8 récepteurs metabotropiques différents nommés mGluR1-8. Pour tous, la liaison du ligand provoque un changement de la conformation du récepteur et l'activation d'une protéine G. Les récepteurs mGluR1 et 5 sont couplés à une phospholipase-C, qui induit la transformation de phospholipides membranaires en phosphatidyl inositol triphosphate (IP3) et diacyl glycérol (DAG). L'augmentation de IP3 provoque la libération de calcium des stocks intracellulaires et donc une augmentation rapide de la concentration du calcium cytosolique, alors que la production du DAG entraîne l'activation de la protéine kinase C. Les 6 autres récepteurs sont bien moins connus, mais ils pourraient provoquer une réduction de la production de cAMP en activant une protéine G inhibitrice.

Le rôle des récepteurs metabotropiques est encore peu connu et dépendrait de leur localisation, présynaptique ou postsynaptique, et des protéines G auxquelles ils sont couplés. Les récepteurs présynaptiques servent d'autorécepteurs et pourraient participer à l'inhibition du relâchement de neurotransmetteur (Shigemoto et al. 1996). L'activation de certains récepteurs postsynaptiques induit une réduction des courants potassiques (Charpak et al. 1990) et une réduction des conductances calciques voltage-dépendantes. Le récepteur postsynaptique mGluR1 est impliqué dans la potentiation à long-terme dans l'hippocampe et la dépression à long-terme dans le

cervelet (Aronica et al. 1990, McGuinness et al. 1991, Zheng et al. 1992, Bashir et al. 1993).

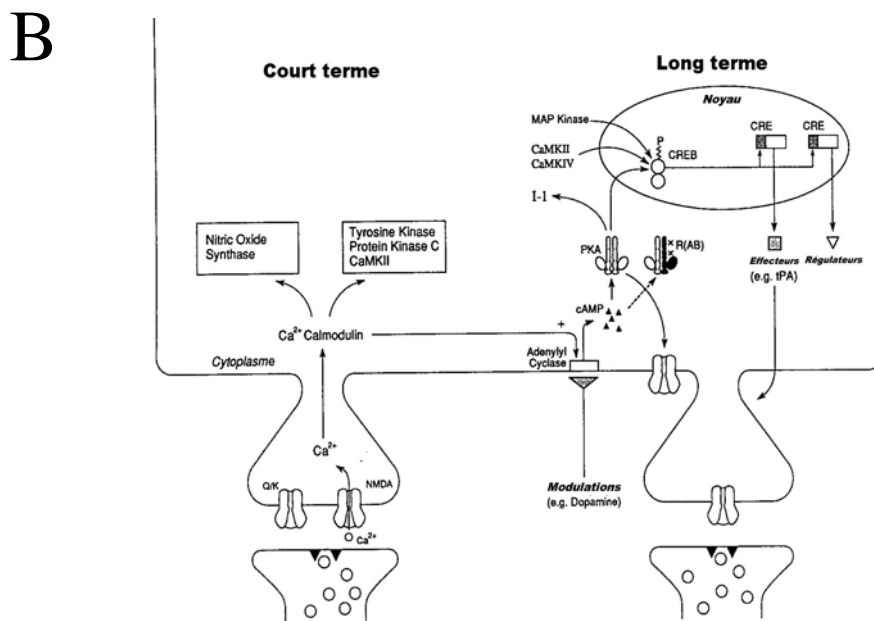
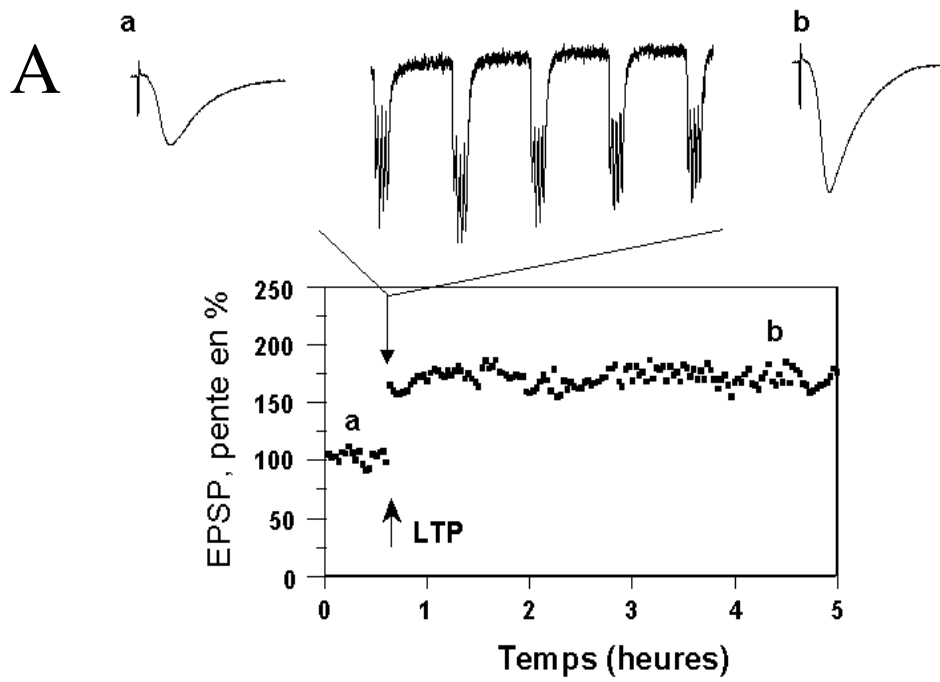
## LA PLASTICITE SYNAPTIQUE

Ce n'est que récemment que les neurophysiologistes ont découvert les extraordinaires capacités de plasticité synaptique de l'hippocampe. En 1973, Bliss et ses collègues ont montré qu'une stimulation à haute fréquence de la voie perforante entraînait une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique dans le gyrus denté (Bliss et al. 1973, Figure 7A). Cette augmentation, qui peut durer plusieurs jours *in vivo*, a été appelée la potentiation à long-terme ou LTP. Elle a également été mise en évidence au niveau des connexions entre les collatérales de Schaffer et les épines dendritiques du CA1 (Andersen et al. 1977), ainsi que dans d'autres régions du système nerveux : les régions néocorticales et subcorticales et le système nerveux périphérique des mammifères (Pockett et al. 1993) ou de batraciens (Wan et al. 1999), la jonction neuro-musculaire des Arthropodes (Sigrist et al. 2000), ainsi que des synapses d'organismes invertébrés (Bao et al. 1998, Murphy et al. 1997).

Bien que les mécanismes impliqués dans l'expression de la LTP soient encore peu connus, elle montre différentes propriétés qui font d'elle un candidat particulièrement intéressant permettant d'expliquer les importantes capacités de stockage d'informations et d'apprentissage de l'hippocampe : premièrement, elle peut persister plusieurs jours, voire jusqu'à deux mois lorsqu'elle est induite artificiellement *in vivo* (Douglas et al. 1975). Deuxièmement, l'induction expérimentale de la LTP ressemble en beaucoup de points à l'activité synaptique observée *in vivo* : elle peut être induite par une stimulation de fréquence similaire à celle se déroulant naturellement dans l'hippocampe de rat lors de l'exploration spatiale, le rythme thêta, une onde de décharges brèves et synchrones de 5 à 7 Herz (Larson et al. 1988); dans l'amygdale, une structure responsable de l'apprentissage lié à la peur, la mémorisation produit une augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique similaire à celle induite par la LTP (Rogan et al. 1997); une saturation de la LTP dans l'hippocampe interfère avec l'apprentissage spatial, renforçant l'idée que la LTP est requise pour un apprentissage normal (Moser et al. 1998); l'exploration spatiale d'un nouvel environnement peut annuler une potentiation induite auparavant (Xu et al. 1998) et enfin une stimulation visuelle répétitive peut provoquer une potentiation des synapses rétino-tectales (Zhang et al. 2000). Troisièmement, une modulation de la LTP induit une modification correspondante des capacités d'apprentissage. En effet, diverses études comportementales et pharmacologiques montrent qu'une inhibition de la LTP affecte différentes tâches de mémorisation faisant intervenir l'hippocampe chez le rat, telles que retrouver une plate-forme dans une piscine d'eau opaque, ou discriminer différentes odeurs (Morris et al. 1986, Staubli et al. 1989). De plus, de récentes manipulations génétiques ont permis d'augmenter l'expression de la LTP. Il s'en est presque toujours suivi une amélioration des performances des souris dans différentes tâches d'apprentissage (Manabe et al. 1998, Madani et al. 1999, Tang et al. 1999, mais voir aussi Migaud et al. 1998). Quatrièmement, la LTP est synapse-spécifique, ce qui implique que seules les synapses ayant reçu une stimulation à haute fréquence vont exprimer la LTP (Schuman et al. 1997). Cinquièmement, elle est coopérative, ce qui résulte de l'observation que la probabilité d'induire la LTP ou que l'ampleur de son expression augmente avec le nombre d'afférences stimulées. Cette dernière peut être changée en variant l'intensité de la stimulation extracellulaire : une stimulation de faible intensité ou de courte durée ne va que rarement induire la LTP, alors qu'une stimulation plus forte induit la LTP de manière plus fiable (McNaughton et al. 1978).

Enfin, elle est associative, c'est à dire que l'induction de la LTP par la stimulation d'un petit groupe de fibres afférentes peut être facilitée par la stimulation simultanée d'un autre groupe d'afférences convergentes. Cette dernière propriété correspond au postulat de Hebb selon lequel une coïncidence d'activité entre deux neurones couplés synaptiquement pourrait provoquer une augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique entre ces deux neurones. Une telle modification était, selon lui, la base cellulaire de l'apprentissage (Hebb 1949). En regard de ces différentes propriétés, la LTP dans l'hippocampe et plus particulièrement dans la région du CA1 est devenue le modèle physiologique des processus d'apprentissage le plus étudié de nos jours.

Alors que la LTP représente un mécanisme de stockage d'information, il est apparu plus récemment qu'un phénomène inverse, la dépression à long terme (LTD), pouvait jouer le rôle de mécanisme synaptique d'oubli (Dudek et al. 1992). Contrairement à la LTP qui est induite par une stimulation électrique à haute fréquence et dépend d'une forte entrée de Calcium dans l'épine dendritique à travers le canal NMDA et l'activation de protéine kinases, la LTD est induite par une stimulation à basse fréquence, dépend d'une entrée plus faible de calcium (Malenka et al. 1993) et fait intervenir des phosphatases (Mulkey et al. 1994) ainsi qu'une diminution du nombre de récepteurs AMPA à la surface de l'épine (Carroll et al. 1999). Son rôle dans l'apprentissage et les mécanismes responsables de la LTD ne sont toutefois pas encore aussi clairement élucidés que pour la LTP.



**Figure 7** : A. Induite par un train de stimulations à haute fréquence, la potentiation à long terme se caractérise par une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique observée ici par une augmentation de la pente du potentiel postsynaptique inhibiteur (EPSP). B. Schéma descriptif de certains mécanismes impliqués dans l'induction et l'expression de la LTP (Abel et al. 1997).

## Mécanismes de la LTP

Une étape importante dans la compréhension des mécanismes d'induction de la LTP a été l'observation qu'elle pouvait être bloquée par des antagonistes spécifiques des récepteurs NMDA (Collingridge et al. 1983, Figure 7B). Le rôle joué par ce récepteur dans l'induction de la LTP réside dans ses propriétés, à savoir que le canal ionique auquel il est lié est bloqué de manière « voltage-dépendante » par l'ion magnésium. Une ouverture du canal NMDA peut donc être effectuée si un ligand, le glutamate, se lie au récepteur en même temps que s'effectue une dépolarisation de la membrane postsynaptique. Ce récepteur a donc un rôle déterminant comme détecteur de coïncidence entre l'activité présynaptique et postsynaptique et cette propriété permet d'expliquer l'associativité de la LTP.

L'ouverture du canal NMDA entraîne l'entrée massive de calcium dans l'épine dendritique. L'augmentation de la concentration postsynaptique de cet ion, en forte concentration dans le milieu extracellulaire (2.5 mM), constitue une étape nécessaire et probablement suffisante pour l'induction de la LTP. En effet, des chélateurs du calcium, ainsi qu'une réduction de la concentration extracellulaire de cet ion empêchent l'induction de la LTP (Lynch et al. 1983). De plus, l'injection intracellulaire de calcium emprisonné par un chélateur photosensible a permis d'induire la LTP à l'aide d'un flash de lumière libérant le calcium (Malenka et al. 1988). Bien que ce mécanisme semble s'appliquer de manière relativement généralisée à l'induction de la LTP, de nombreuses synapses telles que celles formées par les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3 de l'hippocampe, peuvent induire la LTP d'une manière indépendante des récepteurs NMDA. En effet des canaux calciques « voltage-dépendants » présents dans de telles synapses permettent une entrée de Calcium suffisante pour induire la LTP (Harris et al. 1986, Morgan et al. 1999). De plus, il est récemment apparu que les récepteurs métabotropiques pouvaient également contribuer à l'induction de la LTP (Bashir et al. 1993). En effet, les récepteurs de type mGluR1 et mGluR5 sont couplés à une phospholipase C qui produit la formation de IP<sub>3</sub>, laquelle va induire, quoique plus lentement que le récepteur NMDA, une augmentation du calcium postsynaptique par libération des stocks intracellulaires. Cette hypothèse est toutefois controversée par des études plus récentes (Manzoni et al. 1994, Hsia et al. 1995).

Au vu de ces résultats et bien que différents récepteurs puissent être impliqués dans l'induction de la LTP, il semble que l'augmentation de calcium postsynaptique en soit l'élément primaire et indispensable.

Les processus biochimiques qui suivent cette phase d'induction sont encore relativement peu clairs. Le seul mécanisme actuellement connu est l'activation, par le calcium, d'une série de cascades enzymatiques. Il a en effet été observé que les épines dendritiques contiennent une très forte concentration de Calcium/calmoduline kinase II (CamKII), une protéine kinase activée par le calcium (Kennedy et al. 1983). Suite à l'induction de la LTP, cette enzyme est activée par l'entrée postsynaptique de calcium puis, par auto-phosphorylation, elle peut s'activer de manière constitutive, indépendamment du calcium (Miller et al. 1986) et rester active pendant plusieurs heures (Fukunaga et al. 1993, Barria et al. 1997). Il a ainsi été proposé que la CamKII pourrait participer à des modifications durables de l'efficacité synaptique en agissant comme une mémoire moléculaire (Lisman et al. 1988). Une des actions possibles de cette enzyme serait d'augmenter l'efficacité des canaux AMPA par phosphorylation

de ces récepteurs (Barria et al. 1997) ainsi qu'en augmentant l'expression de ces protéines (Cammarota et al. 1998).

Un autre messenger secondaire stimulé par le calcium est l'adénylate cyclase (Figure 7B). Une fois activée, cette enzyme va induire la formation de cAMP qui, à son tour, actionne la protéine kinase dépendante du cAMP, la protéine kinase A (PKA). Outre l'autophosphorylation de la CamKII qu'elle favorise (Makhinson et al. 1999), la PKA serait également responsable de l'augmentation de la synthèse de certaines protéines telles que la CamKII (Wu et al. 1998) et le récepteur AMPA (Nayak et al. 1998, Shi et al. 1999) via son action sur le facteur de transcription CREB (Boshart et al. 1991, Ofir et al. 1991, Impey 1996). Cette synthèse de protéines apparaît environ 1 heure après l'induction de la LTP et est impliquée dans la consolidation de la LTP (Abel et al. 1997). Elle marque le début de la phase tardive de la LTP, la L-LTP par opposition à la phase précoce (E-LTP) qui dépendrait plutôt de modifications post-traductionnelles. Ainsi, il a été proposé que des enzymes telles que la CamKII soient responsables de l'initiation de la LTP, puis que le relais soit ensuite pris par la synthèse de récepteurs. En accord avec cette hypothèse, il a été observé que des inhibiteurs de la CamKII inhibent l'induction même de la LTP, sans pour autant affecter à posteriori une LTP déjà induite (Malinow et al. 1989). Des inhibiteurs de la PKA ou de la synthèse de protéines vont, par contre, permettre à la LTP de s'exprimer pendant environ 1 à 3 heures seulement, avant de provoquer un fléchissement de la potentiation (Nguyen et al. 1996).

Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'augmentation de l'efficacité synaptique est l'activation de synapses silencieuses. Comme décrit plus haut, environ 25% des synapses hippocampales adultes n'expriment que le récepteur NMDA (Takumi et al. et al. 1999) et sont inactives - ou silencieuses - au potentiel de repos. Cette proportion est plus élevée dans un cerveau immature et il semblerait que le développement puisse, par augmentation de l'expression des récepteurs AMPA, rendre actives des synapses silencieuses (Liao et al. 1999, Petralia et al. 1999). Différentes études suggèrent qu'un tel mécanisme puisse être également impliqué dans l'expression de la LTP (Isaac et al. 1995, Liao et al. 1995, Lissin et al. 1998, 1999, Shi et al. 1999).

De tels effets sur les récepteurs AMPA pourraient à eux seuls suffire pour provoquer la potentiation synaptique qui caractérise la LTP. Cette hypothèse est renforcée par l'observation que l'augmentation de l'efficacité des récepteurs AMPA est occultée par une induction préalable de la LTP. Toutefois, compte tenu du recyclage relativement rapide des protéines, comment expliquer le maintien à long terme de la LTP ? Comment expliquer que des éléments biochimiques dont la durée de vie est de quelques jours voire de heures seulement permettent le maintien d'une information pendant plusieurs semaines ? Une possibilité, évoquée par Ramón y Cajal déjà, est que l'activité synaptique modifie la structure des synapses et que ces modifications influencent en retour la fonction synaptique. Quoique souvent contestées, de nombreuses études, décrites plus en détail au chapitre consacré aux épines dendritiques, ont en effet pu mettre en évidence qu'une modification de la structure de l'épine est associée à l'expression de la LTP. Outre ces différents types de modifications de la morphologie postsynaptique, quelques études se sont intéressées également à la morphologie de la structure présynaptique. Suivant l'hypothèse de Bliss (Bliss et al. 1986) selon laquelle la LTP pourrait être due à une augmentation de la libération de neurotransmetteurs, plusieurs groupes ont analysé le nombre ainsi que la répartition des vésicules présynaptiques suite à l'induction de la LTP. Toutefois,



ces études ont abouti à des résultats contradictoires et n'ont pas permis d'étayer l'hypothèse de Bliss (Fifkova et al. 1977, Chang et al. 1984, Applegate et al. 1987). La LTP pourrait également induire des modifications de l'arborisation dendritique (Ivanco et al. 2000). Enfin, des modifications de la morphologie de cellules non-neuronales ont pu être mises en évidence. Suite à l'induction de la LTP, le groupe de Wenzel a en effet pu observer une augmentation de la surface de contact que forment les processus astrocytaires avec les synapses (Wenzel et al. 1991). Le rôle exact de cette augmentation est encore peu connu et il reste à déterminer si elle est spécifique aux synapses activées ou s'il s'agit d'une réaction générale des cellules gliales à la stimulation. Toutefois, des études récentes semblent indiquer que les cellules gliales puissent jouer un rôle dans la transmission synaptique et notamment en contrôlant la concentration en neurotransmetteurs dans la fente synaptique. (Clements et al. 1992, Harris et al. 1999, Diamond et al. 2000).

Des modifications de la structure du neurone ont pu être observées parfois longtemps encore après l'induction de la LTP, ce qui pourrait permettre d'expliquer le maintien à long terme de l'augmentation de l'efficacité synaptique. De plus, cette hypothèse est renforcée par l'observation que différentes protéines morphorégulatrices sont également impliquées dans l'expression de la LTP. Par exemple, des manipulations génétiques ont récemment pu montrer que l'activateur tissulaire de plasminogène (tPA), une protéase extracellulaire dont l'expression est régulée par l'activité synaptique (Qian et al. 1993), joue un rôle important dans l'expression de la LTP (Madani et al. 1999). Cette enzyme pourrait notamment agir au niveau de la matrice extracellulaire en fragilisant les adhésions cellulaires, permettant ainsi à une restructuration morphologique de s'effectuer. Une autre protéase, la calpaïne, est activée par l'augmentation de calcium intracellulaire consécutive à l'induction de la LTP (Vanderklisch et al. 1995). Cette protéase intracellulaire digère la spectrine, une protéine du cytosquelette qui contribue à la distribution des récepteurs (Dmytrenko et al. 1993) et à l'organisation des lipides membranaires (Goodman et al. 1986). En fragilisant ainsi la structure de l'épine, elle pourrait favoriser ses modifications. En effet, une inhibition de la calpaïne bloque l'expression de la LTP (del Cerro et al. 1990, Denny et al. 1990). Les molécules d'adhésion jouent également un rôle dans l'expression de la LTP. En effet, différentes molécules interférant avec la liaison de la molécule d'adhésion NCAM (Lüthi et al. 1994, Muller et al. 1996) ou avec les intégrines (Staubli et al. 1998) empêchent l'induction de la LTP. Comme pour les protéases extracellulaires, il est suggéré qu'une diminution de l'efficacité des molécules d'adhésion permette aux restructurations membranaires de s'effectuer et à la plasticité morphologique de s'exprimer.

Bien que ces résultats indiquent que le site d'expression de la LTP soit essentiellement postsynaptique, différentes observations suggèrent que la LTP puisse également avoir des répercussions au niveau présynaptique. L'une d'entre elles implique l'oxyde nitreux (NO) comme messenger rétrograde circulant de l'épine dendritique vers le terminal présynaptique par le milieu extracellulaire. En faveur de cette hypothèse, une inhibition pharmacologique ou génétique de l'expression d'une forme de l'enzyme de synthèse du NO, la eNOS, inhibe l'expression de la LTP (Kantor et al. 1996). Il a été suggéré que le NO puisse agir présynaptiquement en augmentant la libération de neurotransmetteur. Bien qu'une augmentation de la libération du glutamate après induction de la LTP ait été effectivement observée (Bliss et al. 1986), ces résultats ainsi que l'effet du bloc de la NO synthase sur la LTP sont encore largement controversés (Aniksztejn et al. 1989).

## LA SYNAPSE

*« Les neurones, ces papillons mystérieux de l'âme, dont les battements d'ailes pourraient – qui sait – clarifier un jour le secret de la vie mentale. »*

Ramòn y Cajal

C'est vers 1888 que Ramòn y Cajal établit que les contacts entre les terminaisons axonales d'un neurone et les dendrites ou le soma d'un autre neurone sont les sites de transmission de l'influx nerveux. En 1897, Sherrington proposa le terme de synapse (du grec *sunapsis* : point de jonction) pour désigner ces zones de contact entre neurones, spécialisées dans la transmission d'informations. En fait le terme synapse désigne également les connexions entre neurones et cellules effectrices (cellules musculaires et glandulaires) ou encore entre cellules réceptrices et neurones.

Selon des critères morphologiques et fonctionnels, on distingue plusieurs types de synapses :

- Les synapses chimiques, caractérisées par la présence d'un espace de 10 à 20 nm. entre les membranes plasmiques des cellules connectées, appelé fente synaptique. Un neurotransmetteur, contenu dans des vésicules présynaptiques, est alors relâché dans la fente synaptique pour transmettre les informations aux récepteurs contenus dans la densité post-synaptique. Bien souvent, les synapses sont axo-dendritiques, mais elles peuvent également être axo-somatiques, axo-axonales, dendro-dendritiques, somato-somatiques, somato-dendritiques ou encore dendro-somatiques (Peters et al. 1991). De plus, il existe des types très variés de synapses chimiques telles que les synapses réciproques, formées de deux synapses chimiques orientées en sens inverse l'une de l'autre, ou encore les glomérules, formés par un ensemble de synapses chimiques : un axone peut se trouver entouré d'un ensemble de dendrites avec lesquelles il est en contact synaptique et de même, une dendrite peut recevoir les informations de plusieurs axones au même endroit. On distingue enfin les synapses de type I, principalement excitatrices et les synapses de type II, plutôt inhibitrices (Gray et al. 1969). Ces dernières sont dites symétriques, parce qu'elles présentent une zone électron-dense de chaque côté de la jonction. Les vésicules synaptiques sont plutôt ovales, la fente synaptique relativement petite (12 nm.) et la densité postsynaptique (PSD) est peu marquée. Elles représentent environ 16 % des synapses du cortex. Les synapses de type I sont asymétriques, c'est à dire que la membrane présynaptique ne comporte pas de matériel électron-dense. La PSD est bien marquée, les vésicules synaptiques sont rondes et la fente synaptique légèrement plus grande : 20 nm. Le type I représente 84% des synapses du cortex.

- Les synapses électriques ou « gap junctions » qui se caractérisent par l'accolement des membranes pré et post-synaptiques à travers lesquelles le signal électrique passe

directement d'une cellule à l'autre, sans intermédiaire chimique. Puisqu'il n'y a pas de neurotransmetteur impliqué dans le fonctionnement d'une telle synapse, la transmission du signal est plus rapide que pour la synapse chimique. Bien que plus fréquentes chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés que chez les mammifères, de telles synapses ont été récemment décrites dans l'hippocampe de rat entre les interneurons inhibiteurs, où elles pourraient être impliquées dans la synchronisation de l'activité électrique (Tamas et al. 2000).

- Les synapses mixtes, formées par la juxtaposition d'une synapse chimique et d'une synapse électrique. Chez les mammifères, ces synapses sont plus fréquentes que les synapses électriques.

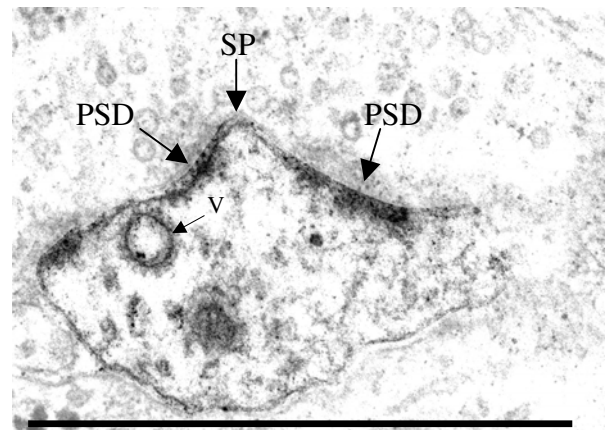
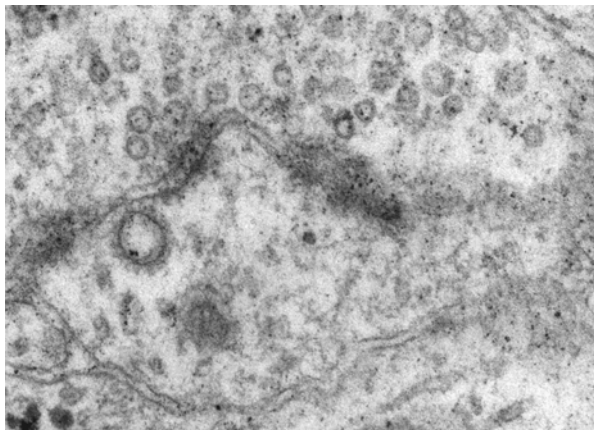
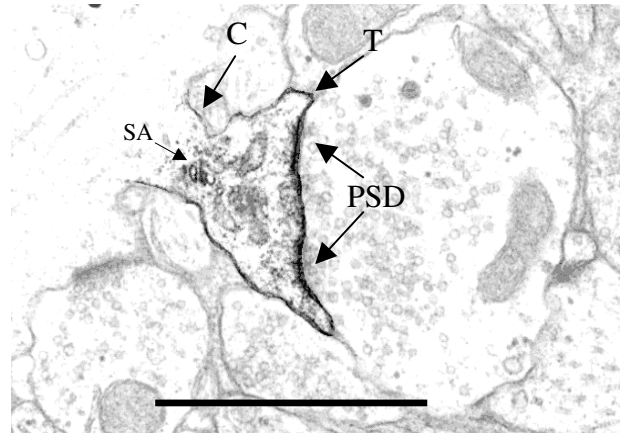
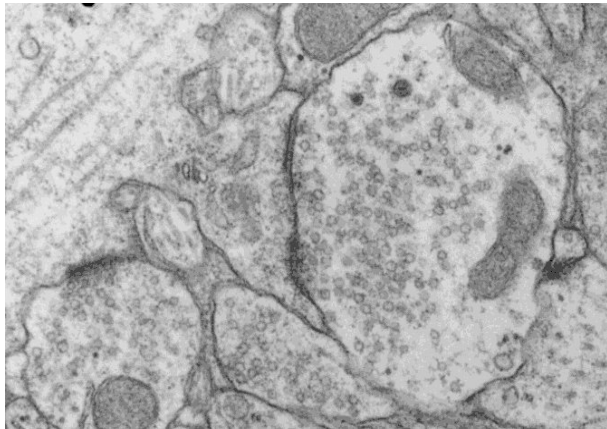
## LES EPINES DENDRITIQUES

Dans l'hippocampe, la grande majorité de la transmission excitatrice s'effectue à travers des synapses chimiques, glutamatergiques, entre axones et épines dendritiques, alors que les fibres provenant des interneurons inhibiteurs se terminent directement sur les dendrites des cellules pyramidales (synapse de type *shaft*) ou sur le corps cellulaire. L'élément présynaptique, le terminal axonal, peut soit se trouver au bout d'une ramification de l'axone et s'appelle *bouton terminal*, soit former une varicosité le long de l'axone non-myélinisé ou dans les nœuds de Ranvier des axones myélinisés et s'appeler *bouton en passant*. L'élément postsynaptique, l'épine, est une excroissance dendritique terminée par un renflement, qui donne cette apparence de rosier épineux aux dendrites observées en microscopie optique (figure 3). Une cellule pyramidale adulte reçoit environ entre 15000 et 25000 contacts synaptiques, dont environ 80 à 90 % se font sur des épines dendritiques. Etant donné qu'un neurone du CA3 contacte une cellule du CA1 par environ 3 à 7 synapses, on peut évaluer qu'un seul neurone du CA1 est en contact avec environ 5000 neurones du CA3 (Wenzel et al. 1973, Amaral et al. 1990, Andersen et al. 1990, Bannister et al. 1995).

### Structure fine

Décrites tout d'abord par Ramon y Cajal en microscopie optique (1888) puis par Gray (1959) et Westrum (1966) en microscopie électronique, les épines dendritiques sont constituées d'un cou formant l'attache à la dendrite et d'une tête, renflement contenant la densité postsynaptique (PSD) et au bout duquel s'établit généralement la connexion synaptique. Chez le rat adulte, les épines dendritiques du CA1 hippocampal mesurent de 0.2 à 2.5  $\mu\text{m}$  de longueur pour un diamètre de 0.04 à 0.5  $\mu\text{m}$  au niveau du cou. La tête a un volume de 0.003 à 0.55  $\mu\text{m}^3$  et la PSD recouvre une surface de 0.008 à 0.54  $\mu\text{m}^2$  (Harris et al. 1992, Fiala et al. 1999, <http://synapses.bu.edu/>), soit 10 à 15 % de la membrane de la tête.

Contrairement au bouton axonal et aux énormes épines branchées du CA3 (Chicurel et al. 1992), l'épine dendritique du CA1 ne contient pas de mitochondries, ni de cytosquelette suffisamment dense pour être observé en microscopie électronique (tel que les microtubules ou neurofilaments facilement observables dans les dendrites ou les axones). Par contre, la microscopie électronique révèle la présence d'une quantité de structures définissables morphologiquement et ayant une fonction locale bien précise (Figure 8).



**Figure 8 :** *Epines dendritiques de type I, hippocampe de rat, CA1. C : Cou, T : Tête, PSD : densité postsynaptique. SA : appareil de l'épine. SP : Spinule. V : vésicule coâtée. Barres : 1  $\mu$ m.*

Ainsi on observe **l'appareil de l'épine**, qui est une prolongation du réticulum endoplasmique lisse issu de la dendrite, ainsi que des **ribosomes**, libres ou associés à l'appareil de l'épine. L'appareil de l'épine se trouve principalement dans les épines de grande dimension et apparaît associé au **spinule**, sorte d'excroissance de la membrane postsynaptique, dépourvue de PSD (Tarrant et al. 1979, Harris et al. 1989, Sorra et al. 1998). Outre la synthèse locale de protéines (Pierce et al. 2000), l'appareil de l'épine pourrait également jouer un rôle dans la régulation du calcium (Burgoyne et al. 1983, Fifkova et al. 1983) et participer, avec les **vésicules d'endo\exocytose coatées**, à la régulation de la membrane postsynaptique (Muller et al., sous presse). Dernier élément de l'épine visible en microscopie électronique, la **densité postsynaptique (PSD)**, contient non seulement les récepteurs au glutamate, mais également plus de 30 constituants différents tels que des protéines du cytosquelette, des enzymes de glycolyse, des messagers secondaires, des «heatshock proteins», des protéines de transport vésiculaire, etc... Située en face de la zone active présynaptique, elle sert d'organisateur général de la machinerie de transduction du signal postsynaptique, qui lie des molécules régulatrices à leurs cibles, coordonne les changements développementaux et liés à l'activité synaptique et établit la topographie fonctionnelle de la membrane postsynaptique.

**Composants moléculaires** (Figure 9, revues de Ziff et al. 1997, Fifkova et al. 1992, Harris et al. 1994, van Rossum et al. 1999)

Tout d'abord, la fente synaptique. Cet espace de diffusion des neurotransmetteurs contient une série de protéines de la matrice extracellulaire et des molécules d'adhésion, telles que Densin 180, Cadhérines, neuroligans, neurexines. Ces molécules joueraient un rôle dans l'alignement des membranes pré et post-synaptiques et le maintien de leur structure. De plus, certaines d'entre elles, telle que les cadhérines, possèdent un domaine intracellulaire avec lequel elles forment des liaisons avec des protéines cytosquelettiques, telles que la  $\beta$ -Caténine, liée elle-même à l'actine, formant ainsi une continuité entre le cytosquelette de l'épine et le milieu extracellulaire (Aberle et al. 1996).

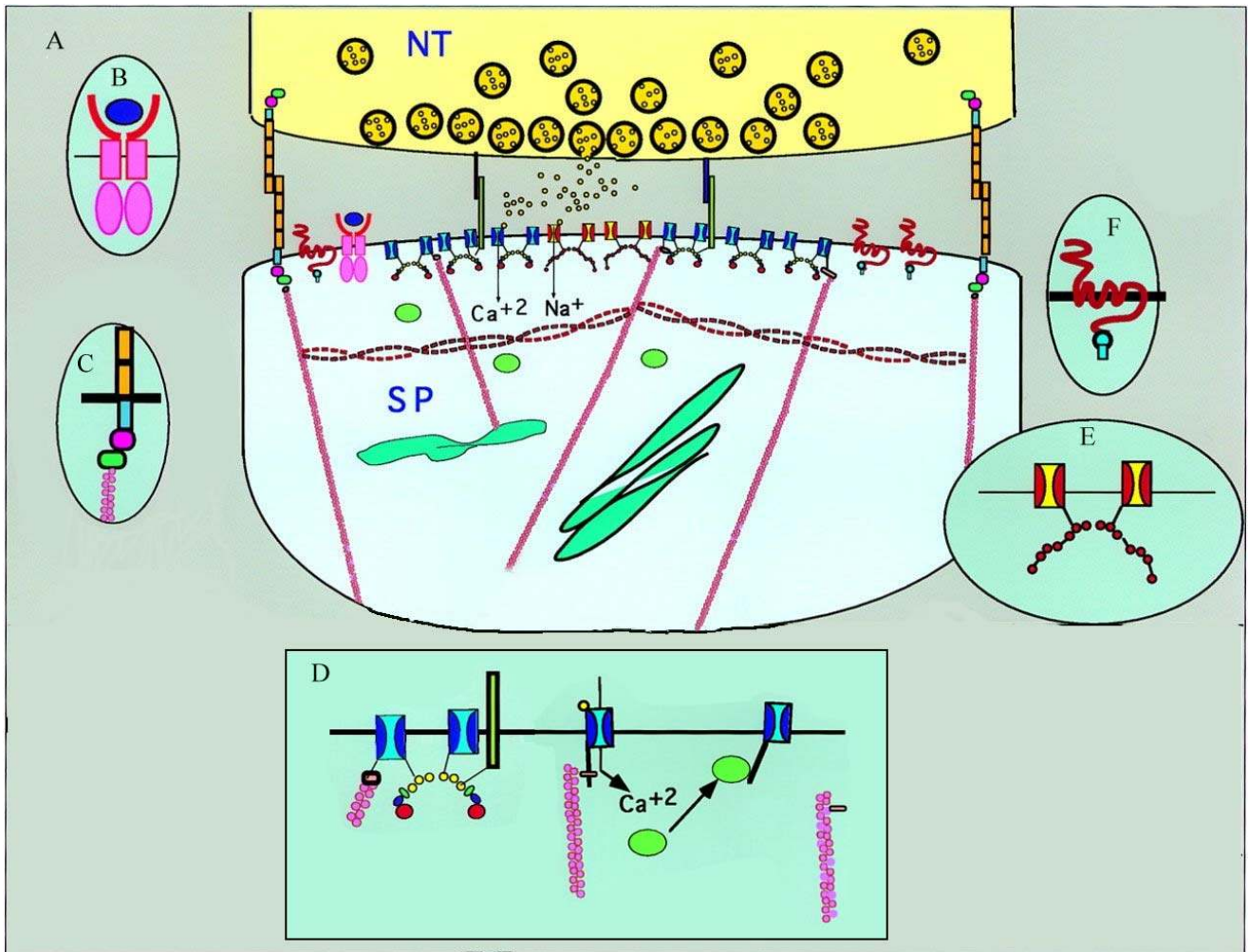
C'est dans les épines que se trouve la plus grande concentration de filaments d'actine (Fifkova et al. 1982, Fischer et al. 1998). Cet élément du cytosquelette sert non seulement à maintenir la structure de l'épine, mais également à limiter la mobilité des récepteurs en les ancrant à d'autres microfilaments tels que la spectrine, ainsi qu'à lier l'appareil de l'épine à la PSD. L'actine montre une grande activité de polymérisation, sous le contrôle négatif du calcium cytosolique libre. Une variation de la concentration de calcium dans l'épine, induite par l'activité synaptique, peut moduler les interconnexions entre la PSD et différentes organelles, ainsi que provoquer des changements rapides et radicaux de la structure de l'épine (Fischer et al. 1998). De plus, la faible diffusion du calcium dans le cytoplasme suggère que des changements de la concentration de cet ion pourraient être très localisés (Cline et al. 1991) et permettre des modifications circonscrites de la structure du cytosquelette. Notons également d'autres éléments du cytosquelette tels que  $\alpha$ -actinine-2, qui peut lier les récepteurs NMDA de manière dépendante de la calcium/calmoduline (Wyszynski et al. 1997), la myosine-B, un moteur moléculaire qui pourrait être impliqué dans le trafic des protéines entre la PSD et le cytoplasme (Husi et al. 2000), ou encore MAP2, fodrine, dystrophine, drebrine, amyloid precursor protein 1 et  $\alpha$ -adducine, dont les rôles ne sont pas encore élucidés.

Un composant majeur de la PSD est une protéine kinase, la Calcium/Calmoduline kinase II (CamKII) (Kennedy et al. 1983) qui joue un rôle central dans l'expression de la LTP et de la plasticité synaptique (Lisman et al. 1994). Une autre protéine kinase, la Fyn tyrosine kinase, peut phosphoryler les sous-unités NR2A et B du récepteur NMDA et ainsi augmenter son activité (Suzuki et al. 1995). Il existe également d'autres protéines régulatrices telles que la protéine kinase C, ERK2-type mitogen-activated protein kinase, protéine phosphatase 1 et protéines G. La calpaïne, une protéase régulée par le calcium, peut interférer avec le lien entre récepteurs et cytosquelette. Elle peut cliver des sous-unités du récepteur AMPA (Bi et al. 1994), des canaux calciques, ainsi que dégrader la spectrine (Dosemeci et al. 1995) et permettrait ainsi une réorganisation des récepteurs AMPA. Cette molécule est également impliquée dans l'expression de la LTP (Vanderklish et al. 1995).

L'épine dendritique montre non seulement une polarisation bien marquée mais de plus, de nombreuses molécules y sont positionnées très précisément selon leur rôle ou leur cible spécifique. Certaines des protéines régulatrices citées plus haut seraient positionnées par des protéines adaptatrices telles que AKAP79, AKAP150 (Carr et al. 1992). Les récepteurs au glutamate sont également maintenus à une position précise et regroupés en face des vésicules présynaptiques. De plus, les récepteurs AMPA se trouvent au milieu de la PSD, alors que les récepteurs métabotropiques se trouvent plutôt à la périphérie (Nusser et al. 1994). Un tel rôle de positionnement des récepteurs serait tenu par des protéines telles que PSD95 (Nieto-Sampedro et al. 1982), PSD93, SAP102, SAP97, GRIP, ABP. Ces protéines contiennent toutes un même motif, le domaine PDZ (Kennedy et al. 1995), qui se retrouve également dans les jonctions serrées et servirait à lier les récepteurs aux protéines cytoplasmiques. Certaines de ces protéines sont appelées MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) car elles contiennent un domaine de type guanylate kinase, bien qu'elles n'aient pas d'activité enzymatique (Anderson et al. 1996).

D'autres récepteurs se trouvent également dans la PSD, tels que TrkB, le récepteur au BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Wu et al. et al. 1996), qui peut stimuler la phosphorylation de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA et ainsi moduler son activité (Suen et al. 1997).

Une étude biochimique récente (Husi et al. 2000) a mis en évidence que les récepteurs NMDA font partie d'un complexe protéinique, le NRC (NMDA receptor-associated protein complex) contenant une centaine de protéines différentes, dont certaines ont été identifiées à des protéines du cytosquelette, des récepteurs, des adaptateurs, des messagers secondaires tels que décrits plus haut. Cette découverte indique que l'organisation de la PSD est hautement complexe et permettrait un positionnement très précis des récepteurs et des machineries de transduction aux sites de contact pré et postsynaptiques. Ainsi, bien qu'en microscopie électronique l'épine dendritique semble dénuée de structures cytosquelettiques et d'organelles, elle contient une grande proportion de molécules nécessaires tant pour le maintien de la structure et de la fonction synaptique, que pour leur modulation. Ces molécules pourraient être impliquées dans différents processus biochimiques associés à l'activité synaptique et la LTP.



**Figure 9** : Modèle moléculaire de la densité postsynaptique d'une synapse excitatrice centrale. (Ziff et al. 1997).

**A** : Organisation hypothétique des structures présynaptiques (NT, terminal nerveux) et postsynaptique (SP, épine). Les vésicules synaptiques (ronds oranges) relâchent du glutamate dans la fente synaptique, qui stimule les récepteurs NMDA (rectangles bleu), AMPA (rectangles rouges) et métabotropiques (protéine membranaire brune). Dans l'épine, des filaments d'actine (rose) sont liés à la spectrine (rouge, horizontale). On observe également l'appareil de l'épine (structures membraneuses vertes) et la calmoduline (ovales verts).

**B** : Le récepteur TrKB est un récepteur au BDNF (bleu).

**C** : Les cadhérines (protéines transmembranaires oranges) sont liées par leur domaine cytoplasmique (bleu) à la  $\beta$ -caténine (rouge), l' $\alpha$ -caténine (vert) et l'actine (rose).

**D** : Le domaine cytoplasmique de NeuroLigin (rectangle vert) lie PSD-95 (ovales bleu, vert et jaune). PSD-95 lie les protéines GKAP/SADAP/DAP (rouge) et le récepteur NMDA (rectangle bleu) qui lie à son tour l' $\alpha$ -actinine (orange) et l'actine (rose). Lorsque le Calcium entre dans l'épine via le récepteur NMDA. Il est proposé que cela active la calmoduline (ovale vert), qui détache l' $\alpha$ -actinine et l'actine (ovale orange, chaîne rose) de la partie c-terminale de la sous-unité NRI.

**E** : Deux récepteurs AMPA (rectangles rouge et jaune) sont indiqués. Chacun lie GRIP, qui a 7 domaines PDZ (cercles rouges). La dimérisation de GRIP via sa séquence n-terminale est hypothétique.

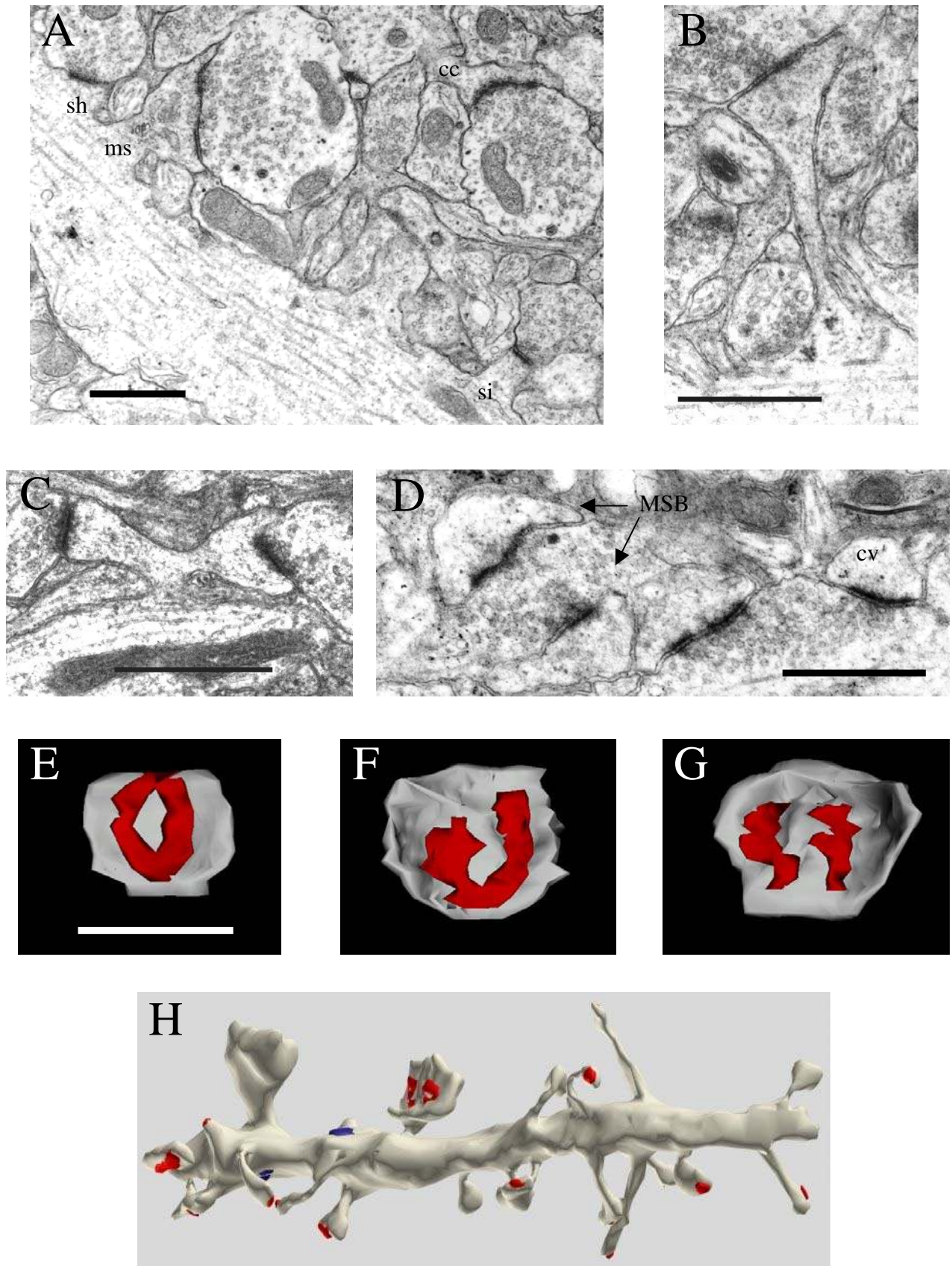
**G** : Le récepteur métabotrope lie Homer (bleu) via un domaine PDZ (cercles).

## Différents types d'épines

Il existe une grande diversité morphologique des épines et une classification exacte des types morphologiques est forcément incomplète compte tenu des différentes formes intermédiaires qui peuvent exister. Un des premiers critères de classification consiste à séparer les épines en fonction des caractéristiques de la PSD (Figure 10). Celle-ci peut s'incurver vers l'intérieur de l'épine, ce sont les épines **concaves** ou **négatives** ou encore en sourire, ou s'incurver vers l'intérieur du bouton présynaptique dans le cas des synapses **convexes** ou **positives** (Jones et al. 1978). La PSD peut encore présenter des discontinuités, c'est à dire des zones membranaires non électrodenses, probablement dépourvues de récepteurs. Ce sont les épines **perforées** décrites par Peters en 1969. On distingue trois types de PSD perforées reconnaissables uniquement selon une analyse tridimensionnelle (Cohen et al. 1978, Geinisman et al. 1987). Les PSD **fenestrées** présentent, vu depuis le boutons axonal, un cercle électron-dense au centre duquel se trouve une tache plus claire. Les PSD en **fer à cheval** forment un U et les PSD **segmentées** présentent deux zones électron-denses distinctes. Une autre manière de classifier les épines est basée sur la forme du cou et de la tête de l'épine (Jones et al. 1969, Peters et al. 1970, Figure 10). Ainsi, de grandes épines avec un cou large et court et une grosse tête sont appelées « **mushroom-shaped spines** ». Des épines de dimensions plus restreintes avec un cou court, sont appelées « **stubby spines** » et des épines avec un long cou mince, « **thin spines** ». Enfin, les **épines branchées** sont des épines siamoises, où deux ou plusieurs têtes émergent du même cou (Hamlyn et al. 1962, Harris et al. 1988, 1989). Contrairement au CA3 (Chicurel et al. 1992), il semble que dans le CA1, ces épines ne contactent jamais le même bouton axonal (Sorra et al. 1998), réfutant l'hypothèse selon laquelle elles pourraient représenter un stade intermédiaire de synaptogenèse par division d'une épine simple en deux (Nieto-Sampedro et al. 1982, Carlin et al. 1983). Un autre type de synapses, par contre, semble être révélateur d'une synaptogenèse : les **synapses à épines multiples** ou MSB, de l'anglais : « multiple spine boutons ». Il semble en effet que la plupart des épines néoformées chez l'adulte se connectent à un bouton synaptique qui a déjà une synapse, formant ainsi une structure où un bouton contacte plusieurs épines (Friedlander et al. 1991, Woolley et al. 1996, Kirov et al. 1999). Enfin, si le bouton axonal établit un contact avec un élément postsynaptique qui ne présente pas de tête ou ni cou ni tête, on ne parle alors plus d'épine, mais de synapse de type **sessile** et **shaft** respectivement. Notons également la présence de longs prolongements dendritiques dépourvus de tête, les **filopodes**, au bout ou le long desquels se trouvent parfois une synapse. Ces structures sont caractéristiques d'un tissu immature et pourraient représenter une étape précoce de la formation d'une épine dendritique et donc de la synaptogenèse (Fiala et al. 1998).

Les épines dendritiques ont une structure très hétérogène. Au sein d'un même segment dendritique d'une seule cellule pyramidale du CA1 de l'hippocampe, il y a une grande diversité de la morphologie des épines comme il a été montré par des reconstructions tridimensionnelles (Figure 9H, Harris et al. 1989). Cette hétérogénéité pourrait refléter l'individualité de chacune d'entre-elles et être une conséquence de leur historique.





**Figure 10** : Différents types d'épines dendritiques : **A** : Synapse de type shaft (*sh*), mushroom (*ms*), sessile (*si*) et concave (*cc*). **B** : Epine de type thiny; **C** : Epine branchée; **D** : Synapse à épines multiples (*MSB*) et épine convexe (*cv*). **E-H** : Reconstructions tri-dimensionnelles d'une épine fenestrée (**E**), en fer à cheval (**F**), segmentée (**G**) et d'un segment dendritique (**H**). La densité postsynaptique est indiquée en rouge. Barres : 1  $\mu$ m. (La figure H est tirée de Harris et al. <http://synapses.bu.edu/>)

## Rôle des épines et de leur diversité

L'épine dendritique, par sa forme, constitue un microcompartiment relativement isolé de la dendrite, permettant de conserver l'individualité des « inputs » synaptiques et lui permettant de fonctionner comme une unité intégrative multifonctionnelle (Shepherd et al. 1996). Elle contient plusieurs éléments régulateurs lui permettant d'effectuer des processus biochimiques spécifiques, indépendamment du reste de l'arborisation dendritique. En diminuant la diffusion de différentes molécules telles que le calcium (Muller et al. 1991, Yuste et al. 2000), elle évite une propagation non spécifique de la potentiation, permettant ainsi un maintien de la spécificité de la LTP (Bliss et al. 1973). Sa structure ainsi que sa fonction peuvent être modulées selon l'activité synaptique locale, lui donnant ainsi une position clé dans l'expression de mécanismes de plasticité synaptique.

La diversité morphologique des épines pourrait représenter les différentes étapes à travers lesquelles une épine individuelle doit passer avant d'atteindre un état mature ainsi que les différents états dynamiques dépendant de l'historique de vie des épines individuelles et de leur fonction. Elle pourrait également refléter la diversité de fonction des différentes synapses du cortex (Walmsley et al. 1988). En effet, plusieurs études de modélisation indiquent que la forme et le nombre des épines, ainsi que la répartition des récepteurs ou encore de diverses organelles, pourraient influencer l'efficacité de la transmission synaptique :

- Une constriction du cou de l'épine ou une modification de l'organisation de ses organelles peut engendrer une barrière résistive qui, selon la loi d'Ohm, résulte en une amplification de la dépolarisation dans la proximité immédiate de la synapse (Brown et al. 1988, Pongracz, et al. 1985). Le bouchon magnésique du canal NMDA pourrait ainsi être plus facilement débloqué et la conductance de ce dernier améliorée.
- La quantité de glutamate se trouvant dans la fente synaptique à la suite du relâchement par un simple quanta vésiculaire pourrait partiellement dépendre de la forme de la fente synaptique, mais aussi de la présence de processus gliaux contenant des systèmes de recaptage (Clements et al. 1992).
- La probabilité de libération vésiculaire de neurotransmetteur suivant l'arrivée d'une impulsion nerveuse est très variable entre fibres présynaptiques et même entre sites de libération au sein de la même fibre. Elle peut être influencée par le nombre total de vésicules apposées et donc par l'aire du site de libération ainsi que par le nombre de ces sites (Atwood et al. 1983, Rosenmund et al. 1993, Hessler et al. 1993). La perforation de la PSD pourrait également provoquer une augmentation du nombre de sites de libération. De plus, il a été proposé que la zone active se trouvait en bordure de la PSD (Kaiserman et al. 1969). Ainsi, une perforation de la PSD pourrait augmenter la quantité de zone active donc l'efficacité de la transmission synaptique.

Ainsi, il semble que non seulement la forme de la synapse et principalement de l'épine dendritique puisse se modifier selon son état fonctionnel, mais également qu'une variation de la morphologie de l'épine puisse induire une modification de sa fonction. Cette interdépendance entre la structure et la fonction de la synapse a engendré de nombreuses études anatomo-fonctionnelles, dont nous allons faire ici un bref exposé.

## **Modifications de la structure des épines dendritiques** (revue de Horner, 1993)

Ramon y Cajal, toujours lui, nota dans ses premières observations en 1911, que certaines drogues telles que des agents soporifiques ont un effet sur la morphologie des épines. Il est apparu ensuite que les épines dendritiques semblent sensibles à une multitude de phénomènes naturels ainsi qu'à des conditions expérimentales. En effet, des paramètres aussi différents que le développement et la vieillesse, le genre et l'état hormonal, l'hibernation et les changements de température, l'alcoolisme, l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer, certains retards mentaux, des maladies génétiques, la malnutrition et la déshydratation, l'hypoxie, l'expérience, la complexité de l'environnement et enfin l'apprentissage et l'expression de la LTP peuvent modifier la structure ou le nombre de synapses et d'épines dendritiques de différents types neuronaux.

### *Modifications liées au développement et à l'âge*

Une première cause de la variation de la morphologie des épines dendritiques est le développement. Chez les différents mammifères étudiés tels que la souris, le rat, le lapin, le chat, le singe et l'homme, il apparaît que le nombre de synapses augmente lors du développement pour atteindre une valeur maximale peu après la naissance. Ensuite, environ la moitié des synapses dégénère pour atteindre un niveau stable jusqu'à l'âge adulte. Cette élimination de synapses dépend de l'activité synaptique durant une période critique du développement et est nécessaire à l'affinement du réseau synaptique (Kakizawa et al. 2000). Dans le CA1 de l'hippocampe de rat, par exemple, la densité d'épines passe de 0.02 à 0.55 par micromètre de dendrite entre 21 jours de gestation et 20 jours après la naissance (Minkwitz et al. 1975). Dans le cortex visuel de l'être humain, la densité d'épines par micromètre de dendrite passe de 0.6 chez un fœtus de 8 mois à 1 chez le nouveau-né, puis 1.6 à 5 mois, pour retourner à 1 chez l'enfant de 2 ans et l'adulte (Michel et al. 1984). Non seulement leur densité varie, mais il semble également que la forme des épines évolue avec le temps. En effet, on observe avec l'âge une augmentation de la proportion d'épines de type branchées, « thiny » et « mushroom » perforées et une diminution des épines de type « stubby », c'est à dire plus courtes et trapues. Cette évolution se fait parallèlement à l'apparition de l'excitabilité neuronale et joue certainement un rôle important dans la maturation du cerveau, notamment dans sa capacité à exprimer différentes formes de plasticité synaptique (Harris et al. 1992).

Enfin, alors que la densité d'épines reste stable tout au long de la vie de l'adulte, elle diminue chez les individus âgés, ce qui est en relation directe avec la fonction des zones corticales concernées. Dans le cortex pyramidal de rat, il a été observé une diminution de 24 % à 40 % selon les segments dendritiques observés, entre le troisième mois et la troisième année de vie. Cette perte d'épines due à l'âge est aussi sévère que la perte induite par une déprivation sensorielle (Feldman et al. 1975). Dans le CA1 de l'hippocampe, bien que cette diminution semble plus restreinte puisque 10 à 12 % seulement des épines disparaissent (Nunzi et al. 1989), elle est également accompagnée par une diminution du nombre d'épines perforées ainsi que par un affaiblissement de la fonction et des performances de la mémoire spatiale (Geinisman et al. 1986). Une réduction de l'arborisation des dendrites a également été observée avec le vieillissement (Schierhorn et al. 1981). Il est intéressant de noter enfin que

cette perte n'affecte pas un type particulier d'épine, mais s'effectue sur le neurone entier bien que tous les neurones ne soient pas affectés de la même manière.

#### *Modifications liées à l'état hormonal*

Il semble que le genre ainsi que l'environnement hormonal puisse également jouer un rôle sur l'organisation et le branchement des dendrites ainsi que sur la densité des épines.

Dans le CA3 de l'hippocampe de rat, les femelles ont plus de dendrites primaires et les mâles ont plus d'épines sur les dendrites apicales (Gould et al. 1990), un effet qui pourrait être dû aux différences hormonales. De plus, dans le CA1 hippocampal de rat, la densité d'épines fluctue de manière naturelle en fonction des variations cycliques d'œstrogène et de progestérone (Woolley et al. 1990). Durant le pro œstrus, quand ces hormones sont les plus concentrées dans le sang, la densité d'épines est aussi à son niveau le plus élevé. Elle peut ensuite chuter de 30% en près de 24 heures entre le pro œstrus et l'œstrus, quand le taux hormonal retombe. Cet effet est très certainement lié aux variations hormonales, puisqu'il disparaît lorsque l'animal a subi une ovariectomie et réapparaît lors d'un traitement de remplacement aux œstrogènes (Gould et al. 1990). Comme dans d'autres cas de synaptogenèse dans le cerveau adulte, les épines qui sont créées suite à l'augmentation en œstrogènes se forment essentiellement avec des axones qui contactent déjà une épine dendritique, ce qui donne lieu à des boutons à épines multiples (Woolley et al. 1996).

Cette sensibilité aux hormones sexuelles est spécifique au CA1 de l'hippocampe et à l'hypothalamus, mais ne se retrouvent pas dans d'autres régions telles que le CA3 ou le gyrus denté. Elle pourrait être due à la présence dans le CA1 de récepteurs à la progestérone et de l'accumulation d'œstrogènes (Parsons et al. 1982).

En plus de modifier la densité des épines, les hormones sexuelles induisent une variation de l'excitabilité des neurones du CA1 (Teyler et al. 1980) ainsi que de leur plasticité synaptique (Warren et al. 1995). Différentes études relatent également un effet des œstrogènes sur les performances de mémorisation spatiale chez le rat (Simpkins et al. 1997), ainsi que spatiales et verbales chez l'Humain (Hampson et al. 1990, Berman et al. 1997). Bien que le rôle d'une telle activité des hormones sexuelles reste encore mystérieux, il a été proposé qu'elles puissent préparer le comportement maternel (Woolley et al. 1998).

Une autre hormone qui influence la formation des épines dendritiques est l'hormone thyroïdienne. Hauser (Hauser et al. 1984) a observé qu'un traitement des têtards du crapaud bœuf avec cette hormone accélérerait de 2 ans la maturation des synapses du cervelet entre les cellules de Purkinje et les fibres grimpanes. Au contraire, l'hypothyroïdisme conduit à une diminution du nombre d'épines ainsi que de leur état de maturation (Mussa et al. 1989). Contrairement aux batraciens, le cerveau de rat montre une faible réaction à l'hyperthyroïdisme, qui se traduit toutefois par une diminution du nombre d'épines dendritiques localisées dans les dendrites apicales des cellules du CA1 (Gould et al. 1990).

Le stress, via une augmentation de la production de glucocorticoïdes, semble également influencer le nombre de synapses dans l'hippocampe. En effet, l'exposition d'un rat à un stress psychosocial provoque, dans le CA3, une augmentation du nombre de synapses (Sunanda et al. 1995) et une diminution des embranchements dendritiques (Magarinos et al. 1996, Woolley et al. 1990). L'expression de la LTP et de la mémoire spatiale sont également perturbés par ce type de manipulation (de Quervain et al. 1998, McEwen et al. 1999). Notons également qu'un stress prolongé

peut aller jusqu'à la mort neuronale (Stein-Behrens et al. 1994), ce qui pourrait expliquer la diminution du volume hippocampal observée chez des vétérans de la guerre du Vietnam ainsi que chez des personnes âgées (Lupien et al. 1998). Ces effets sont corrélés à la concentration sanguine de corticostéroïdes (Lupien et al. 1998) et sont, dans certains cas, réversibles par une ablation de la glande surrénale, une diminution de la synthèse des corticostéroïdes (de Quervain et al. 1998), ou encore la fin de l'élément stressant (Sousa et al. 2000). Enfin, bien que le lien avec le stress ne soit pas établi, des observations récentes montrent que des différences de soins maternels procurés chez le rat nouveau-né peuvent influencer son développement neuronal et cognitif ainsi que la synaptogenèse dans l'hippocampe (Caldji et al. 1998, Liu et al. 2000).

#### *Modifications liées à l'activité*

Parmi les premières observations d'un lien entre la structure des épines et l'activité neuronale figurent des études menées sur des animaux hibernants tels que la marmotte et l'écureuil. Ces études ont montré que des différences de la morphologie des épines entre l'état d'hibernation et l'état d'éveil pouvaient déjà être visibles 2 heures après l'éveil. La tête de l'épine devient moins large et le cou moins épais chez les animaux éveillés (Boycott et al. 1988), ce qui pourrait se traduire par une augmentation de la conductance. D'autres études ont également montré que les dendrites sont plus nombreuses et ont plus d'embranchements ainsi qu'une plus grande densité d'épines (Popov et al. 1992). Ces observations sont toutefois relativement difficiles à mettre en relation avec l'activité, l'hibernation faisant intervenir de nombreux processus physiologiques extrêmement complexes.

Plus tard, une observation plus directe de la plasticité morphologique des épines dendritiques est apparue avec la microscopie confocale. En liant à l'actine une protéine fluorescente, la GFP, le groupe de Matus a observé que cet élément du cytosquelette des épines de l'hippocampe de rat était continuellement en mouvement et pouvait changer de forme en l'espace de quelques secondes (Fischer et al. 1998). Plus étonnant encore, lorsque les cultures d'hippocampe sont traitées avec un anesthésiant (Kaech et al. 1999), ou des agents qui interfèrent avec la polymérisation de l'actine (Fischer et al. 1998), les épines cessent tout mouvement. De plus, de telles molécules diminuent l'activité synaptique ainsi que les propriétés de plasticité synaptique (Kim et al. 1999, el-Beheiry et al. 1989, Collins et al. 1988). Enfin, des études de microscopie électronique menées sur des cultures dissociées de neurones pyramidaux ont permis de montrer qu'une augmentation de l'activité excitatrice produisait une augmentation de la proportion de synapses perforées (Neuhoff et al. 1999). Ces résultats, avec la récente observation qu'une entrée de calcium à travers les canaux NMDA est requise pour dépolymériser les filaments d'actine (Halpain et al. 1998), indiquent que l'activité synaptique pourrait modifier le cytosquelette des épines activées et provoquer un remodelage de la membrane postsynaptique, ce qui pourrait contribuer à modifier en retour l'activité synaptique. De récentes expériences montrent toutefois qu'une application de glutamate sur des neurones pyramidaux isolés ou en culture organotypique stoppent de manière drastique la motilité des épines dendritiques (Fischer 2000). Bien que ces expériences renforcent l'hypothèse d'un lien entre l'activité et la motilité synaptique, elles soulèvent la possibilité que, selon le modèle étudié et l'état développemental des synapses, un même traitement puisse avoir des effets opposés.

Pendant longtemps, il a également été postulé que le nombre d'épines devait augmenter afin de répondre à une hausse de l'activité électrique. Toutefois, diverses études indiquent que ces structures peuvent soit augmenter, soit diminuer selon le degré d'activation synaptique (McAllister et al. 1996, Maletic-Savatic et al. 1999, Rocha et al. 1995, Robinson et al. 1999). De plus, de récentes études indiquent que, dans des tranches d'hippocampe de rat adulte, la formation de nouvelles épines est induite par différents traitements inhibiteurs de l'activité nerveuse tels que : un bloc des canaux sodiques par la TTX, un bloc des récepteurs postsynaptiques par des antagonistes spécifiques (CNQX, APV) ou encore une diminution de l'activité des récepteurs NMDA par diminution du calcium et augmentation du magnésium extracellulaires (Kirov et al. 1999, 1999). Cela suggère que la formation d'épines puisse compenser le manque d'afférences synaptiques. Cette interprétation est toutefois en contradiction avec d'autres expériences montrant qu'une diminution de l'activité provoque une diminution du nombre d'épines : une lésion des afférences hippocampales provoque une diminution du nombre d'épines de la même manière qu'un bloc de la libération vésiculaire par la toxine botulinique ou un bloc des récepteurs AMPA par le NBQX, alors qu'un bloc de l'influx nerveux par la TTX n'induit pas de changement (McKinney et al. 1999). Toutefois, une information importante apportée par cette dernière étude est que les épines dendritiques semblent être maintenues par une activité des récepteurs AMPA, même infime, comme dans le cas de libération vésiculaire spontanée. Cela indique que le neurotransmetteur peut servir de facteur trophique et que son action sur les récepteurs AMPA peut signaler à la cellule postsynaptique qu'une synapse existe. Un tel mécanisme semble également exister au niveau de la jonction neuro-musculaire, où une activation directe du muscle permet d'éviter la rétraction totale des synapses suite à une lésion axonale (Lomo et al. 1972).

Ainsi, il semble que l'activité synaptique puisse influencer autant la forme que le nombre d'épines. La variabilité des réactions à un même traitement pharmacologique ou électrique ainsi que les contradictions d'une étude à l'autre pourraient dépendre du modèle étudié, de son état développemental et physiologique et refléterait ainsi la diversité fonctionnelle des épines selon leur maturation ou leur localisation. Au sein d'une même cellule de Purkinje, par exemple, il a été observé que les épines des dendrites proximales sont maintenues par l'activité électrique, alors que celles des dendrites distales en sont indépendantes (Bravin et al. 1999). Il a également été proposé que le calcium intracellulaire pouvait avoir des effets contradictoires selon sa concentration (Segal et al. 2000, Harris et al. 1999) : une activation synaptique minimale est requise pour maintenir les épines, une augmentation modérée de calcium cause la formation des épines et une forte augmentation cause leur rétraction (Luscher et al. 2000).

Il semble cependant communément admis que, pour des neurones hippocampaux adultes, une augmentation de l'activité induise des modifications morphologiques qui soutiendraient cette augmentation. L'entrée de calcium au niveau postsynaptique pourrait jouer un rôle central dans ce mécanisme.

### *Modifications liées à l'expérience*

Différents types d'expériences acquises, ainsi que l'activité neuronale liée à un comportement complexe peuvent avoir une influence sur la morphologie des épines : l'apprentissage moteur, visuel, olfactif et auditif, la mémorisation spatiale, un environnement matériellement ou socialement complexe ou encore diverses formes de conditionnement.

Un des exemples les plus étudiés est probablement les modifications morphologiques induites par l'exposition d'un animal à un environnement complexe. Chez le rat, plusieurs jours d'entraînement de certaines aptitudes physiques, ou d'exposition à un environnement comportant des objets variés et permettant l'exploration, induisent des modifications majeures de la structure de différentes aires corticales telles que : une augmentation de la longueur et du nombre d'embranchements dendritiques (Volkmar et al. 1972), de la surface de contact entre les cellules gliales et les synapses (Jones et al. 1996), une augmentation du nombre de synapses par neurone et du nombre de synapses perforées (Rampon et al. 2000, Greenough et al. 1978, 1985), du nombre d'épines branchées (Comery et al. 1996), ainsi qu'une augmentation de la taille de la densité postsynaptique (Mollgaard et al. 1971). Des modifications morphologiques similaires ont été observées dans l'hippocampe suite à différents processus d'apprentissage spatial et associatif : une augmentation du nombre de synapses (Moser et al. 1994), du nombre de synapses perforées (VanReempts et al. 1992), une modification du réseau synaptique (Rusakov et al. 1997) et des embranchements dendritiques (Vozech et al. 1996) ou encore une augmentation de la longueur de la densité postsynaptique (Geinisman et al. 2000).

Un autre exemple est la formation du cortex en tonneau. Cette zone du cortex somatosensoriel, où chaque groupe de neurones constituant une structure en forme de tonneau est liée à une vibrisse, est particulièrement sensible à l'expérience chez les mammifères. Chez un rat nouveau-né, si toutes les vibrisses sont coupées sauf une, une grande zone du cortex somatosensoriel va devenir sensible à l'activation de cette vibrisse (Fox et al. 1994), une réorganisation neuronale qui semble dépendre des récepteurs NMDA et probablement de l'expression de la LTP (Schlaggar et al. 1993). De plus, 1 à 3 jours après avoir sectionné une vibrisse, les neurones correspondant montrent une diminution de la motilité de leurs épines dendritiques (Lendvai et al. 2000).

L'apprentissage du chant des oiseaux induit également des modifications structurelles dans le cortex dédié à cette tâche, le centre vocal, telles que la formation de nouvelles synapses (Nordeen et al. 1997). Il est intéressant de voir que le nombre de synapses générées est proportionnel à la complexité de l'apprentissage du chant (Airey et al. 2000), que l'apprentissage se fait, comme chez l'homme pour le langage, plus facilement durant une période postnatale critique, qu'il est limité et que les capacités d'apprendre un nouveau chant ou un nouveau langage sont inhibées par des hormones de la puberté (Doupe et al. 1999).

Un autre modèle d'apprentissage communément étudié est le réflexe conditionné de rétraction du siphon chez l'aplysie, un mollusque marin. Bien que les mécanismes impliqués soient différents de ceux des vertébrés, les mêmes types de modifications morphologiques ont été mis en évidence dans ce modèle : une augmentation du nombre de vésicules et du nombre de boutons axonaux, ainsi que de leur taille (Bailey et al. 1989).

Tout récemment, une modification morphologique inattendue dans le cerveau des mammifères a été mise en évidence dans l'hippocampe suite à l'exposition à un



environnement complexe : la formation de nouveaux neurones. Bien qu'un dogme de la neurobiologie moderne soit que tous les neurones dont dispose un cerveau de mammifère adulte sont présents dès la naissance, il est apparu récemment que de nouveaux neurones peuvent être générés dans différentes aires du cerveau de primates (Gould et al. 1999), dont l'homme (Eriksson et al. 1998) et que cette production puisse être modulée par la complexité de l'environnement (Kempermann et al. 1997, Gould et al. 1999). La fonction et la connectivité de tels neurones sont encore largement inconnues, mais il est fort probable que la neurogenèse contribue aux phénomènes de plasticité des connexions synaptiques et du réseau neuronal nécessaires à l'apprentissage. Elle a en effet déjà observée dans le centre vocal des oiseaux suite à l'apprentissage du chant (Nordeen et al. 1997) et lors du réflexe conditionné de rétraction du siphon de l'aplysie (Glanzman et al. 1990).

#### *Modifications liées à la LTP*

Suite à leurs observations du système nerveux central, Ramon y Cajal (1893) et Tanzi (1893) avaient déjà suggéré que des changements dans le nombre et/ou la morphologie des épines pouvait constituer une base cellulaire de l'apprentissage et de la mémoire. Mais ce n'est qu'à partir des années 1970 qu'apparurent les premières observations de modifications morphologiques consécutives à l'expression de la LTP. Un élargissement de la tête et du cou ainsi qu'un raccourcissement de l'épine dendritique a été observé suite à des stimulations à haute fréquence dans le CA1 de l'hippocampe (Fifkova et al. 1977, 1981). Selon des modèles mathématiques, de telles modifications pourraient induire une réduction de la résistance des courants synaptiques et donc participer à l'augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique (Miller et al. 1985). Ces résultats sont cependant controversés puisqu'ils n'ont pas pu être observés lors d'autres études plus récentes.

Une modification morphologique qui a pu être observée de manière plus fréquente suite à l'induction de la LTP, est une augmentation de la proportion de synapses avec une densité postsynaptique (PSD) perforée (Schuster et al. 1990, Geinisman et al. 1989, 1991, 1992, 1993). Comme nous l'avons vu précédemment, une synapse perforée est définie par la présence d'une discontinuité dans la PSD et donc dans la répartition des récepteurs postsynaptiques. Par reconstruction en 3 dimensions, les travaux de Geinisman (1991, 1992, 1993) ont permis de montrer que cette perforation était principalement de type segmenté. Il a ainsi été proposé un modèle selon lequel une épine de type simple, non perforée, se transformerait en épine de type maculée, puis en U et enfin segmentée (figure 10). Bien que ces résultats représentent un intérêt certain et permettraient d'expliquer dans une certaine mesure le maintien à long terme de la LTP, ils n'ont pas pu être reproduits par des études plus récentes (Sorra et al. 1998).

Toutefois, un aspect technique de ce type d'études morphologiques pourrait expliquer le manque de reproductibilité des résultats d'un laboratoire à l'autre : les analyses ont été effectuées de manière statistique sur des tissus stimulés puis fixés, sans procéder à une identification des synapses activées. Or une étude récente indique que lors de l'induction de la LTP, seules 10 % des synapses totales sont stimulées (Buchs et al. 1996). De plus, si l'on considère que seule une fraction des synapses stimulées exprime des modifications morphologiques, les chances de détecter de tels changements sans identifier les synapses stimulées sont très faibles. Pour tenter de contourner ce problème, notre laboratoire a mis au point une technique permettant de précipiter le calcium et de le rendre électron-dense et donc visible à l'aide du



microscope électronique (Buchs et al. 1994). Cette technique permet de visualiser le calcium sous la forme de granules dans des organelles de stockage ainsi que dans les épines dendritiques suite à l'induction de la LTP. De plus, elle permet de détecter une augmentation, dépendante du NMDA, du nombre d'épines marquées suite à l'induction de la LTP, indiquant que les épines marquées représentent un groupe de synapses ayant une plus forte chance d'avoir été stimulées. A l'aide de ce moyen d'identification, il a été possible de mettre en évidence que la LTP était suivie d'une augmentation de 300 % de la proportion d'épines perforées (Buchs et al. 1996), qui finissent par représenter environ 80 % des synapses stimulées, 30 minutes après l'induction de la LTP. Ce type de synapse présente souvent un spinule s'étendant parfois assez loin dans l'axone, provoquant ainsi une compartimentation marquée des vésicules présynaptiques. Ces synapses possèdent alors de multiples sites de libération vésiculaire, ce qui pourrait leur procurer une plus grande efficacité.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer le rôle des synapses perforées dans l'expression de la LTP est qu'elles représentent une étape intermédiaire dans la formation de nouvelles synapses (Nieto-Sampedro et al. 1982, Carlin et al. 1983, Luscher et al. 2000). Une épine simple, en se fractionnant dans le sens de la longueur, pourrait former une nouvelle épine. Toutefois cette hypothèse reste très controversée, car il n'a pas été possible d'observer des épines de forme intermédiaire entre une épine perforée et deux épines, à savoir des épines branchées dont les deux têtes contactent le même axone. Au contraire, toutes les épines branchées reconstruites en trois dimensions contactent des axones différents (Trommald et al. 1997, Sorra et al. 1998).

Une autre possibilité est que les synapses perforées résultent de l'insertion de récepteurs dans la membrane postsynaptique. En effet, il a été observé que la LTP induit la synthèse de récepteurs AMPA (Nayak et al. 1998) et qu'un bloc de la machinerie postsynaptique responsable de l'exocytose inhibe l'expression de la LTP (Lledo et al. 1998), ainsi que l'expression des récepteurs AMPA à la surface membranaire (Nishimune et al. 1998, Noel et al. 1999, Song et al. 1998). De plus, les épines perforées présentent plus de récepteurs AMPA à leur surface que des épines simples non perforées (Nusser et al. 1998, Desmond et al. 1998). Il est envisageable que l'insertion de récepteurs dans la PSD puisse provoquer un remodelage des membranes postsynaptiques ainsi que du réseau de protéines qui contribuent à assembler les récepteurs en face de la zone active et induire de cette manière une perforation de la densité postsynaptique (Muller et al., sous presse).

Différentes études ont tenté de déterminer si la LTP pouvait induire la formation de nouvelles synapses. Bien que certaines d'entre elles aient pu mettre en évidence une augmentation du nombre de synapses après l'induction de la LTP (Lee et al. 1980, Chang et al. 1984, Desmond et al. 1986) et indiquent que la synaptogenèse semble liée à une phase tardive de la LTP (Weeks et al. 1998, 1999, Geinisman et al. 1996), ces résultats n'ont pas pu être reproduits par d'autres études (Geinisman et al. 1991, Sorra et al. 1998) et restent controversés car ils reposent sur de très faibles différences. Toutefois, de récents travaux menés à l'aide de la microscopie confocale à deux photons ont permis de mettre en évidence que la LTP était suivie par un bourgeonnement des dendrites stimulées (Engert et al. 1999). En inhibant l'expression de la LTP à l'exception d'une petite zone délimitée par le lavage des substances bloquantes à l'aide d'une sonde de microperfusion, ce groupe a observé que les dendrites incluses dans cette zone formaient des petites protrusions de type filopodial, 30 à 60 minutes après induction de la LTP. Ces filopodes n'étaient que rarement

observés hors de la zone où la LTP était possible, indiquant qu'ils étaient liés à la potentiation. Enfin, il est apparu que ce phénomène est extrêmement rapide : 2 minutes environ suffiraient pour former un nouveau filopode. Malheureusement, les techniques employées pour réaliser ce travail ne permettent pas de déterminer si les filopodes aboutissent à la formation d'une synapse mature et fonctionnelle.

Ensemble, ces différentes études indiquent que des traitements aussi variés que des modifications hormonales, des traitements pharmacologiques, des lésions, différentes formes d'apprentissage et d'acquisition d'expérience et la LTP, sont accompagnés de variations de la structure des synapses, qui s'expriment principalement au niveau postsynaptique. De plus, dans toutes ces études, les modifications morphologiques sont invariablement accompagnées de modifications de l'activité et de la transmission synaptique et semblent dépendre plus étroitement de lois dictées par le fonctionnement de la synapse que par le modèle étudié. Il semble enfin que l'expression de ces différentes formes de plasticité synaptique mettent en jeu des mécanismes, autant morphologiques que biochimiques, qui sont impliqués dans l'élaboration des réseaux synaptiques lors du développement du système nerveux central.

Ces observations renforcent l'hypothèse, déjà ancienne, que la structure de la synapse influence sa fonction et que l'utilisation d'une synapse peut, en retour, modifier sa structure.

# **RESULTATS**

## OBJECTIFS ET RESUME DE CE TRAVAIL

Comme mentionné précédemment, une difficulté majeure dans l'étude des modifications morphologiques induite par la LTP réside dans l'identification des synapses potentiées. Afin de contourner ce problème, notre laboratoire a mis au point une technique de microscopie électronique permettant, durant la fixation, de précipiter et ainsi de le rendre visible, le calcium accumulé dans des organelles de stockage. Cette technique s'est avérée particulièrement efficace et a permis, lors d'une première étude, d'identifier et d'observer la morphologie des synapses ayant une forte probabilité d'être stimulées après induction de la LTP dans des cultures organotypiques d'hippocampe. Il a ainsi été possible de déterminer que, 30 minutes après l'induction de la LTP, environ 80 % des synapses stimulées présentaient une perforation de la densité postsynaptique (Buchs et al. 1996).

Le but du présent travail a été dans un premier temps de caractériser le lien entre l'induction de la LTP et la perforation. Plus précisément, il s'agissait de déterminer si la perforation de la densité postsynaptique est effectivement induite par la LTP ou si une stimulation dans des conditions ne permettant pas l'expression de la LTP peuvent également induire des modifications morphologiques des synapses activées.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de caractériser l'évolution temporelle d'une telle modification morphologique. Il s'agissait notamment de déterminer d'une part si les synapses perforées sont issues d'une modification de la densité postsynaptique des épines simples, non perforées et surtout de déterminer si la perforation représente un stade stable, voire final dans la série de modifications morphologiques induites par la LTP.

Enfin, nous avons effectué une étude morphométrique de ces modifications morphologiques, tant en deux dimensions sur des coupes fines de microscopie électronique, que sur des images virtuelles en trois dimensions, reconstruites à partir de coupes sériées.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de deux publications qui sont présentées ici sous leur forme publiée ou soumise.

Dans la première publication, nous présentons nos résultats concernant l'évolution temporelle des modifications morphologiques induites par la LTP. Différentes cultures organotypiques d'hippocampe ont été fixées suite à une potentiation d'une durée allant de 5 minutes à 2 heures et les synapses de la région stimulée, le CA1, ont été classifiées selon leur forme. Conformément aux précédents travaux, nous avons observé une augmentation massive de la proportion de synapses perforées, 30 minutes après induction de la LTP. Cependant, contrairement à nos attentes, les synapses perforées semblaient n'être que transitoires, puisque leur proportion est revenue à un niveau basal après 1 heure. Tout aussi surprenant, il semble que 45 minutes après l'induction de la LTP survient une augmentation de synapses à épines multiples (MSB), dont la proportion atteint un maximum à 1 heure et reste stable en tout cas jusqu'à 2 heures. En reconstruisant ces synapses en 3 dimensions, il s'est avéré que cette augmentation est essentiellement due à des épines dupliquées, c'est à dire provenant de la même dendrite. Enfin, ces modifications morphologiques semblent liées à l'expression de la LTP, car elles ne touchent que les synapses contenant un précipité de calcium et ne sont plus observables lorsqu'une stimulation est effectuée en présence de différents inhibiteurs de la LTP. Ainsi, il semble non seulement que l'induction de la LTP puisse aboutir à la formation de nouvelles synapses d'apparence mature, mais également que ces synapses se forment précisément sur un terminal

axonal activé, permettant de dédoubler une synapse active ce qui pourrait induire une augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique de manière stable.

Cette étude soulève la possibilité que les synapses simples puissent se perforer, puis contribuer d'une certaine manière à la formation des nouvelles épines. Afin d'explorer cette possibilité et d'en mieux comprendre les mécanismes, nous nous sommes intéressés, dans la deuxième étude présentée, à différents paramètres morphologiques des types de synapses observés après l'induction de la LTP. A l'aide de programmes d'analyse morphométrique et de reconstruction tri-dimensionnelle, nous avons mesuré des paramètres tels que la surface de la tête de l'épine, la surface recouverte par la PSD, la longueur du spinule, la forme de la PSD et la présence de vésicules coatées dans l'épine. Il en ressort d'une part que l'augmentation de la proportion de synapses perforées observée 30 minutes après induction de la LTP était essentiellement due à une augmentation de synapses avec des PSD segmentées, c'est à dire entièrement séparées par une zone dépourvue de densité. Ce type particulier de synapses semble caractérisé par un grand spinule associé à la PSD, ainsi que par une forte teneur en vésicule coatées d'exo/endocytose, ce qui suggère que d'intenses mouvements membranaires s'effectuent au sein de ces synapses. Enfin, les épines dupliquées observables dès 45 minutes après induction de la LTP ont une plus petite PSD que les synapses simples et une plus faible proportion de synapse perforée, ce qui pourrait être un signe de leur relative immaturité. Ainsi, il semble que la LTP induise un remodelage de la PSD et des membranes postsynaptiques, qui pourrait aboutir à la duplication des épines.

# **PARTIE I**

## **LTP PROMOTES FORMATION OF MULTIPLE SPINE SYNAPSES BETWEEN A SINGLE AXON TERMINAL AND A DENDRITE**

Nicolas Toni, Pierre-Alain Buchs, Irina Nikonenko,

Christophe Bron and Dominique Muller.

Nature, 1999, vol. 402 (6760) 421-25.

## **Abstract**

Structural remodelling of synapses (Calverley et al. 1990, Geinisman et al. 1991, 1993, Buchs et al. 1996) and formation of new synaptic contacts (Geinisman et al. 1996, Bolshakov et al. 1997, Maletic-Savatic et al. 1999, Engert et al. 1999) has been postulated as one possible mechanism underlying the late phase of long-term potentiation (LTP), a form of plasticity involved in learning and memory (Bliss et al. 1993). Here we used electron microscopy to analyse the morphology of synapses activated by high frequency stimulation and identified by the presence of calcium accumulated in dendritic spines. We report that LTP induction resulted in a sequence of morphological changes consisting of a transient remodelling of the post-synaptic membrane followed by a marked increase in the proportion of axon terminals contacting two or more dendritic spines. Three-dimensional reconstruction revealed that these spines essentially arose from the same dendrite. Since pharmacological blockade of LTP prevented these morphological changes, we conclude that LTP is associated with the formation of new, mature and probably functional synapses contacting the same pre-synaptic terminal, thereby duplicating activated synapses.

## Results

Electron microscopic analyses of the morphological changes associated with LTP are difficult without identification of activated synapses (Sorra et al. 1998). Here we used a potassium chromium-trisoxalate precipitation protocol during osmium fixation (Buchs et al. 1994) to reveal, under the form of a fine precipitate, the calcium accumulated in dendritic spines following high frequency stimulation (fig. 1a). Previous work had shown that this method is specific for calcium, that the precipitate is only present in a small proportion of spine profiles under control conditions, and that theta burst stimulation (TBS) to a group of CA3 neurones results in an NMDA-dependent increase in the number of CA1 spine profiles containing calcium precipitate (Buchs et al. 1996) (fig. 1b). Analysis of the precipitate density in spine profiles (fig 1c) shows a bimodal distribution with a clear distinction between labelled (black columns) and unlabelled (grey columns) profiles. The small number of profiles for which classification was unclear (open column, 1-2%) were discarded from quantitative analyses.

Using this approach, we examined the ultrastructural correlate of LTP as a function of time after induction of synaptic potentiation. LTP was induced at a group of synapses by application of TBS, responses were monitored during various periods of time (5, 15, 30, 45, 60 and 120 min) and a second TBS was applied 5 min before fixation to the same group of fibres to re-label the same synapses with calcium precipitate (fig. 1d). The first major change observed in the population of labelled dendritic spines was an increase in the proportion of spine profiles with a partitioned, post-synaptic density (PSD), also referred to as perforated synapses (Calverley et al. 1990, Geinisman et al. 1991, 1993, Buchs et al. 1996, Sorra et al. 1998, Buchs et al. 1994) (fig. 2a,b). The proportion of perforated synapses was  $18.8 \pm 1\%$  in non-stimulated cultures and it increased gradually to represent  $23.4 \pm 3.5\%$ ,  $25 \pm 2.4\%$  and  $45.8 \pm 2.8\%$  of all labelled synaptic profiles at respectively 5, 15 and 30 min after stimulation (n=3-7; 220-949 spine profiles (sp) analysed). Surprisingly, the occurrence of these perforated synapses was only transient: their proportion decreased to  $28.6 \pm 7.7\%$  after 45 min to reach control values after 60 min ( $18.1 \pm 2.6\%$ ). Unbiased stereological measurements confirmed these changes ( $15 \pm 2\%$ ,  $38 \pm 2\%$  and  $15 \pm 5\%$  at 5, 30 and 60 min respectively; n=2; 65-112 sp). These changes were not detected when analysing non-labelled synapses ( $22.7 \pm 1.1\%$ , n=6, 246 sp), and were accompanied by transitory modifications in the perforation characteristics. Figure 2e shows that the size of the perforation and of the spinule, characterised by a small protrusion of the post-synaptic membrane into the pre-synaptic terminal (fig. 2f), was considerably larger 30 min after stimulation versus other time points (perforation size :  $284 \pm 29$  nm at 30 min versus  $157 \pm 19$  nm or  $145 \pm 14$  nm at 0-15 min and 45-120 min respectively, n=5-8; spinule height :  $167 \pm 28$  nm versus  $62 \pm 4$  nm, and  $74 \pm 5$  nm; n=5-11).

One hour after stimulation, another morphological change was reliably detected. It consisted of a three fold increase in the proportion of multiple spine boutons (fig. 2c,d). These were characterised by the presence of at least two dendritic spines contacting the same axon terminal. Under control conditions, when analysing non-stimulated slices, the proportion of multiple spine boutons represented  $5.6 \pm 1.2\%$  of labelled spine profiles. A similar value was found 5, 15 and 30 min after high frequency stimulation ( $7.3 \pm 1.8\%$ ,  $8 \pm 1.2\%$  and  $7.3 \pm 1.2\%$  respectively; n=3-7; 206-364 sp). However, 45 min after LTP induction, the proportion of labelled, multiple spine boutons in which either one or both spine profiles contained the precipitate



represented  $13 \pm 1.5\%$  of all labelled spine profiles analysed, a value reaching  $16.8 \pm 2.1\%$  one hour after LTP induction and  $14.2 \pm 2.3\%$  after 2 hours ( $n=3-4$ , 223-308 sp). No increase was detected when analysing non-labelled synapses ( $5.9 \pm 0.7\%$  60 min after LTP,  $n=3$ , 323 sp).

To confirm these results, we also used unbiased stereological methods. Analyses were made 5 min and 60 min after LTP induction and showed the same increase in multiple spine boutons (5 min :  $6.2 \pm 0.4\%$ ,  $n=2$ , 64 sp; 60 min :  $15 \pm 2.5\%$ ,  $n=2$ , 119 sp). In addition, to establish further the link between LTP induction and these morphological changes, we carried out experiments in which LTP was pharmacologically blocked by treatment with the calcium/calmodulin protein kinase II antagonist KN93 (fig. 1d). Labelling of spine profiles was not affected by KN93 treatment (fig. 1b), but the increase in perforated synapses and multiple spine boutons was not detected 30 and 60 min after stimulation, respectively (fig. 3). Taken together, these data indicated that the morphological changes reported here were specifically associated with induction of LTP.

As the increase in multiple spine boutons suggested a process of synaptogenesis, we proceeded to three-dimensional reconstruction of 75 multiple spine boutons to analyse the origin of the newly formed dendritic spines (fig. 4). Analysis of unlabelled multiple spine boutons reconstructed 5, 45 and 60 min after stimulation revealed, in agreement with previous studies (Sorra et al. 1993), that in  $89 \pm 8\%$  of cases the two spines arose from different dendrites (mean  $\pm$  SEM of 6 cultures, but a total of 38 out of 41 reconstructed boutons; fig. 4a,b). A similar situation was found when analysing labelled multiple spine boutons reconstructed from a slice culture fixed 5 min after stimulation (spines arose from different dendrites in 8 out of 9 cases). In marked contrast, however, reconstruction of 25 labelled multiple spine boutons from 4 cultures fixed 45-60 min after LTP induction revealed that in 15 of them the two spines arose from the same dendrite. The mean proportion of multiple spine bouton in which the two spines arose from the same dendrite was thus  $66 \pm 14\%$  in 4 cultures as compared to  $11 \pm 8\%$  for unlabelled multiple spine boutons ( $n=6$ ;  $p < 0.01$ ). As illustrated in figure 4a, the increase in multiple spine boutons measured on single sections essentially resulted from cases in which the two spines arose from the same dendrite (fig. 4c,d,e). The occurrence of this new population of duplicated synapses thus clearly suggested a process of synapse formation between the same axon terminal and dendrite.

The morphology of these newly formed spines was similar to that of mature dendritic spines (fig. 4e). They had well defined necks and spine heads, sometimes including a spine apparatus, and a clearly visible PSD facing a pool of pre-synaptic vesicles. Furthermore, for the labelled multiple spine boutons observed after 45-60 min and contacting spines originating from the same dendrite, serial section analysis indicated that in 9 out of 15 cases, calcium precipitate was clearly visible in both spines. Such cases were also frequently observed on single section analyses, strongly suggesting that a significant fraction of the new spine synapses formed 1 hour after LTP induction made mature and functional synapses.

Through the use of a calcium precipitation method to identify a subset of synapses likely to represent activated synapses, the present study provides strong evidence supporting the conclusion that the late phase of LTP is associated with the formation of new, mature and functional spine synapses contacting the same pre-synaptic terminal.

One potential source of error in this study may come from selection biases. The calcium precipitate is primarily associated with smooth endoplasmic reticulum-like structures that has been shown to be unevenly distributed among different types of synapses (Spacek et al. 1997). Furthermore, activity-dependent changes in size of either the spine head, PSD, perforation or smooth endoplasmic reticulum may affect quantitative results and particularly estimates of the proportion of perforated synapses (Calverley et al. 1990, Geinisman et al. 1991). It seems, however, unlikely that these possible biases would have modified the main conclusions of the study. First, all data were obtained by analysing at different times the same population of synapses, i.e. labelled spine profiles and strong evidence suggests that these mainly represented activated synapses (Buchs et al. 1996). Second, the major finding of the study, i.e. the increase in the proportion of multiple spine boutons 60 min after LTP induction, was observed using single section analyses, unbiased stereological methods and three-dimensional reconstruction. Third, these morphological changes were time-dependent and thus unrelated to the protocol used. Fourth, they were prevented by pharmacological blockade of LTP and thus specifically associated with LTP. Finally, the conclusions made in the present study are consistent with the results of many other studies (Geinisman et al. 1996, Bolshakov et al. 1997, McKinney et al. 1999) and in particular with the recent confocal microscopic demonstration of the occurrence of dendritic protrusions and spine-like structures following LTP induction (Maletic-Savatic et al. 1999, Engert et al. 1999).

An important information added by the present study is that the new spines appearing after LTP induction include adjacent, mature synapses that contact the same pre-synaptic terminal. Note, however, that spine density was not directly assessed here and that new spines that would not share the same pre-synaptic bouton would not have been detected. These data nevertheless strongly suggest that LTP include a process of duplication of synaptic contacts between an activated axon and a dendrite. Furthermore, the analysis of the presence of calcium precipitates in the spines arising from the same dendrite strongly suggests that at least some of these newly formed synapses were functional. This mechanism could thus contribute to the stability of LTP and at the same time account for its synapse-specificity. From a quantitative point of view, the numbers reported here suggests that newly formed synapses could represent up to 20% of stimulated synapses. This value is even likely to be underestimated, since newly formed synapses not sharing the same pre-synaptic bouton could not be detected.

An intriguing issue, however, is whether new synapses could have also been formed with other non-stimulated axon terminals. It is of interest that the increase in multiple spine boutons observed following LTP induction only concerned labelled spines and not unlabelled spines. Furthermore, we did not detect any increase in multiple spine boutons in which the two spines arose from different dendrites, i.e. the only situation which could eventually have reflected non-specific synaptogenesis. Other studies, however, will be required in order to establish this point further.

Another interesting aspect of the present results concerns the time course of the morphological changes. The multiple spine boutons reported here were first detected to occur 45-60 min after induction, a time course which is consistent with the occurrence of the new spines observed by Engert and Bonhoeffer (Engert et al. 1999). Maletic-Savatic et al. (Maletic-Savatic et al. 1999), however, reported a rapid occurrence of dendritic protrusions (within a few minutes) following high frequency stimulation. Such changes were not observed, although only structures defined by a

clearly identified post-synaptic density were analysed. They could have thus remained undetected if the dendritic protrusions observed rapidly after stimulation did not exhibit all features of mature synapses (Fiala et al. 1998, Ziv et al. 1996). The most rapid changes observed here were a transient increase in perforated synapses. How this morphological change relates to the dendritic protrusions and the subsequent formation of multiple spine boutons remains unclear (Sorra et al. 1998, Trommald et al. 1997). Perforated synapses could represent an intermediate step in the process of synapse formation and spine splitting (Carlin et al. 1983, Nieto-Sampedro et al. 1982). They could also simply reflect the membrane dynamics and receptor turn-over occurring at that time at activated synapses (Fischer et al. 1998, Shi et al. 1999, Liao et al. 1999). It is of interest that the sequence of events reported here at the ultrastructural level remarkably coincides with the changes reported to occur with synapse turnover and formation of new synaptic contacts in several other in vitro models (Carlin et al. 1983, Nieto-Sampedro et al. 1982, Woolley et al. 1996, Kirov et al. 1999).

Taken together, these results argue for the interpretation that the late phase of LTP is associated with the formation of new and possibly functional synapses between an activated terminal and its target cell. This mechanism of synapse duplication maintains specificity in information processing and provides a framework for understanding the numerous in vivo experiments that have demonstrated an increase in synapse number and complexity of dendritic arborization following exposure to an enriched environment or learning paradigms (Moser et al. 1994, Kleim et al. 1997).

## **Methods**

### *Cultures preparation and stimulation.*

Experiments were performed on hippocampal organotypic cultures prepared as described (Stoppini et al. 1991) and maintained 12 days in culture. LTP was induced using theta burst stimulation (TBS), a pattern consisting of five bursts at 5 Hz, each burst composed of four pulses at 100 Hz, repeated twice at 10 sec interval. To re-label activated synapses at the end of the experiments, a second theta burst was re-applied to the same group of afferents 5 min before fixation (Buchs et al. 1996).

### *Morphological analyses.*

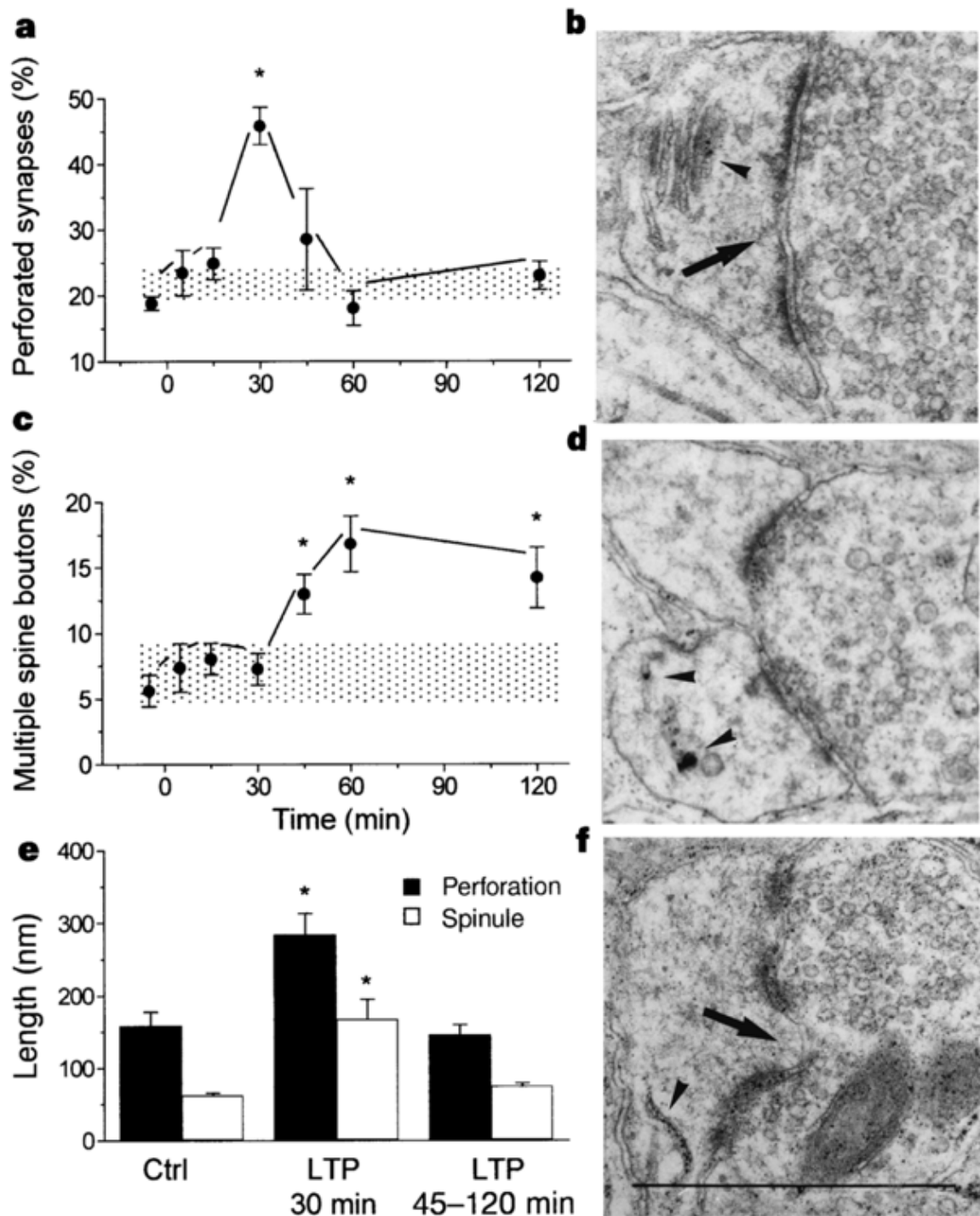
Slices were fixed for electron microscopy as previously described (Buschs et al. 1996). For serial sections (ultratome Ultracut-E, Reichert-Jung), en bloc staining was realised first with 0.5% uranyl acetate in H<sub>2</sub>O (pH 3.9) during 20 min before dehydration, then with 30 min of 2% uranyl acetate in ethanol after dehydration. Five to six sections per culture were usually examined with a Philips CM10 electron microscope at 80 kV. Synapses were randomly photographed at a magnification of 28,500x in an area corresponding to the middle portion of the apical arborization of CA1 pyramidal neurones. Images were digitised and dendritic spine profiles were classified blind by at least 2 independent observers as either labelled or unlabelled using as criteria the presence of accumulated electron-dense calcium precipitates in the spine head profile. In addition, we determined by densitometry the area of precipitate per spine profiles (precipitate density; fig. 1c). The results of the analyses made by the two observers and by densitometry were in perfect agreement, with the exception of a small number of profiles (1-2%) that were discarded from quantitative analyses (open column, fig. 1c). Synapses were identified by the presence of a definite

post-synaptic membrane thickening and at least three pre-synaptic vesicles. Perforated synapses were identified by the presence of a discontinuity in the PSD and multiple spine boutons by the presence of at least two separate dendritic spines contacting the same pre-synaptic bouton. For three-dimensional analyses, ribbons of up to 60 serial sections were cut for each culture. Synaptic profiles corresponding to multiple spine boutons in which spines were clearly labelled or unlabelled were identified on the test section and then photographed serially at a magnification of at least 16,000x. For each slice culture, 3-13 labelled or unlabelled multiple spine boutons were reconstructed and the proportion of boutons where the two spines arose from the same dendrite was calculated. For the stereological part of the study, the dissector procedure was carried out as described (Sterio et al. 1984). The proportion of labelled perforated synapses and multiple spine boutons was determined by systematic random sampling on 6 dissector pairs in each block, using calcium precipitate as counting unit. All results presented in this study are expressed as mean  $\pm$  SEM, with n indicating the number of slice cultures and sp the number of spine profiles analysed. Statistical analyses were carried out using the Student's t-test or Mann-Whitney test.

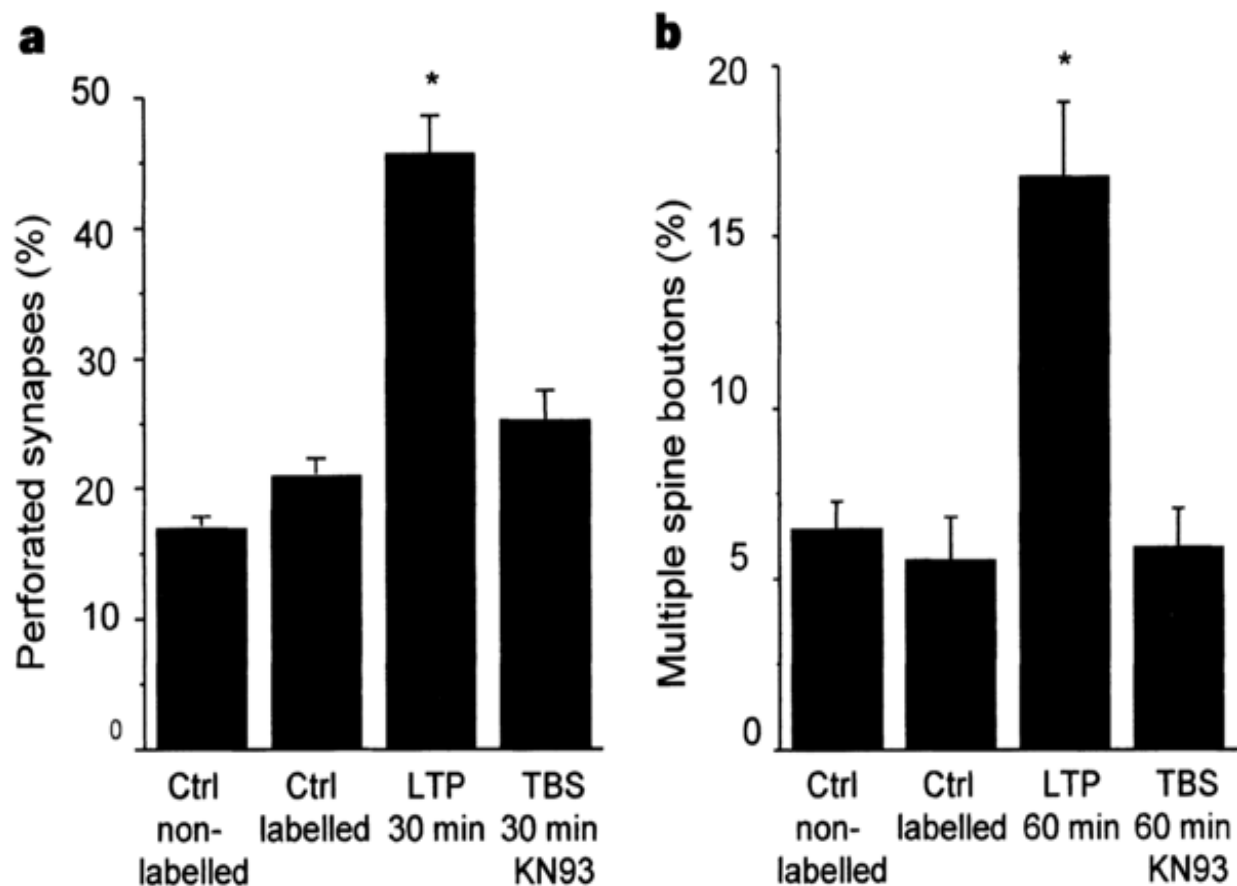
### **Acknowledgements**

The authors wish to thank Dr. L.M. Cruz-Orive for helpful advice in stereology, Dr. K. Harris for 3D reconstruction software, D. Smithies for morphometry software on AVS, L. Parisi and M. Moosmayer for culture preparation and technical assistance, and F.Pillonel for photographic work. This work was supported by the Swiss National Science Foundation, the Human Frontier Science Program, the National Priority Program and the Jean-Falk Vairant Foundation.

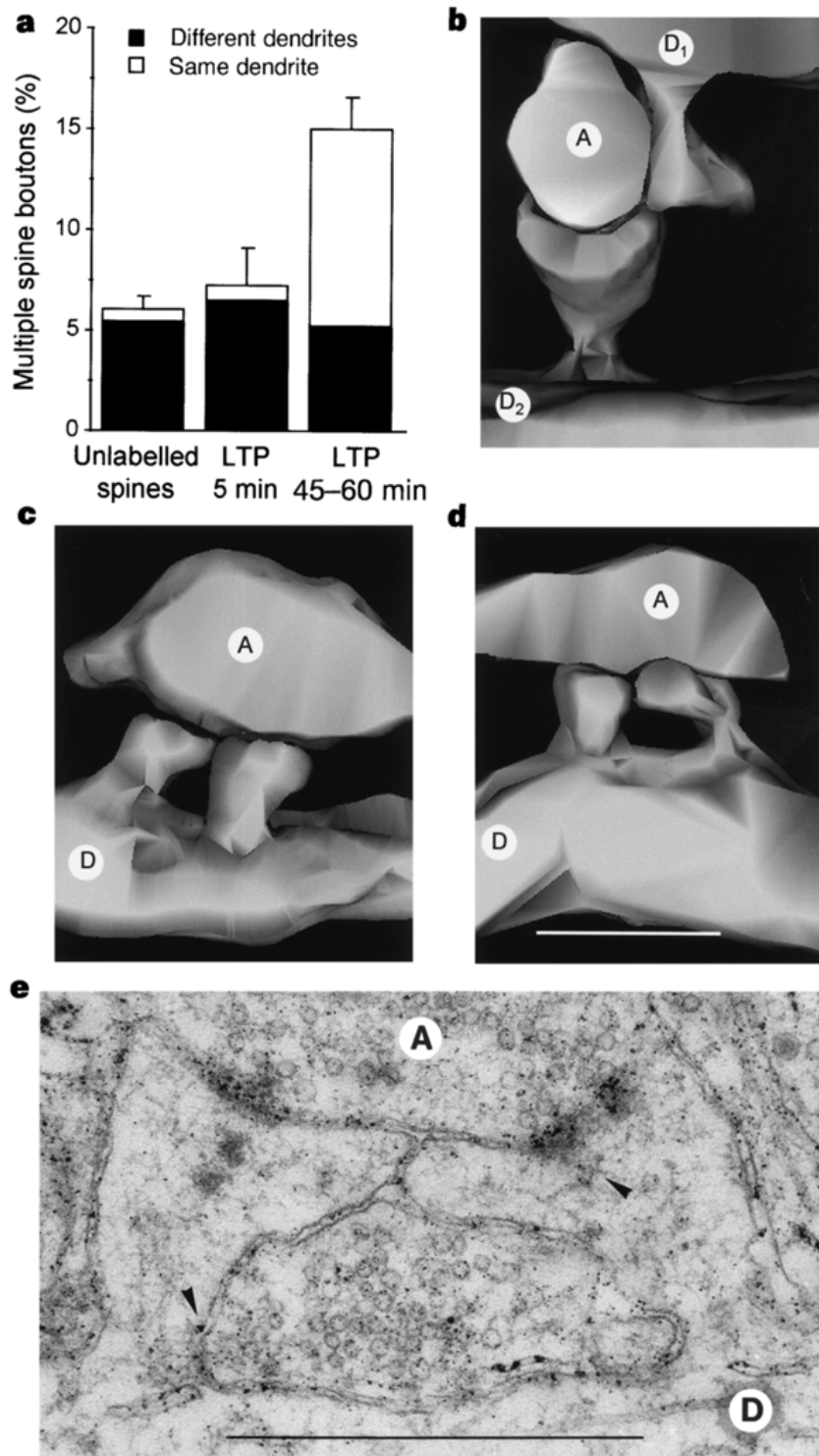




**Figure 2** : Time course of ultrastructural changes associated with LTP induction. **a** : Illustration of the transient changes in the proportion of perforated synapses ( $n=3-7$ ; 220-630 sp, star:  $p<0.001$ ). **b** : Illustration of a perforated spine profile (arrow on the perforation). **c** : Increase in the proportion of multiple spine boutons 45-60 min after LTP induction ( $n=3-7$ ; 206-364 sp, star:  $p<0.01$ ). **d** : Illustration of a multiple spine bouton. **e** : Morphometric changes in the size of the perforation and spinule after LTP induction ( $n=5-11$ ; 65-149 sp, star:  $p<0.01$ ). **f** : Illustration of a perforated synapse exhibiting a prominent spinule (arrow). Calcium precipitates are indicated by arrowheads. Bar :  $1\mu m$ .



**Figure 3** : Blockade of LTP prevents morphological changes. **a** : Proportion of perforated spine profiles observed under control conditions (labelled and unlabelled spine profiles in non-stimulated cultures ( $n=3-4$ , 319-630 sp)), 30 min after LTP induction ( $n=4$ , 358 sp) and following high frequency stimulation in the presence of  $10 \mu\text{M}$  KN93 ( $n=4$ , 313 sp). **b** Proportion of multiple spine boutons under control conditions (labelled and unlabelled spine profiles in non-stimulated cultures ( $n=3-4$ , 319-630 sp)), 60 min after LTP induction ( $n=4$ , 308 sp) and following high frequency stimulation in the presence of  $10 \mu\text{M}$  KN93 ( $n=3$ , 183 sp). The changes in both perforated synapses and multiple spine boutons were blocked by KN93 treatment (star:  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively).



**Figure 4** : Three-dimensional reconstruction of multiple spine boutons. **a** : Graph illustrating the proportion of multiple spine boutons measured on single sections. For each column, we calculated from three-dimensional reconstruction the repartition between boutons in which the two spines arose from different (black) or the same (white) dendrite (see text for numbers and proportions). **b** : Illustration of a reconstructed, unlabelled multiple spine bouton in which the two spines arise from different dendrites. **c-d** : Labelled, multiple spine boutons observed 60 min after LTP induction in which the two spines arise from the same dendrite. Axons are indicated by “A” and dendrites by “D”. **e** : Photograph illustrating two spines originating from the same dendrite (arrowheads: precipitate, unfortunately mainly present on another section). Bars : 1  $\mu$ m.



## **PARTIE II**

### **REMODELING OF SYNAPTIC MEMBRANES FOLLOWING LTP INDUCTION**

Nicolas Toni, Pierre-Alain Buchs, Irina Nikonenko, Lorena Parisi, Patrisia

Povilaitite and Dominique Muller

Article soumis à “Journal of Neuroscience”

## **Abstract**

Induction of long-term potentiation (LTP) in the CA1 hippocampus is associated with a structural remodeling of synapses, characterized by a transient increase in the proportion of perforated synapses followed by a later occurrence of multiple spine boutons (MSBs), where the two spines arise from the same dendrite. To investigate the possibility of a sequential transformation of a simple synapse into these different synaptic types, we measured here various parameters of activated synapses at different times after LTP induction.

Single section analyses of calcium labeled spine profiles show an increase of the spine head area, postsynaptic density (PSD) length and proportion of spine profiles containing a coated vesicle 30 minutes, but not 1-2 hours after LTP induction. Three-dimensional reconstruction of 133 synapses indicates that the spine head area, postsynaptic density area and proportion of spines with coated vesicles is about 3 times larger for perforated versus simple synapses. Furthermore, the increase in perforated synapses observed 30 min after LTP essentially results from synapses exhibiting segmented, completely partitioned PSDs. These are also characterized by the largest spine head and PSD areas and the highest occurrence of large spinules and coated vesicles. In contrast, MSBs with duplicated spines only rarely include perforated PSDs, and their PSD, taken individually, is smaller than that of simple synapses, thereby suggesting features of immaturity. These results support therefore the notion that the transient increase in perforated synapses after LTP induction reflects a mechanism of synaptic membrane remodeling that may lead to PSD and spine enlargement and eventually formation of MSBs with duplicated spines.

## Introduction

Evidence from recent work has shown that synapses are characterized by continuous shape changes that require actin polymerization (Fischer et al., 1998) and may depend upon activity (Matus, 1999, 2000, Segal et al., 1999; Luscher et al., 2000). Intracellular calcium through NMDA receptor activation or release through internal stores may also affect spine morphology (Korkotian & Segal, 1999). In addition, activity appears to result in modifications of spine number. Agonist or antagonist modulation of excitatory transmission or even just through preparation of hippocampal slices affects spine density (McKinney et al., 1999; Kirov and Harris, 1999; Kirov et al., 1999). Furthermore, application of high frequency trains that induce long-term potentiation trigger the growth of filopodia (Maletic-Savatic et al., 1999), or even dendritic spines-like structures (Engert and Bonhoeffer, 1999). Consistent with these reports, we recently found using an electron microscopic analysis of activated synapses, that LTP induction in organotypic slice cultures resulted in a sequence of morphological changes including a transient increase in the proportion of perforated synapses, followed, at a later time, by images of duplicated synapses (Toni et al., 1999).

Whether and how these morphological changes relate to the increase in synaptic efficacy remains however unknown. One interesting possibility is that the increase in perforated synapses observed during the first half hour after LTP induction somehow correlates with the mechanisms of receptor recycling suggested by physiological experiments (Luscher et al., 2000). Analyses of the mechanisms contributing to LTP point to an important role played by postsynaptic AMPA receptors. In addition to a phosphorylation dependent modification of the receptor properties (Barria et al., 1997; Derkach et al., 1999; Benke et al., 1999), much evidence suggests that LTP also depends upon an increased expression of the receptor (Luscher et al., 2000). Interference through peptides or toxins with the mechanisms of exo- or endocytosis affects LTP or LTD induction and results in modifications of AMPA receptor mediated synaptic responses (Lledo et al., 1997; Nishimune et al., 1998; Luscher et al., 1999). Thus exo/endocytotic mechanisms could both contribute to the changes in synaptic function as well as mediate the membrane recycling process underlying the structural re-organization of the synapse (Maletic-Savatic and Malinow, 1998). This hypothesis is in accordance with the observation that perforated synapses have a higher AMPA receptors immunoreactivity than non-perforated synapses (Desmond et al. 1998). Another interesting possibility is that perforated synapses represent an intermediary step in a process of spine duplication (Nieto-Sampedro et al. 1982, Carlin and Sikievitz, 1983). This possibility however has been questioned (Sorra et al., 1998) and the mechanisms through which this would occur remain unclear. To address these issues, we used here electron microscopy and 3 dimensional reconstruction of 133 activated synapses and compared parameters such as the spine head area, PSD area, PSD distribution, presence of spinules and of coated vesicles among the different types of synapses observed following LTP induction.

## Results

Organotypic slice cultures prepared from 7 day old neonate rats received a theta burst stimulation and were fixed at different times after LTP induction using a protocol that reveals, under the form of a fine precipitate, the presence of calcium accumulated in subcellular structures. Previous works showed that this approach allowed us to identify a subset of labeled spine profiles (about 12-15% of all profiles) likely to represent stimulated synapses. In the present study, controls consisted of either non labeled synapses, labeled synapses from slices stimulated in presence of KN-93, a calcium/calmodulin dependent protein kinase II antagonist that prevents LTP induction and the morphological changes (Toni et al. 1999), or from slices fixed 5 minutes after LTP induction, a time where morphological modifications have not yet occurred. Under these control conditions, spines with single postsynaptic density (PSD) represented by far the majority of labeled synaptic profiles ( $70.4 \pm 2.3\%$ , fig. 1A, B). Their proportion, however, decreased markedly 30 minutes after LTP induction ( $46.9 \pm 2.8\%$ ), due to an increase in the proportion of perforated synapses, i.e. synapses characterized by a discontinuity in the PSD (from  $22.4 \pm 2.3\%$  to  $45.8 \pm 2.8\%$ , fig. 1A, B). The proportion of perforated synapses almost completely recovered 45 minutes to two hours after LTP induction, and they were, to some extent, replaced by images of multiple spine boutons (MSBs), defined by the presence of two spines contacting the same presynaptic terminal (fig 1A). Previous work carried out using 3 dimensional reconstruction provided evidence that the MSBs observed at that time after LTP induction mainly represented MSBs where the two spines arose from the same dendrite and were thus called duplicated spines (Toni et al., 1999, fig. 4A).

As shown on figure 1C, these sequential changes in synaptic types also correlated with modifications of morphometric parameters of labeled spine profiles such as the spine head area, the PSD length or the proportion of spine profiles containing at least one coated vesicle. All these parameters increased 30 min after LTP induction and then recovered to control or even slightly lower values. These changes essentially reflected the variations in the proportion of the different synaptic types illustrated in figure 1B, and particularly the increase in the proportion of perforated synapses. This is indicated by the fact that the three types of spines showed constant dimensions and coated vesicle content over time. Thus the major change observed 30 min after LTP induction is an increase in the proportion of perforated synapses.

To further investigate the role played by perforated synapses and better understand their morphological organization, we measured these parameters using 3 dimensional reconstruction. The parameters analyzed included the surface area of the spine head and of the PSD, the PSD shape, the presence and distribution of coated vesicles within the spines and the occurrence of spinules. In figure 2, we compared these parameters obtained from 43 perforated synapses with those of 31 synapses with a single PSD, referred to as simple synapses. As expected from previous work, perforated synapses were characterized by a much larger spine size, a larger PSD size and a higher proportion of spines containing one or several coated vesicles. Interestingly, the ratio of these values for perforated over simple synapses is fairly constant for all three types of measurements (2.9, 3.1, 3.4 respectively) suggesting that they are proportionately related. Also the ratio of PSD versus spine membrane area is very similar for perforated and simple synapses (11.3% versus 10.7%), despite a marked difference in the size of the spine.

We then investigated whether the characteristics of the perforated synapses seen 30 min after LTP induction were similar to those of perforated synapses observed under

control conditions. For this, we compared the parameters of 20 perforated synapses reconstructed from serial sections 30 min after LTP induction with those of 23 perforated synapses obtained from slices fixed 5 or 60 min after stimulation, a time where the proportion of perforated synapses has not yet increased or has already returned to basal values. Consistent with the results obtained with 2-dimensional analyses, the dimensions of perforated synapses (spine area and PSD area) did not vary with time after LTP induction and were similar to the values showed in figure 2. However, as illustrated in figure 3, perforated synapses observed 30 min after LTP induction differed from control perforated synapses in several other ways. First, perforated synapses observed 30 min after LTP induction were characterized by a significantly increased proportion of synapses containing one or several coated vesicles (fig 3B; 55% versus 34% in control synapses). These vesicles were usually located in the center of the spine head (50% of cases), but they could also be seen in contact with or emerging from the spine apparatus (fig 4; 6%), closed to or fusing with the synaptic membrane (44% of cases), including in the area of the PSD (fig 4, 12%). Although their occurrence was higher 30 minutes after LTP induction, these coated vesicles were similarly located in all perforated synapses. The second important difference between labeled perforated synapses observed 30 min after LTP induction and those reconstructed from control situation concerned the distribution of the PSD. Perforated synapses have been classified in 3 major types depending on the organization of the PSD (see figure 4). Thus the PSD can be horseshoe shaped, fenestrated with a central macular zone lacking PSD or segmented if the PSD is completely partitioned by a traversing perforation. As shown on figure 3A, perforated synapses under control condition were mostly of the fenestrated or horseshoe type (17% of segmented PSD; n=23). In contrast however, perforated synapses 30 min after LTP induction were mainly of the segmented type with two completely partitioned PSDs (45%; n=20; p<0.05). When considering the relative repartition of these different types of perforated synapses, it appears clearly that the increase in the proportion of perforated synapses observed 30 minutes after LTP induction was essentially due to completely partitioned, segmented synapses (fig 3C).

To further characterize these different types of perforated synapses, we then compared the various synaptic parameters of 3 dimensionally reconstructed segmented and non-segmented perforated synapses. These results are illustrated in figure 5. They show that segmented perforated synapses are not very different from non segmented perforated synapses by their size: they tend to have spine head areas and PSD areas slightly larger than those of horseshoe type and particularly fenestrated synapses. However the differences are small and not statistically significant (fig 5A). In contrast, however, they differ by the distribution of the PSD (fig. 4), by the proportion of spines containing coated vesicles (fig 5A), and by their tendency to exhibit large spinules associated with the perforation (fig 5B). Spinules are small finger-like protrusions of the postsynaptic membrane into the presynaptic ending (fig. 4). The size of these protrusions was determined here by measuring their maximal length and they were classified as small when smaller than 0.2  $\mu\text{m}$ , or large for sizes over 0.2  $\mu\text{m}$ . As shown in figure 5B, fenestrated perforated synapses, in their majority, did not contain spinules, and if present, they were almost systematically of a small size. In contrast, segmented perforated synapses, in addition to having clearly separated PSDs, usually also exhibited a spinule, which in most cases was characterized by a large size. Horseshoe-type perforated synapses somehow represented an intermediary stage, since most of them contained a spinule of small size. These results indicate that the segmented perforated synapses observed 30 min after LTP represent a synaptic type

characterized by a high probability of exhibiting coated vesicles and large spinules associated with the PSD, two features indicative of synaptic membrane remodeling. We then also analyzed the characteristics of MSBs, the third type of synapse found to appear 1-2 hours after LTP induction. Previous work carried out using 3-dimensional reconstruction showed that the spines contacting such MSB originated from the same dendrite and were thus referred to as duplicated synapses. These duplicated synapses are constituted of two individual synapses that always exhibited all features of mature synapses. However, when comparing them with simple synapses, two major differences could be observed. First, duplicated synapses are characterized by smaller PSDs than simple synapses. In average, the PSD of a duplicated synapse represented approximately 76% of the size of the PSD of a simple synapse (fig 6). The size of the spine, as indicated by the surface area of the spine head, was also slightly reduced and as a result, the ratio of the PSD surface to the spine head surface was smaller than that of simple and perforated synapses. This ratio indicates that duplicated synapses have proportionately less PSD per synaptic membrane area. A second interesting observation with regard to duplicated synapses is that they rarely exhibited perforated PSDs. The proportion of perforated PSD amongst duplicated synapses was 10 % of the total number of spines (n=30). This value is lower than that of control synapses as measured on single sections ( $22.4 \pm 2.2\%$ , n=2158) or that of reconstructed MSBs formed by spines arising from different dendrites (23 %; n=30).

## Discussion

Through an analysis of the characteristics of the various types of synapses observed following LTP induction, the present study aimed at better understanding the relationship between these morphological changes and their possible significance with regard to LTP mechanisms. These analyses point to three main observations. First, the transient increase in perforated synapses found to occur 30 min after LTP induction essentially results from an increased proportion of segmented, perforated synapses with fully partitioned PSDs. Second, these synapses are characterized by a high proportion of coated vesicles and large spinules associated with the PSD, two features strongly suggesting that they are undergoing a process of synaptic membrane remodeling. Third, the MSBs formed by duplicated spines and found to occur 1-2 hours after LTP induction differ from simple synapses in that they exhibit smaller PSDs and only rarely include spines with perforated synapses, indicating that they are relatively immature. Taken together, these data support the hypothesis that LTP involves a process of synaptic membrane remodeling that underlies or lead to the sequential transformation of a synapse into these different synaptic types.

The characteristics of perforated synapses have been examined in several previous studies using either single section, stereological analyses or 3-dimensional reconstruction (Harris et al., 1989, 1992; Geinisman et al., 1987, 1989, 1991, 1993; Itarat and Jones, 1992; Calverley 1987, Jones and Calverley 1991). These studies showed that perforated synapses exhibit spine heads and PSDs considerably larger than those of simple synapses, a result confirmed here. From a quantitative point of view, the data obtained here perfectly coincide with those previously published by Harris et al. (1992). They indicate that perforated synapses have a spine head surface area and PSD area about 3 times greater than those of simple synapses. As previously noted (Harris et al., 1989), the ratio of PSD over spine membrane area appears to be a very constant parameter, despite the large differences in size between perforated and simple synapses. Furthermore the proportion of synapses that contain coated vesicles is also about 3 times larger for perforated than for simple synapses, and thus varies linearly with the spine membrane area or the PSD size. Thus everything occurs as if perforated synapses just represent a three fold expansion of the membrane components of a simple synapse. If, as proposed by several studies, perforated synapses are formed by enlargement and perforation of a simple synapse (Nieto-Sampedro et al., 1982; Carlin and Siekivitz, 1992), then the addition of membrane components must involve constant proportions of non-synaptic membrane, PSD membrane and intracellular vesicular membrane. It is interesting in this regard, that recent work on axonal transport suggests that formation of functional presynaptic release sites occurs through the insertion in the presynaptic membrane of pre-assembled packages containing many or all of the components of a presynaptic active zone (Ahmari et al., 2000). One could wonder whether a similar mechanism is also operative at the postsynaptic level.

These observations also raise the possibility that coated vesicles may be part of the cargo system for membrane and PSD expansion necessary to generate perforated synapses. The distribution of coated vesicles in spines illustrated in figure 4 clearly suggests that they are involved in a cycle between the spine apparatus and the synaptic membrane (Spacek and Harris, 1997). Furthermore, coated vesicles are often seen fusing with the synaptic membrane at the level of the PSD and could in this way be responsible for the occurrence of perforations. The marked increase in coated vesicles observed in perforated synapses 30 min after LTP induction, and in

segmented perforated synapses in particular, strongly suggest that they contribute to the membrane and PSD expansion that characterizes this synaptic type. It is important also to mention that among the mechanisms recently implicated in LTP, much recent evidence indicates that incorporation of new receptors at the synaptic membrane represents an important contribution (Luscher et al., 2000). The fact that the proportion of perforated synapses increase following LTP induction and that this synapse type exhibit at that time point a markedly increased occurrence of coated vesicles suggests that they could somehow represent the morphological correlate of this enhanced receptor recycling process.

Another interesting aspect of the present result concerns the differences observed between types of perforated synapses. Analyses of the morphology of the PSD has lead to a classification in 3 types, referred to as fenestrated, horseshoe-shaped and segmented PSDs (Geinisman et al., 1989; 1991; Harris et al., 1989; 1992). Three dimensional analysis of the organization of the PSD of perforated synapses as a function of time after LTP induction reveals that the increase in the proportion of the overall population of perforated synapses observed at 30 min results from an increase in perforated synapses with segmented, fully partitioned PSDs. This result is thus very much consistent with the observations made earlier by Geinisman and colleagues (Geinisman et al., 1991; 1993) that suggested an involvement of segmented, fully partitioned synapses in LTP. Interestingly, our data also indicate that segmented, perforated synapses are particular in several other aspects. Among perforated synapses, they have a slightly larger spine head and PSD; they most frequently contain coated vesicles and exhibit large spinules associated with the PSD. While spinules are not necessarily associated with perforated synapses (Sorra et al., 1998), they look very much like the thin protrusions called filopodia and now believed to represent precursors of spine formation (Fiala et al., 1998). The fact that segmented perforated synapses represent the synaptic type most associated with spinules and coated vesicles clearly suggest that they are undergoing a process of growth and remodeling of synaptic membranes. They are thus likely to represent unstable synaptic structures (Sorra et al., 1998), an interpretation which is further supported by the fact that segmented perforated synapses are essentially observed during a short time window after LTP induction and then become considerably less frequent at later times (Toni et al., 1999). This raises also the possibility that segmented, perforated synapses could then be transformed into MSBs with duplicated spines. The characteristics of MSBs with duplicated spines and particularly the fact that they have smaller PSDs than simple synapses suggests that they could represent a distinct synaptic type with still immature features. Interestingly, the total PSD area measured on the two duplicated spines, while it is significantly larger than that of simple spines, is smaller than that of segmented perforated synapses. Thus the transformation of a perforated, segmented synapse into a MSB with duplicated spines would not require further addition of membrane components, but rather a retraction or redistribution of these membrane components.

It is tempting therefore to propose that segmented perforated synapses represent a stage of membrane expansion produced as a result of LTP induction and that this process is reversible and could evolve either back to a simple spine or, in some cases, to a MSB with duplicated spines. From a functional point of view, these morphological changes could be directly related to the increase in synaptic strength, since the process of membrane expansion that characterizes segmented perforated synapses include an enlargement of the PSD area and thus probably also insertion of new receptors in the synaptic membrane (Luscher et al., 2000). Furthermore, the



formation of segmented, fully partitioned PSDs may result in the creation of two independent release sites, with their own release probabilities (Geinisman, 1993; Edwards, 1995), a process that could then be stabilized by a transformation into MSBs with duplicated spines. Analyses of the distribution of synaptic vesicles in reconstructed segmented perforated synapses indeed indicates the existence distinct pools of presynaptic vesicles accumulated in front of each PSD (Harris et al., 1989). Taken together, the quantitative data presented here are consistent with the hypothesis that the changes in synaptic types observed following LTP reflect a process of synaptic membrane remodeling, that coated vesicles and spinule contribute to this process, that this process of membrane remodeling involves an initial phase of membrane expansion leading to the formation of segmented, perforated synapses, followed by a phase of recovery during which segmented perforated synapses could in some cases be transformed into duplicated synapses, and finally that these morphological changes, through the modifications in PSD size or number of release sites, could be directly related to the increase in synaptic strength. Continuous monitoring of spine shape during LTP using two-photon confocal microscopy will eventually allow to test more directly this hypothesis.

## **Material and methods**

### *Preparation and stimulation of cultures*

Hippocampal organotypic slice cultures were prepared from 7 days old rats and maintained 12 days in culture as described in Stoppini et al 1990 before testing in an interface recording chamber. A stimulation electrode made of twisted nichrome wires was placed in the CA3 area and evoked field potential were recorded in the CA1. LTP was induced using theta burst stimulation consisting of five bursts at 5 Hz with each burst composed of four pulses at 100 Hz. This pattern was applied twice at 10 sec interval and, in order to relabel activated synapses, 5 minutes before fixation.

### *Electron microscopy processing*

At different times after LTP induction, cultures were fixed and processed for electron microscopy as described (Buchs et al. 1992). Briefly, cultures were fixed overnight at 4°C in 3% glutaraldehyde, rinsed in phosphate buffer 0.1M (pH 7.4) and postfixed 2h in a fresh solution of Osmium tetroxyde 1% (OsO<sub>4</sub>) with 1.5% Potassium Chromium trisoxalate (K<sub>3</sub>Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (Aldrich), pH 9.5. After a 5 min rinse in KOH pH 9.5, the samples were classically dehydrated in ethanol and embedded in EPON (Fluka). For serial EM, ribbons of up to 60 sections were cut in the middle portion of the apical arborization of CA1 pyramidal neurons (ultratome Ultracut-E, Reichert-Jung) and collected on single slotted formvar-coated grids (TAAB). Sections were stained for 45 min in 0.5% uranyl acetate and 45 sec in lead citrate. Synaptic profiles corresponding either to simple synapses, perforated synapses or multiple spine boutons and containing a clear calcium labeling were identified on the test section and serially photographed at a magnification of 28500X.

### *Morphological analyses*

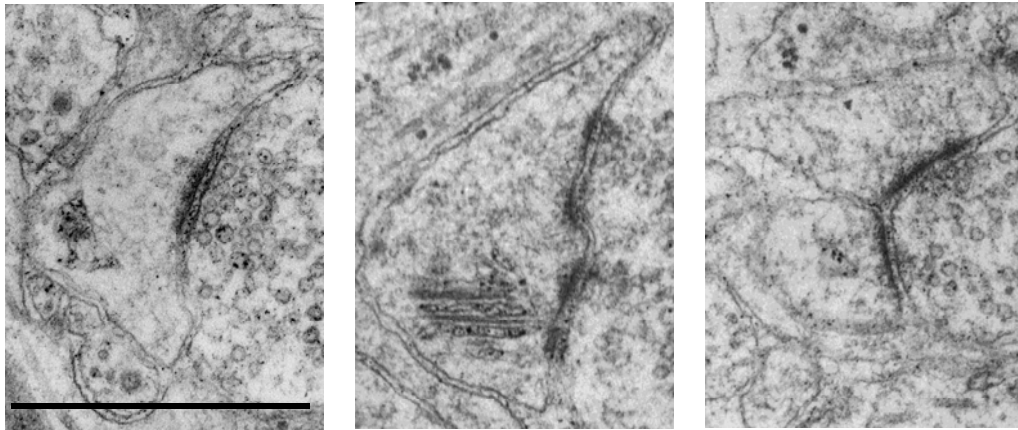
Single section photographs of synapses were digitized and morphometry realized using a software developed on AVS for 2-dimensional analyses and a software developed by J.C. Fiala and K.M Harris was used for 3-dimensional analyses. The small fold procedure was used for determination of section thickness and an average value of 42 nm. was used for reconstruction.

Data are presented as a mean  $\pm$  s.e.m., with n indicating the number of synapses analysed. Statistical analyses were carried out using the Student's t-test.

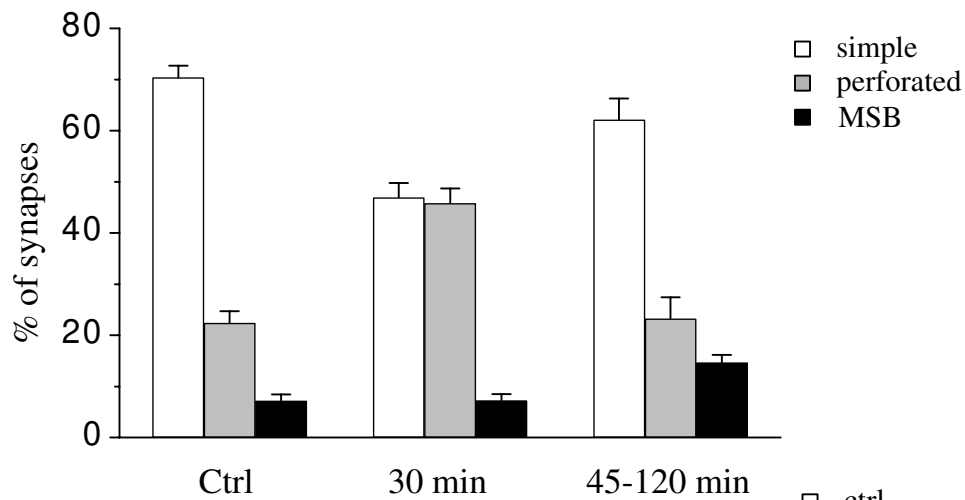
## **Acknowledgements.**

We thank M. Moosmayer for excellent technical support, Fred Pillonel for photographic work. This work was carried out with the support of the Swiss National Science Foundation, grant 31-56852.99.

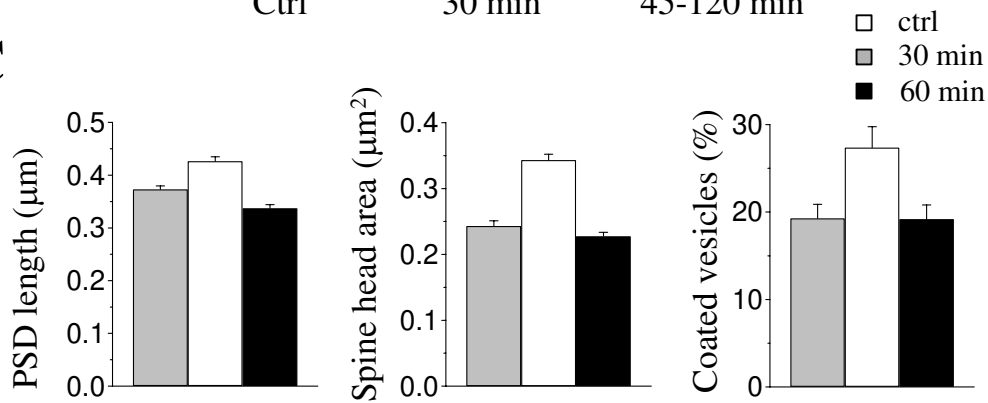
A



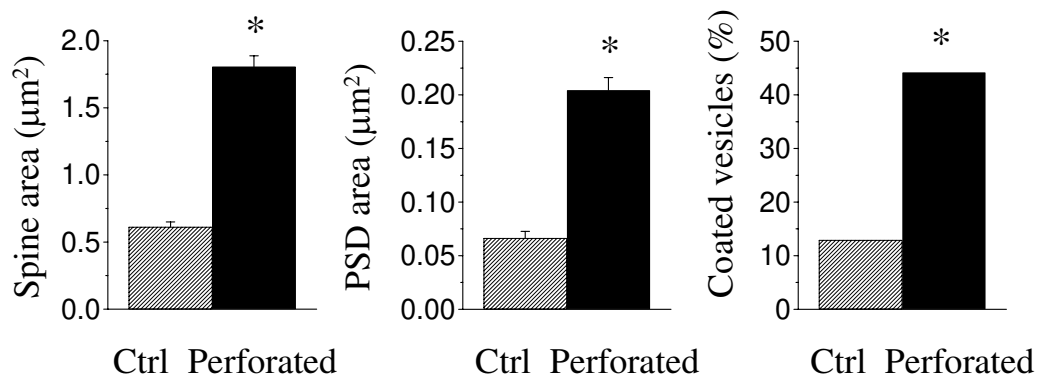
B



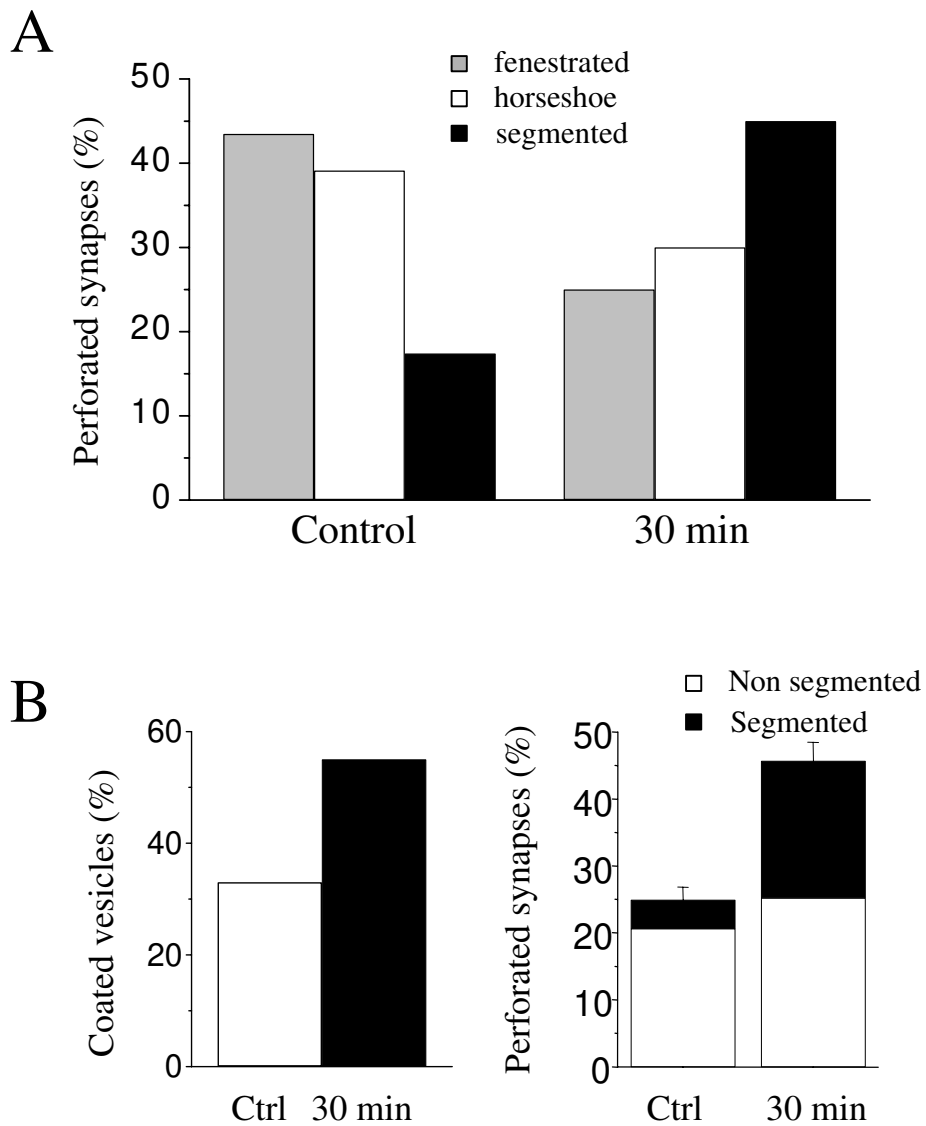
C



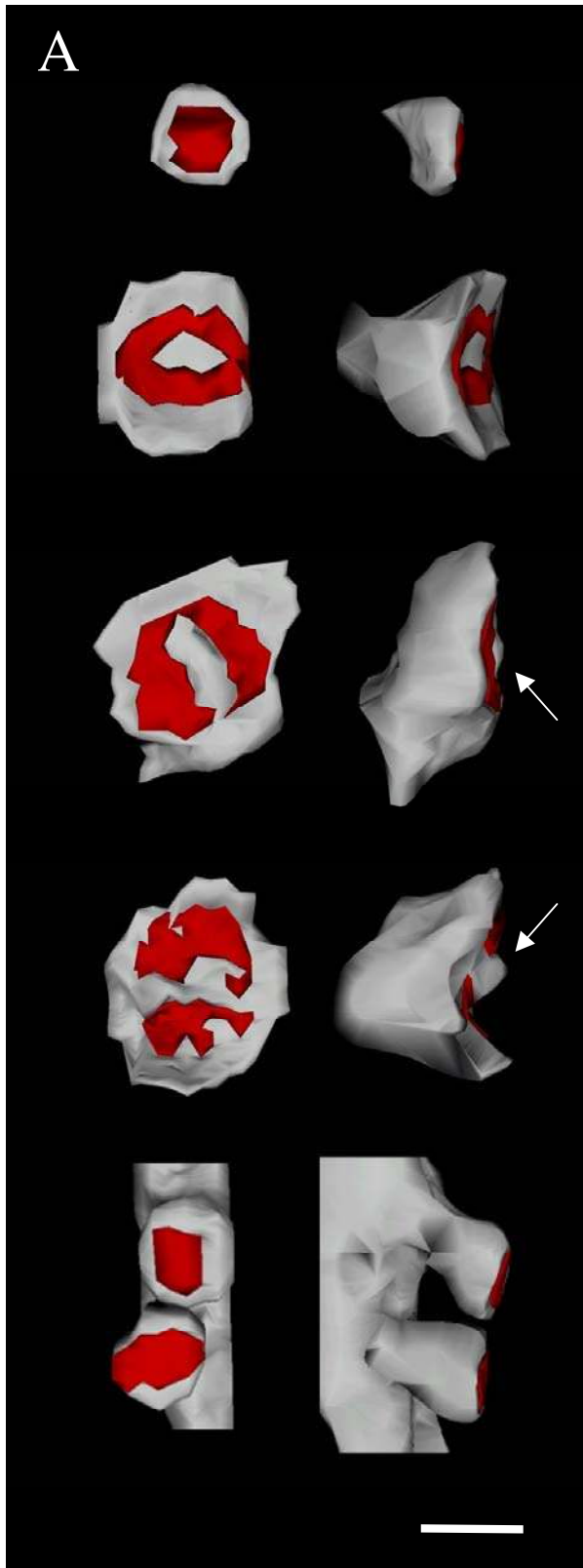
**Figure 1** : Timecourse of synaptic remodeling as observed by two-dimensional analyses. **A**. Illustration of a simple non-perforated synapse (left), a perforated synapse (center) and a multiple spine bouton (right). Bar :  $1\mu\text{m}$ . **B** : Variations in the proportion of these 3 synaptic types with time after LTP induction.  $n= 6-22$  hippocampal cultures analysed and 358-2158 synaptic profiles. \* :  $P<0.001$ , student's t-test. **C** : Morphometric analyses of the overall spine population with time after LTP induction.  $n=9-4$  hippocampal slices and 360-660 synaptic profiles. \* :  $P<0.001$ .



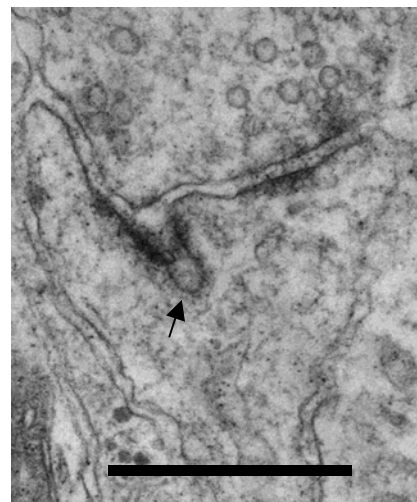
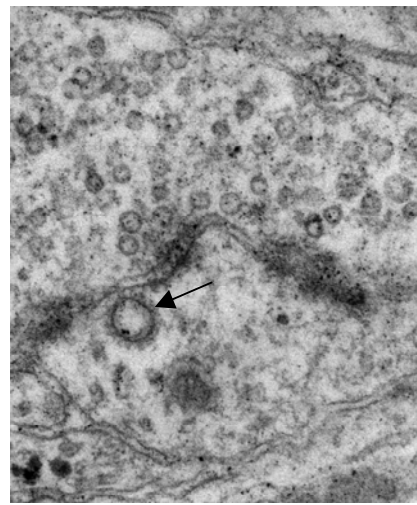
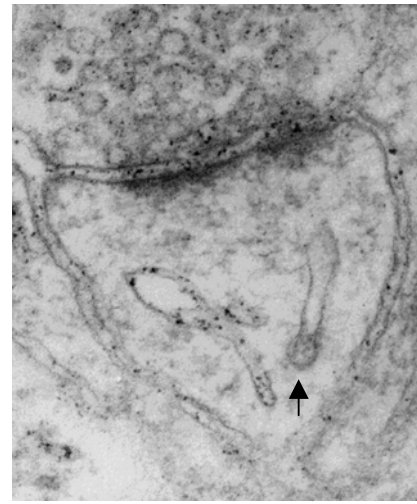
**Figure 2** : Three-dimensional morphometrical analyses of perforated and non perforated synapses. For all values, P<0.001.



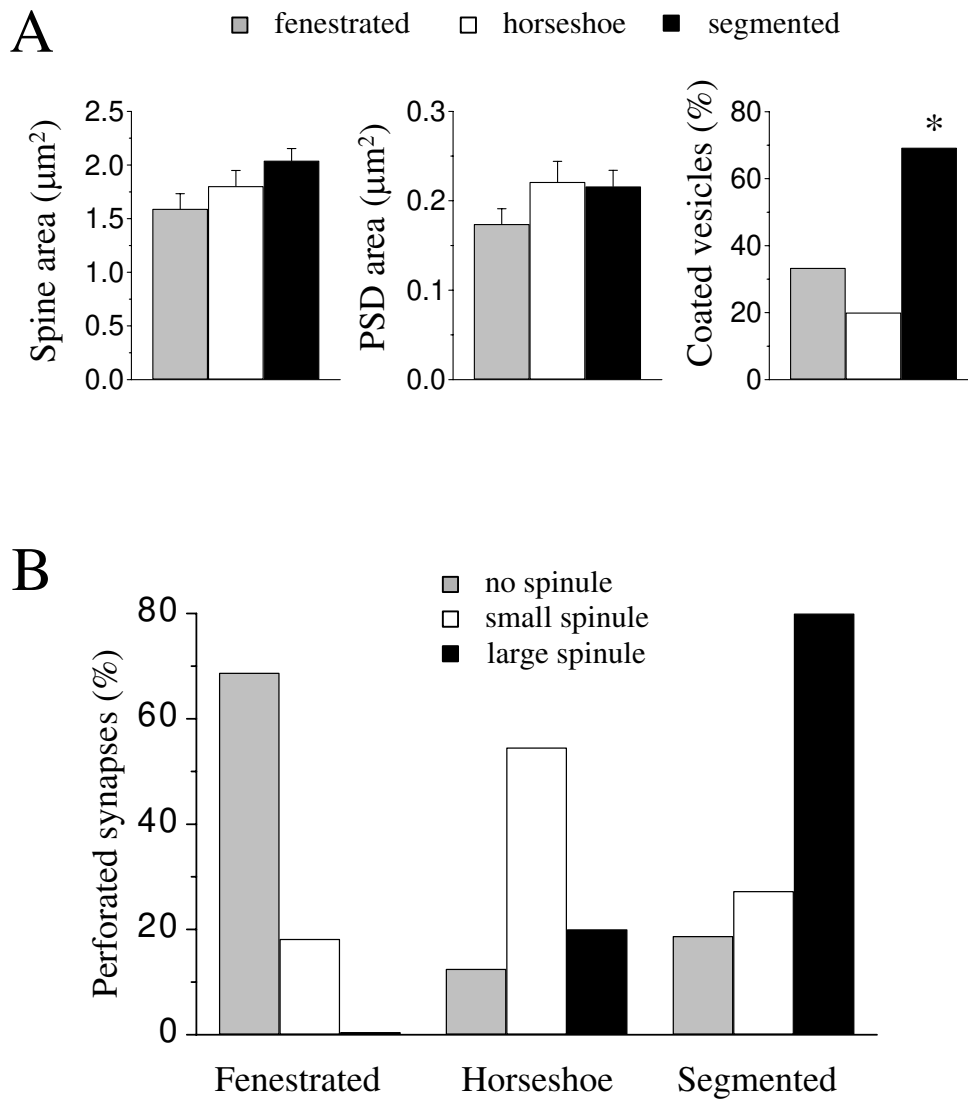
**Figure 3** : Three-dimensional analyses reveals three types of perforated synapses : Fenestrated, horseshoe-shaped and segmented. \* :  $P < 0.01$ . A : Analyses of the proportion of these three types with time after LTP induction. B : Incidence of coated vesicles in segmented synapses (left panel,  $P < 0.01$ ) and participation of segmented synapses in the increase of perforated synapses observed 30 minutes after LTP induction (right).



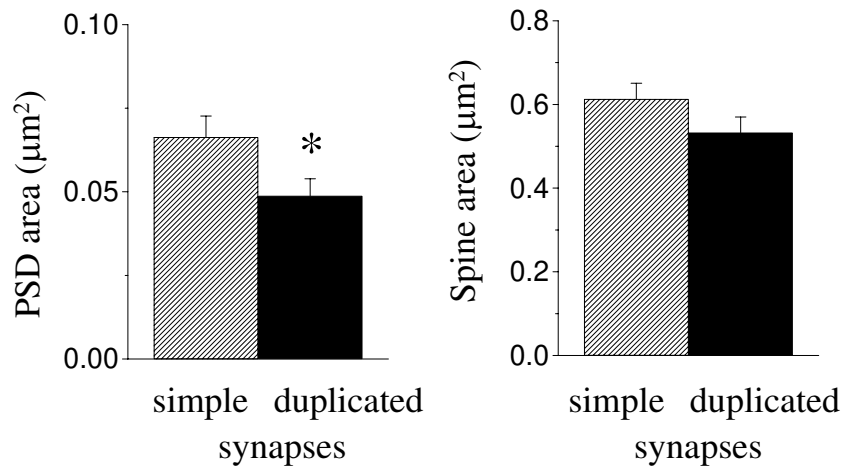
**B**



**Figure 4** : **A** : Illustrations of 3-dimensionally reconstructed showing simple, fenestrated, horseshoe-shaped, segmented and duplicated synapses with a spinule arising in the PSD (arrows). **B** : Dendritic spines profiles with coated vesicles associated with the spine apparatus (arrow, upper panel), close and fusing to the synaptic membrane (middle and lower panels). Bars : 0.5  $\mu\text{m}$ .



**Figure 5** : 3-dimensional morphometrical analyses of the different types of perforated synapses. **A** : Spine head surface area, PSD surface area and coated vesicles content. \* :  $P < 0.001$ . **B** : Spinule repartition in these types of perforated synapses. \* :  $P < 0.01$ .



**Figure 6** : 3-Dimensional morphometrical analyses of duplicated spines. \* : P<0.05.



# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

*« La meilleure part de notre mémoire est hors de nous, dans un souffle pluvieux, dans l'odeur de renfermé d'une chambre ou dans l'odeur d'une première flambée, partout où nous retrouvons de nous-même ce que notre intelligence, n'en ayant pas l'emploi, avait dédaigné. »*

M.Proust

Mettant à profit une nouvelle technique d'identification des synapses activées à l'aide de la microscopie électronique, ce travail a permis de mettre en évidence que l'expression de la LTP dans des cultures organotypiques de rat pouvait induire des modifications majeures de la structure de la synapse et du réseau synaptique tels que :

1. La formation de synapses perforées, déjà observables 15 minutes après induction de la LTP et qui atteignent un maxima vers 30 minutes, avant de disparaître. Ces synapses sont caractérisées par une épine de grande taille, contenant fréquemment des vésicules d'endo/exocytose et un grand spinule situé au milieu d'une large PSD segmentée en plusieurs zones indépendantes. Ces différents critères sont suggestifs d'un intense remodelage au niveau de la membrane postsynaptique et des récepteurs.
2. La formation, dès 45 minutes d'expression de la LTP, de nouvelles épines contactant un terminal axonal activé, dupliquant ainsi certaines connexions entre les neurones concernés. La morphologie de ces nouvelles épines semble similaire à celle d'épines matures : elles ont un cou et une tête bien définis et on observe la présence d'un appareil de l'épine et d'une PSD en face de laquelle se trouve un groupe de vésicules présynaptiques. De plus, certaines d'entre-elles contiennent un précipité de calcium, indiquant qu'elles forment des contacts matures et fonctionnels. Néanmoins, une étude morphométrique plus approfondie indique qu'elles ont une PSD légèrement moins grande que des épines simples et contiennent une plus faible proportion de PSD perforées, suggérant une relative immaturité.

Comme exposé dans le modèle ci-dessous, ces résultats suggèrent une séquence d'évènements dans laquelle une synapse simple, après activation, se transforme en synapse perforée, puis forme une épine dupliquée. Dans un premier temps, la LTP induit une entrée de Calcium postsynaptique qui enclenche notamment la phosphorylation des récepteurs et l'augmentation de la synthèse de certaines protéines telles que la CamKII ou le récepteur AMPA. Ces modifications vont permettre une augmentation rapide de l'efficacité de la transmission synaptique. Ensuite, environ 30 minutes après l'induction de la LTP, une synapse activée entame des remaniements

membranaires impliquant la participation des stocks membranaires intracellulaires tels que l'appareil de l'épine et des vésicules d'exo/endocytose. Ces remaniements induisent tout d'abord une segmentation de la PSD qui, en augmentant la probabilité de relâchement vésiculaire, augmenterait l'efficacité de la transmission synaptique et prendrait ainsi le relais sur les modifications des protéines. Ensuite s'effectuerait la formation d'une nouvelle épine, probablement aussi par segmentation, aboutissant ainsi à la formation d'épines dupliquées, ce qui stabiliserait les nouveaux sites de relâchement vésiculaire et permettrait le maintien à long terme de la LTP. Il est envisageable enfin que ces modifications postsynaptiques puissent être suivies d'une séparation du terminal axonal en deux entités distinctes et donner ainsi lieu à deux synapses fonctionnellement et morphologiquement séparées.

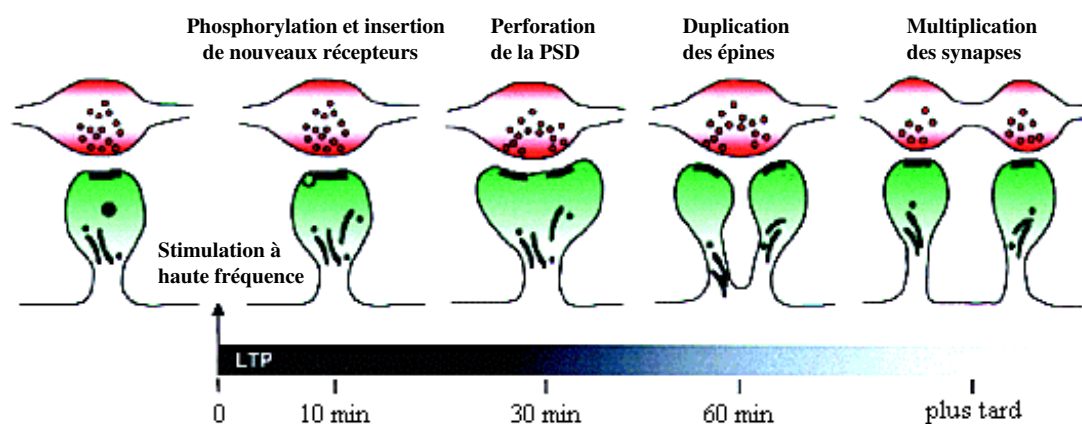


Figure 1 : *Modèle des mécanismes impliqués dans l'expression de la LTP (tiré de Luscher et al. 2000).*

Depuis plus de 20 ans, la LTP est considérée comme un modèle important des processus physiologiques impliqués dans l'apprentissage et la mémorisation. (Bliss et al. 1973, 1993). Bien qu'une synaptogenèse ait été mise en évidence suite à des tests d'apprentissage chez l'animal (Moser et al. 1994, Rampon et al. 2000, Airey et al. 2000), cette étude est la première à établir une relation entre l'expression de la LTP et la formation de nouvelles synapses matures. Elle met ainsi en évidence le caractère extrêmement plastique du système nerveux central, une propriété qui a longtemps été considérée comme restreinte aux processus développementaux. Cela implique que l'environnement, à travers les différentes modalités sensorielles, laisse une trace physique et durable dans la structure des réseaux synaptiques du cerveau, de la même manière qu'un exercice physique entraîne des modifications persistantes de la musculature squelettique.

Toutefois, comme le montrent des observations de neuropsychologie, l'hippocampe n'est pas le siège de la mémoire à long terme et les informations qu'il retient doivent également pouvoir s'effacer. Si seule la LTP existait, le système serait vite saturé et relativement peu flexible. Il est néanmoins récemment apparu que la dépression à long terme (LTD), puisse jouer un rôle inverse de la LTP et constituer, au niveau

synaptique, une sorte de mécanisme actif d'oubli (Dudek et al. 1992). Bien que les mécanismes impliqués dans l'expression de la LTD ne soient pas aussi bien décrits que pour la LTP, il semble qu'elle mette en jeu des processus biochimiques opposés à ceux impliqués dans l'expressions de la LTP tels que la déphosphorylation (Mulkey et al. 1994) ou encore une diminution de l'expression de récepteurs AMPA (Carroll et al. 1999). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la phase tardive de l'expression de la LTD puisse impliquer une rétraction d'épines dendritiques provoquant une diminution du nombre de contacts synaptiques. Bien que ce phénomène puisse être difficile à observer en microscopie électronique, de récentes observations indiquent qu'il pourrait exister : une étude de microscopie confocale réalisée sur des cultures organotypiques d'hippocampe, a permis d'observer la rétraction de structures semblables à des épines dendritiques (Engert et al. 1999). Toutefois, cette étude ne permet pas de savoir si les épines établissent un contact synaptique avant de se rétracter ou s'il s'agit d'un mouvement de va et vient des filopodes dendritiques (Ziv et al. 1996). Tout aussi récemment, une étude de microscopie électronique a mis en évidence l'existence de terminaux axonaux dépourvus de contact synaptiques (Shepherd et al. 1998). Bien qu'aucune analyse cinétique ne puisse être réalisée par la microscopie électronique et qu'il est donc difficile de déterminer la provenance de telles structures, elles pourraient représenter le résultat de la rétraction d'une épine. Des études de microscopie confocale à deux photons sur des synapses activées, identifiées et marquées, tant au niveau présynaptique qu'au niveau postsynaptique, pourraient permettre de répondre à cette question. Une autre possibilité qui pourrait être explorée par de telles expériences est que de nouvelles synapses puissent se créer *de novo*, c'est à dire sans impliquer la participation d'une synapse activée. Les observations réalisées par Engert et al. (1999) renforcent cette hypothèse.

Une question soulevée par la présente étude concerne l'importance fonctionnelle de la synaptogenèse induite par la LTP. Dans quelle mesure les nouvelles synapses vont participer au fonctionnement du réseau synaptique en place ? La fonction de ces synapses est difficile à tester de manière directe. Toutefois différents critères morphologiques permettent d'obtenir une indication concernant la fonction des synapses. Les résultats présentés dans la deuxième partie indiquent que ces synapses ne sont pas pleinement matures biochimiquement. En effet, bien que les épines dupliquées présentent un cou, une tête, un appareil de l'épine et une PSD faisant face à un groupe de vésicules présynaptiques, la petite taille de leur PSD et la faible proportion de synapses perforées qu'elles comportent sont des caractéristiques des synapses silencieuses (Desmond et al. 1998, Liao et al. 1999). De telles synapses, qui expriment uniquement des récepteurs NMDA à leur surface (Gomperts et al. 1998), sont inactives au potentiel de repos de la membrane. Il semble néanmoins qu'une activation par l'expression des récepteurs AMPA puisse s'effectuer au cours du développement (Liao et al. 1999) ou suite à l'induction de la LTP (Liao et al. 1995). Un marquage des récepteurs au glutamate par immunogold, associé à la technique de précipitation du calcium pourrait permettre de répondre à cette question.

L'importance fonctionnelle des épines néo-formées dépend également de leur stabilité. Elle peut-être étudiée en microscopie électronique mais également à l'aide du microscope confocal deux photons. L'avantage de ce dernier outil est qu'il permet d'observer à long terme le comportement d'une épine et notamment sa motilité, ce qui donne une indication intéressante concernant son activité, les deux critères étant vraisemblablement liés (Fischer et al. 2000). Associée à un marquage du terminal axonal, cette technique permettrait également d'observer les interactions entre les

terminaux présynaptiques et postsynaptiques avant, pendant et après l'établissement d'un nouveau contact.

La plasticité synaptique représente un mécanisme adaptatif important non seulement pour l'apprentissage mais également en réaction à des perturbations du fonctionnement cérébral. Différents mécanismes impliqués dans l'expression de la LTP sont en effet mis à contribution lors de la récupération suite à une lésion physique ou une ischémie (Crepel et al. 1998). Une analyse morphologique de cultures d'hippocampe suite à de telles perturbations pourrait permettre de déterminer si les modifications structurales décrites ici sont également induites par de telles lésions et dans quelle mesure elles participent à la récupération fonctionnelle.

Cette étude met également en évidence que la morphologie des synapses peut potentiellement représenter une nouvelle cible pour l'étude de molécules à potentiel clinique. La culture organotypique d'hippocampe est un modèle qui s'est avéré très efficace lors d'études pharmacologiques et, à l'aide de ce modèle, il a déjà été démontré que certaines molécules interagissant avec la structure de la synapse peuvent interagir (Staubli et al. 1998, Muller et al. 1996), voire augmenter l'expression de la LTP (Madani et al. 1999). De nouvelles approches telles que les animaux transgéniques ou la transfection de cellules en culture, associées aux outils de la pharmacologie traditionnelle, facilitent l'étude de telles molécules morphorégulatrices et devraient bientôt permettre de mettre à jour des molécules intéressantes pour différentes pathologies du système nerveux central et notamment de l'apprentissage.

Depuis sa découverte, la LTP est le sujet d'un nombre croissant d'études et de nouveaux mécanismes génétiques, biochimiques et morphologiques participant à son expression sont incessamment mis à jour. De plus, elle semble impliquée dans de nombreuses zones du système nerveux et jouer un rôle central dans les mécanismes de plasticité synaptique. Néanmoins, la route est encore longue vers une complète compréhension des mécanismes qui régissent l'induction et l'expression de la LTP et sans bornes vers ne fût-ce qu'un simple entendement d'une des plus grandes énigmes de la biologie humaine : la conscience.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## **Bibliographie personnelle :**

Muller D, Wang C, Skibo G, **Toni N.**, Cremer H, Calaora V, Rougon G, Kiss JZ. : "PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity." *Neuron* 1996 Sep;17(3):413-22.

**Toni N.**, Stoppini L, Muller D. : "Staurosporine but not chelerythrine inhibits regeneration in hippocampal organotypic cultures." *Synapse* 1997 Nov;27(3):199-207.

Madani R., Hulo S., **Toni N.**, Madani H., Steimer T., Muller D. and Vassalli JD. : "Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice." *EMBO J.* 1999 Jun 1;18(11):3007-3012.

**Toni N.**, P.-A. Buchs, I. Nikonenko, C.R. Bron and D. Muller. : "LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite". *Nature*, 1999 Nov, vol. 402 (6760) : 421-25.

Muller D., **Toni N.** and Buchs PA. : "Long-Term Potentiation : From molecular mechanisms to structural changes. In : "Advances in synaptic plasticity" M.Baudry, J.L.Davis and R.F Thompson editors, Jan 2000 (4), p.87-101.

Spahr-Schopfer I., Vutskits L., **Toni N.**, Buchs PA., Parisi L. and Muller D. : "Differential Neurotoxic Effects of Propofol on Dissociated Cortical Cells and Organotypic Hippocampal Cultures." *Anesthesiology*. 2000, May;92(5):1408-1417.

Sagot Y, **Toni N.**, Lurot S., Perrelet D., King B., Rixner H., Mattenberger L., Waldmeier PC. and Kato AC. : "An orally active anti-apoptotic molecule (CGP 3466B) preserves mitochondria and enhances survival in an animal model of motoneuron disease." (Sous presse)

D.Muller, **N.Toni**, P.A.Buchs, L.Parusi and L.Stoppini : "Interface Organotypic Hippocampal Slice Cultures". In : "Protocols for Neural Cell Culture", 3rd edition. Editor: Sergey Fedoroff. Published by Humana Press (Revue sous presse)

D.Muller, **N.Toni** and P.A. Buchs : "Spine changes associated with LTP" (Revue sous presse)

**N.Toni**, P.A.Buchs, I.Nikonenko, L. Parisi, P.Povilaitite and D.Muller : "Remodeling of synaptic membranes following LTP induction". (Soumis)

## Références

- Abel, T., P.V. Nguyen, M. Barad, T.A. Deuel, E.R. Kandel, and R. Bourchouladze. "Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory." *Cell* 88(1997):615-626.
- Aberle, H., H. Schwartz, and R. Kemler. "Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function." *J.Cell Biochem.* 61(1996):514-523.
- Ahmari, S.E., J. Buchanan, and S.J. Smith. "Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets" *Nat. Neurosci.* 2000, May.;3.(5) : 445:451
- Airey, D.C. and T.J. DeVoogd. "Greater song complexity is associated with augmented song system anatomy in zebra finches." *Neuroreport.* 11(2000):1749-1754.
- Amaral, D.G., N. Ishizuka, and B. Claiborne. "Neurons, numbers and the hippocampal network." *Prog.Brain Res.* 83(1990):1-11.
- Andersen, P. "Synaptic integration in hippocampal CA1 pyramids." *Prog.Brain Res.* 83(1990):215-222.
- Andersen, P., S.H. Sundberg, O. Sveen, and H. Wigstrom. "Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices." *Nature* 266(1977):736-737.
- Anderson, J.M. "Cell signalling: MAGUK magic." *Curr.Biol.* 6(1996):382-384.
- Aniksztejn, L., M.P. Roisin, R. Amsellem, and Y. Ben-Ari. "Long-term potentiation in the hippocampus of the anaesthetized rat is not associated with a sustained enhanced release of endogenous excitatory amino acids." *Neuroscience* 28(1989):387-392.
- Applegate, M.D., D.S. Kerr, and P.W. Landfield. "Redistribution of synaptic vesicles during long-term potentiation in the hippocampus." *Brain Res.* 401(1987):401-406.
- Aronica, E., K. Reymann, U. Frey, M. Krug, M. Wagner, H. Schroeder, M.V. Catania, and F. Nicoletti. "Enhanced sensitivity of "metabotropic" glutamate receptors after induction of long-term potentiation (LTP) in rat hippocampus." *Pharmacol.Res.* 22 Suppl 3(1990):50-51.
- Ascher, P. and L. Nowak. "Quisqualate- and kainate-activated channels in mouse central neurones in culture." *J.Physiol.(Lond.)* 399(1988):227-245.
- Atwood, H.L. and L. Marin. "Ultrastructure of synapses with different transmitter-releasing characteristics on motor axon terminals of a crab, *Hyas areneas*." *Cell Tissue Res.* 231(1983):103-115.
- Bading, H. and M.E. Greenberg. "Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation." *Science* 253(1991):912-914.
- Bailey, C.H. and M. Chen. "Time course of structural changes at identified sensory neuron synapses during long-term sensitization in *Aplysia*." *J.Neurosci.* 9(1989):1774-1780.
- Bannister, N.J. and A.U. Larkman. "Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: II. Spine distributions." *J.Comp.Neurol.* 360(1995):161-171.
- Bao, J.X., E.R. Kandel, and R.D. Hawkins. "Involvement of presynaptic and postsynaptic mechanisms in a cellular analog of classical conditioning at *Aplysia* sensory-motor neuron synapses in isolated cell culture." *J.Neurosci.* 18(1998):458-466.



- Barria, A., V. Derkach, and T. Soderling. "Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor." *J.Biol.Chem.* 272(1997a):32727-32730.
- Barria, A., D. Muller, V. Derkach, L.C. Griffith, and T.R. Soderling. "Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation ." *Science* 276(1997b):2042-2045.
- Bashir, Z.I., Z.A. Bortolotto, C.H. Davies, N. Berretta, A.J. Irving, A.J. Seal, J.M. Henley, D.E. Jane, J.C. Watkins, and G.L. Collingridge. "Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors." *Nature* 363(1993):347-350.
- Beach, R.L., S.L. Bathgate, and C.W. Cotman. "Identification of cell types in rat hippocampal slices maintained in organotypic cultures." *Brain Res.* 255(1982):3-20.
- Benke, T.A., A. Luthi, J.T. Isaac, and G.L. Collingridge. "Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity." *Nature* 393(1998):793-797.
- Berman, K.F., P.J. Schmidt, D.R. Rubinow, M.A. Danaceau, J.D. Van Horn, G. Esposito, J.L. Ostrem, and D.R. Weinberger. "Modulation of cognition-specific cortical activity by gonadal steroids: a positron-emission tomography study in women." *Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A.* 94(1997):8836-8841.
- Bi, X., G. Tocco, and M. Baudry. "Calpain-mediated regulation of AMPA receptors in adult rat brain." *Neuroreport.* 6(1994):61-64.
- Bliss, T.V. and G.L. Collingridge. "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* 361(1993):31-39.
- Bliss, T.V., R.M. Douglas, M.L. Errington, and M.A. Lynch. "Correlation between long-term potentiation and release of endogenous amino acids from dentate gyrus of anaesthetized rats." *J.Physiol.(Lond.)* 377(1986):391-408.
- Bliss, T.V. and T. Lomo. "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J.Physiol.(Lond.)* 232(1973):331-356.
- Bolshakov, V.Y., H. Golan, E.R. Kandel, and S.A. Siegelbaum. "Recruitment of new sites of synaptic transmission during the cAMP- dependent late phase of LTP at CA3-CA1 synapses in the hippocampus." *Neuron* 19(1997):635-651.
- Boshart, M., F. Weih, M. Nichols, and G. Schutz. "The tissue-specific extinguisher locus TSE1 encodes a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase." *Cell* 66(1991):849-859.
- Boycott, B.B. "Cephalopods, memory, neurofilaments, mammalian hibernation, the vertebrate retina: an autobiographical research note for John H. Welsh in his 85th year." *Comp.Biochem.Physiol.C.* 91(1988):25-29.
- Bravin, M., L. Morando, A. Vercelli, F. Rossi, and P. Strata. "Control of spine formation by electrical activity in the adult rat cerebellum." *Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A.* 96(1999):1704-1709.
- Brown, T.H., P.F. Chapman, E.W. Kairiss, and C.L. Keenan. "Long-term synaptic potentiation." *Science* 242(1988):724-728.
- Buchs, P.A. and D. Muller. "Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses." *Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A.* 93(1996):8040-8045.

- Buchs, P.A., L. Stoppini, A. Parducz, L. Siklos, and D. Muller. "A new cytochemical method for the ultrastructural localization of calcium in the central nervous system." *J.Neurosci.Methods* 54(1994):83-93.
- Burgoyne, R.D., J. Barron, and M.J. Geisow. "Cytochemical localisation of calcium binding sites in adrenal chromaffin cells and their relation to secretion." *Cell Tissue Res.* 229(1983):207-217.
- Caeser, M. and A. Aertsen. "Morphological organization of rat hippocampal slice cultures." *J.Comp.Neurol.* 307(1991):87-106.
- Cajal, S. R. Estructura de los centros nerviosos de las aves. Rev.Trimestr.Histol , 1-10. 1888.
- Cajal, S.R. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris: Maloine, 1911.
- Caldji, C., B. Tannenbaum, S. Sharma, D. Francis, P.M. Plotsky, and M.J. Meaney. "Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95(1998):5335-5340.
- Calverley, R.K. and D.G. Jones. "Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity." *Brain Res.Brain Res.Rev.* 15(1990):215-249.
- Cammarota, M., R. Bernabeu, D.S. Levi, I. Izquierdo, and J.H. Medina. "Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity." *Eur.J.Neurosci.* 10(1998):2669-2676.
- Carlin, R.K. and P. Siekevitz. "Plasticity in the central nervous system: do synapses divide?" *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80(1983):3517-3521.
- Carr, D.W., R.E. Stofko-Hahn, I.D. Fraser, R.D. Cone, and J.D. Scott. "Localization of the cAMP-dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-kinase anchoring proteins. Characterization of AKAP 79." *J.Biol.Chem.* 267(1992):16816-16823.
- Carroll, R.C., D.V. Lissin, M. von Zastrow, R.A. Nicoll, and R.C. Malenka. "Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures." *Nat.Neurosci.* 2(1999):454-460.
- Chang, F.L. and W.T. Greenough. "Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice." *Brain Res.* 309(1984):35-46.
- Charpak, S., B.H. Gahwiler, K.Q. Do, and T. Knopfel. "Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters." *Nature* 347(1990):765-767.
- Chicurel, M.E. and K.M. Harris. "Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus." *J.Comp.Neurol.* 325(1992):169-182.
- Clements, J.D., R.A. Lester, G. Tong, C.E. Jahr, and G.L. Westbrook. "The time course of glutamate in the synaptic cleft." *Science* 258(1992):1498-1501.
- Cline, H.T. and R.W. Tsien. "Glutamate-induced increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured frog tectal cells mediated by direct activation of NMDA receptor channels." *Neuron* 6(1991):259-267.
- Cohen, R.S. and P. Siekevitz. "Form of the postsynaptic density. A serial section study." *J.Cell Biol.* 78(1978):36-46.
- Collingridge, G. "Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory." *Nature* 330(1987):604-605.

- Collingridge, G.L., S.J. Kehl, and H. McLennan. "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus." *J.Physiol.(Lond.)* 334(1983):33-46.
- Collins, G.G. "Effects of the anaesthetic 2,6-diisopropylphenol on synaptic transmission in the rat olfactory cortex slice." *Br.J.Pharmacol.* 95(1988):939-949.
- Comery, T.A., C.X. Stamoudis, S.A. Irwin, and W.T. Greenough. "Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment." *Neurobiol.Learn.Mem.* 66(1996):93-96.
- Crepel, V., P. Congar, L. Aniksztejn, H. Gozlan, C. Hammond, and Y. Ben-Ari. "Synaptic plasticity in ischemia: role of NMDA receptors." *Prog.Brain Res.* 116(1998):273-285.
- Curtis d.r. The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J.Physiol.* 150, 656-682. (1960)
- del Cerro, S., J. Larson, M.W. Oliver, and G. Lynch. "Development of hippocampal long-term potentiation is reduced by recently introduced calpain inhibitors." *Brain Res.* 530(1990):91-95.
- Del Rio, J.A., B. Heimrich, V. Borrell, E. Forster, A. Drakew, S. Alcantara, K. Nakajima, T. Miyata, M. Ogawa, K. Mikoshiba, P. Derer, M. Frotscher, and E. Soriano. "A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections." *Nature* 385(1997):70-74.
- Denny, J.B., J. Polan-Curtain, A. Ghuman, M.J. Wayner, and D.L. Armstrong. "Calpain inhibitors block long-term potentiation." *Brain Res.* 534(1990):317-320.
- Derkach, V., A. Barria, and T.R. Soderling. "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha- amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96(1999):3269-3274.
- Desmond, N.L. and W.B. Levy. "Changes in the numerical density of synaptic contacts with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus." *J.Comp.Neurol.* 253(1986):466-475.
- Desmond, N.L. and R.J. Weinberg. "Enhanced expression of AMPA receptor protein at perforated axospinous synapses." *Neuroreport.* 9(1998):857-860.
- Diamond, J.S. and C.E. Jahr. "Synaptically released glutamate does not overwhelm transporters on hippocampal astrocytes during high-frequency stimulation." *J.Neurophysiol.* :2835-43. 83(2000):2835-2843.
- Dmytrenko, G.M. and R.J. Bloch. "Evidence for transmembrane anchoring of extracellular matrix at acetylcholine receptor clusters." *Exp.Cell Res.* 206(1993):323-334.
- Douglas, R.M. and G.V. Goddard. "Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus." *Brain Res.* 86(1975):205-215.
- Doupe, A.J. and P.K. Kuhl. "Birdsong and human speech: common themes and mechanisms." *Annu.Rev.Neurosci.* 22(1999):567-631.
- Dudar, J.D. "In vitro excitation of hippocampal pyramidal cell dendrites by glutamic acid." *Neuropharmacology* 13(1974):1083-1089.
- Dudek, S.M. and M.F. Bear. "Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade." *Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A.* 89 (1992):4363-4367.

- el-Beheiry, H. and E. Puil. "Anaesthetic depression of excitatory synaptic transmission in neocortex." *Exp.Brain Res.* 77(1989):87-93.
- Engert, F. and T. Bonhoeffer. "Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity." *Nature* 399(1999):66-70.
- Eriksson, P.S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A.M. Alborn, C. Nordborg, D.A. Peterson, and F.H. Gage. "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat.Med.* 4(1998):1313-1317.
- Feldman, M.L. and C. Dowd. "Loss of dendritic spines in aging cerebral cortex." *Anat.Embryol.(Berl.)* 148(1975):279-301.
- Fiala, J.C., M. Feinberg, V. Popov, and K.M. Harris. "Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1." *J.Neurosci.* 18(1998):8900-8911.
- Fiala J.C., Harris K. M. (1999) Dendrite Structure. In *Dendrites* (eds. G. Stuart, N. Spruston, M. Häusser), Oxford University Press, in press.
- Fifkova, E. and C.L. Anderson. "Stimulation-induced changes in dimensions of stalks of dendritic spines in the dentate molecular layer." *Exp.Neurol.* 74(1981):621-627.
- Fifkova, E. and R.J. Delay. "Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity." *J.Cell Biol.* 95(1982):345-350.
- Fifkova, E., J.A. Markham, and R.J. Delay. "Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer." *Brain Res.* 266(1983):163-168.
- Fifkova, E. and M. Morales. "Actin matrix of dendritic spines, synaptic plasticity, and long-term potentiation." *Int.Rev.Cytol.* 139(1992):267-307.
- Fifkova, E. and A. Van Harreveld. "Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of the entorhinal area." *J.Neurocytol.* 6(1977):211-230.
- Fischer, M., S. Kaech, D. Knutti, and A. Matus. "Rapid actin-based plasticity in dendritic spines." *Neuron* 20(1998):847-854.
- Fischer, M., S. Kaech, U. Wagner, H. Brinkhaus, and A. Matus. "Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines." *Nat.Neurosci.* 2000.Sep;3(9):887-894. 3(2000):887-894.
- Fonnum, F. "Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain." *J.Neurochem.* 42(1984):1-11.
- Forsythe, I.D., G.L. Westbrook, and M.L. Mayer. "Modulation of excitatory synaptic transmission by glycine and zinc in cultures of mouse hippocampal neurons." *J.Neurosci.* 8(1988):3733-3741.
- Fox, K. "The cortical component of experience-dependent synaptic plasticity in the rat barrel cortex." *J.Neurosci.* 14(1994):7665-7679.
- Friedlander, M.J., K.A. Martin, and D. Wassenhove-McCarthy. "Effects of monocular visual deprivation on geniculocortical innervation of area 18 in cat." *J.Neurosci.* 11(1991):3268-3288.
- Fukunaga, K., L. Stoppini, E. Miyamoto, and D. Muller. "Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II." *J.Biol.Chem.* 268 (1993):7863-7867.
- Geinisman, Y. "Perforated axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones: probable structural intermediates in synaptic plasticity." *Hippocampus.* 3(1993a):417-433

- Geinisman, Y., L. de Toledo-Morrell, and F. Morrell. "Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83(1986):3027-3031.
- Geinisman, Y., L. de Toledo-Morrell, F. Morrell, R.E. Heller, M. Rossi, and R.F. Parshall. "Structural synaptic correlate of long-term potentiation: formation of axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones." *Hippocampus.* 3(1993):435-445.
- Geinisman, Y., L. Detoledo-Morrell, and F. Morrell. "Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities." *Brain Res.* 566(1991):77-88.
- Geinisman, Y., L. Detoledo-Morrell, F. Morrell, I.S. Persina, and M.A. Beatty. "Synapse restructuring associated with the maintenance phase of hippocampal long-term potentiation." *J.Comp.Neurol.* 368(1996):413-423.
- Geinisman, Y., J.F. Disterhoft, H.J. Gundersen, M.D. McEchron, I.S. Persina, J.M. Power, E.A. van der Zee, and M.J. West. "Remodeling of hippocampal synapses after hippocampus-dependent associative learning." *J.Comp.Neurol.* 417(2000):49-59.
- Geinisman, Y., H.J. Gundersen, E. van der Zee, and M.J. West. "Unbiased stereological estimation of the total number of synapses in a brain region ." *J.Neurocytol.* 25(1996b):805-819.
- Geinisman, Y., F. Morrell, and L. de Toledo-Morrell. "Axospinous synapses with segmented postsynaptic densities: a morphologically distinct synaptic subtype contributing to the number of profiles of 'perforated' synapses visualized in random sections." *Brain Res.* 423(1987):179-188.
- Geinisman, Y., F. Morrell, and L. de Toledo-Morrell. "Perforated synapses on double-headed dendritic spines: a possible structural substrate of synaptic plasticity." *Brain Res.* 480(1989):326-329.
- Geinisman, Y., F. Morrell, and L. Detoledo-Morrell. "Increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities following hippocampal kindling." *Brain Res.* 569(1992):341-347.
- Glanzman, D.L., E.R. Kandel, and S. Schacher. "Target-dependent structural changes accompanying long-term synaptic facilitation in Aplysia neurons." *Science* 249(1990):799-802.
- Gomperts, S.N., A. Rao, A.M. Craig, R.C. Malenka, and R.A. Nicoll. "Postsynaptically silent synapses in single neuron cultures." *Neuron* 21(1998):1443-1451.
- Goodman, S.R. and I.S. Zagon. "The neural cell spectrin skeleton: a review." *Am.J.Physiol.* 250(1986):C347-C360
- Gould, E., M.D. Allan, and B.S. McEwen. "Dendritic spine density of adult hippocampal pyramidal cells is sensitive to thyroid hormone." *Brain Res.* 525(1990):327-329.
- Gould, E., A. Beylin, P. Tanapat, A. Reeves, and T.J. Shors. "Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation." *Nat.Neurosci.* 2(1999a):260-265.
- Gould, E., A.J. Reeves, M.S. Graziano, and C.G. Gross. "Neurogenesis in the neocortex of adult primates." *Science* 286(1999b):548-552.
- Gould, E., A. Westlind-Danielsson, M. Frankfurt, and B.S. McEwen. "Sex differences and thyroid hormone sensitivity of hippocampal pyramidal cells." *J.Neurosci.* 10(1990a):996-1003.
- Gould, E., C.S. Woolley, M. Frankfurt, and B.S. McEwen. "Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood." *J.Neurosci.* 10(1990b):1286-1291.

- Gray E.G. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex : an electron microscope study. *J.Anat.* 93, 420-433. (1959)
- Gray E.G. Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses : a brief review. Akert K. Mechanisms of synaptic transmission. *Prog.brain res* 31, 141-155. (1969)
- Greengard, P., J. Jen, A.C. Nairn, and C.F. Stevens. "Enhancement of the glutamate response by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons." *Science* 253(1991):1135-1138.
- Greenough, W.T., R.W. West, and T.J. DeVogd. "Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat." *Science* 202(1978):1096-1098.
- Greenwood, R.S., S.E. Godar, T.A.J. Reaves, and J.N. Hayward. "Cholecystokinin in hippocampal pathways." *J.Comp.Neurol.* 203(1981):335-350.
- Halpain, S., A. Hipolito, and L. Saffer. "Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin." *J.Neurosci.* 18(1998):9835-9844.
- Hamlyn I.h. The fine structure of the mossy fibre endings in the hippocampus of the rabbit. *J.Anat.* 112-120. (1962)
- Hampson, E. "Variations in sex-related cognitive abilities across the menstrual cycle." *Brain Cogn.* 14(1990):26-43.
- Harris, E.W. and C.W. Cotman. "Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists." *Neurosci.Lett.* 70(1986):132-137.
- Harris, K.M. "Calcium from internal stores modifies dendritic spine shape." *Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A.* 96(1999):12213-12215.
- Harris, K.M., F.E. Jensen, and B. Tsao. "Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [published erratum appears in *J Neurosci* 1992 Aug;12(8):following table of contents]." *J.Neurosci.* 12(1992):2685-2705.
- Harris, K.M. and S.B. Kater. "Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function." *Annu.Rev.Neurosci.* 17(1994):341-371.
- Harris, K.M. and J.K. Stevens. "Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics." *J.Neurosci.* 8(1988):4455-4469.
- Harris, K.M. and J.K. Stevens. "Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics." *J.Neurosci.* 9(1989):2982-2997.
- Hauser, K.F. and A.G. Gona. "Purkinje cell maturation in the frog cerebellum during thyroxine-induced metamorphosis." *Neuroscience* 11(1984):139-155.
- Hebb, D. O. The organisation of behavior. (1949)
- Herb, A., N. Burnashev, P. Werner, B. Sakmann, W. Wisden, and P.H. Seeburg. "The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits." *Neuron* 8(1992):775-785.
- Hessler, N.A., A.M. Shirke, and R. Malinow. "The probability of transmitter release at a mammalian central synapse." *Nature* 366(1993):569-572.

- Hollmann, M. and S. Heinemann. "Cloned glutamate receptors." *Annu.Rev.Neurosci.* 17(1994):31-108.
- Horner, C.H. "Plasticity of the dendritic spine." *Prog.Neurobiol.* 41(1993):281-321.
- Hsia, A.Y., P.A. Salin, P.E. Castillo, A. Aiba, A. Abeliovich, S. Tonegawa, and R.A. Nicoll. "Evidence against a role for metabotropic glutamate receptors in mossy fiber LTP: the use of mutant mice and pharmacological antagonists." *Neuropharmacology* 34(1995):1567-1572.
- Husi, H., M.A. Ward, J.S. Choudhary, W.P. Blackstock, and S.G. Grant. "Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes." *Nat.Neurosci.*(2000):661-669.
- Isaac, J.T., R.A. Nicoll, and R.C. Malenka. "Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP." *Neuron* 15(1995):427-434.
- Ishizuka, N., W.M. Cowan, and D.G. Amaral. "A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus." *J.Comp.Neurol.* 362(1995):17-45.
- Itarat, W. and D.G. Jones. "Perforated synapses are present during synaptogenesis in rat neocortex." *Synapse* 11(1992):279-286.
- Ivanco, T.L., R.J. Racine, and B. Kolb. "Morphology of layer III pyramidal neurons is altered following induction of LTP in sensorimotor cortex of the freely moving rat." *Synapse* 37(2000):16-22.
- Jones, D.G. and R.M. Devon. "An ultrastructural study into the effects of pentobarbitone on synaptic organization." *Brain Res.* 147(1978):47-63.
- Jones, E.G. and T.P. Powell. "Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex." *J.Cell Sci.* 5 (1969):509-529.
- Jones, T.A. and W.T. Greenough. "Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment." *Neurobiol.Learn.Mem.* 65(1996):48-56.
- Kaech, S., H. Brinkhaus, and A. Matus. "Volatile anesthetics block actin-based motility in dendritic spines." *Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A.* 96 (1999) : 10433-10437.
- Kaiserman-Abramof, I. R. The spines of pyramidal cell dendrites. A light and electron microscope study. *anat.rec* 208. (1969)
- Kantor, D.B., M. Lanzrein, S.J. Stary, G.M. Sandoval, W.B. Smith, B.M. Sullivan, N. Davidson, and E.M. Schuman. "A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue." *Science* 274(1996):1744-1748.
- Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage. "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." *Nature* 386(1997):493-495.
- Kennedy, M.B. "Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains [letter; comment]." *Trends.Biochem.Sci.* 20(1995):350
- Kennedy, M.B., M.K. Bennett, and N.E. Erondy. "Biochemical and immunochemical evidence that the "major postsynaptic density protein" is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase." *Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A.* 80(1983):7357-7361.
- Kim, C.H. and J.E. Lisman. "A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation." *J.Neurosci.* 19(1999):4314-4324.

- Kirov, S.A. and K.M. Harris. "Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated [published erratum appears in *Nat Neurosci* 2000 Apr;3(4):409]." *Nat.Neurosci.* 2(1999a):878-883.
- Kirov, S.A., K.E. Sorra, and K.M. Harris. "Slices have more synapses than perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats." *J.Neurosci.* 19(1999b):2876-2886.
- Kitamura, Y., A. Miyazaki, Y. Yamanaka, and Y. Nomura. "Stimulatory effects of protein kinase C and calmodulin kinase II on N-methyl-D-aspartate receptor/channels in the postsynaptic density of rat brain." *J.Neurochem.* 61(1993):100-109.
- Kleckner, N.W. and R. Dingledine. "Regulation of hippocampal NMDA receptors by magnesium and glycine during development." *Brain Res.Mol.Brain Res.* 11(1991):151-159.
- Kleim, J.A., K. Vij, D.H. Ballard, and W.T. Greenough. "Learning-dependent synaptic modifications in the cerebellar cortex of the adult rat persist for at least four weeks." *J.Neurosci.*17(1997):717-721.
- Korkotian, E. and M. Segal. "Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96(1999):12068-12072.
- Larson, J. and G. Lynch. "Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta-rhythm." *Brain Res.* 441(1988):111-118.
- Lee, K.S., F. Schottler, M. Oliver, and G. Lynch. "Brief bursts of high-frequency stimulation produce two types of structural change in rat hippocampus." *J.Neurophysiol.* 44(1980):247-258.
- Lendvai, B., E.A. Stern, B. Chen, and K. Svoboda. "Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo" *Nature* 404(2000):876-881.
- Liao, D., N.A. Hessler, and R. Malinow. "Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice." *Nature* 375(1995):400-404.
- Liao, D., X. Zhang, R. O'Brien, M.D. Ehlers, and R.L. Huganir. "Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons." *Nat.Neurosci.* 2(1999):37-43.
- Lisman, J. "The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory." *Trends.Neurosci.* 17(1994):406-412.
- Lisman, J.E. and M.A. Goldring. "Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85(1988):5320-5324.
- Lissin, D.V., R.C. Carroll, R.A. Nicoll, R.C. Malenka, and M. von Zastrow. "Rapid, activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons." *J.Neurosci.* 19(1999):1263-1272.
- Lissin, D.V., S.N. Gomperts, R.C. Carroll, C.W. Christine, D. Kalman, M. Kitamura, S. Hardy, R.A. Nicoll, R.C. Malenka, and M. von Zastrow. "Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95(1998):7097-7102.
- Liu, D., J. Diorio, J.C. Day, D.D. Francis, and M.J. Meaney. "Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats." *Nat.Neurosci.*2000.*Aug.*;3.(8.):799.-806. 3:799-806.



- Lledo, P.M., X. Zhang, T.C. Sudhof, R.C. Malenka, and R.A. Nicoll. "Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation." *Science* 279(1998):399-403.
- Lomo, T. and J. Rosenthal. "Control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat." *J.Physiol.(Lond.)* 221(1972):493-513.
- Loren, I., P.C. Emson, J. Fahrenkrug, A. Bjorklund, J. Alumets, R. Hakanson, and F. Sundler. "Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain." *Neuroscience* 4(1979):1953-1976.
- Lorente de No. "Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system." *J.Psychol.Neurol.* 46(1934):113-177.
- Lupien, S.J., M. de Leon, S. de Santi, A. Convit, C. Tarshish, N.P. Nair, M. Thakur, B.S. McEwen, R.L. Hauger, and M.J. Meaney. "Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits [published erratum appears in *Nat Neurosci* 1998 Aug;1(4):329]." *Nat.Neurosci.* 1(1998):69-73.
- Luscher, C., H. Xia, E.C. Beattie, R.C. Carroll, M. von Zastrow, R.C. Malenka, and R.A. Nicoll. "Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity." *Neuron* 24(1999):649-658.
- Luscher, C., R.A. Nicoll, R.C. Malenka, and D. Muller. "Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane." *Nat.Neurosci.*3(2000):545-550.
- Luthi, A., J.P. Laurent, A. Figurov, D. Muller, and M. Schachner. "Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM." *Nature* 372(1994):777-779.
- Lynch, G., J. Larson, S. Kelso, G. Barrionuevo, and F. Schottler. "Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation." *Nature* 305(1983):719-721.
- Madani, R., S. Hulo, N. Toni, H. Madani, T. Steimer, D. Muller, and J.D. Vassalli. "Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice." *EMBO J.* 18(1999):3007-3012.
- Magarinos, A.M., B.S. McEwen, G. Flugge, and E. Fuchs. "Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews." *J.Neurosci.* 16(1996):3534-3540.
- Makhinson, M., J.K. Chotiner, J.B. Watson, and T.J. O'Dell. "Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation." *J.Neurosci.* 19(1999):2500-2510.
- Malenka, R.C., J.A. Kauer, R.S. Zucker, and R.A. Nicoll. "Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission." *Science* 242(1988):81-84.
- Malenka, R.C. and R.A. Nicoll. "NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms." *Trends.Neurosci.* 16(1993):521-527.
- Maletic-Savatic, M. and R. Malinow. "Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part I: trans-Golgi network-derived organelles undergo regulated exocytosis." *J.Neurosci.* 18(1998):6803-6813.
- Maletic-Savatic, M., R. Malinow, and K. Svoboda. "Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity." *Science* 283(1999):1923-1927.
- Malinow, R., H. Schulman, and R.W. Tsien. "Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP." *Science* 245(1989):862-866.

- Malthe-Sorensen, D., K.K. Skrede, and F. Fonnum. "Calcium-dependent release of D-[3H]aspartate evoked by selective electrical stimulation of excitatory afferent fibres to hippocampal pyramidal cells in vitro." *Neuroscience* 4(1979):1255-1263.
- Manabe, T., Y. Noda, T. Mamiya, H. Katagiri, T. Houtani, M. Nishi, T. Noda, T. Takahashi, T. Sugimoto, T. Nabeshima, and H. Takeshima. "Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors." *Nature* 394(1998):577-581.
- Manzoni, O.J., M.G. Weisskopf, and R.A. Nicoll. "MCPG antagonizes metabotropic glutamate receptors but not long-term potentiation in the hippocampus." *Eur.J.Neurosci.* 6(1994):1050-1054.
- Mayer, M.L. and G.L. Westbrook. "The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system." *Prog.Neurobiol.* 28(1987):197-276.
- McAllister, A.K., L.C. Katz, and D.C. Lo. "Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity." *Neuron* 17(1996):1057-1064.
- McEwen, B.S. "Stress and hippocampal plasticity." *Annu.Rev.Neurosci.* 22(1999):105-122.
- McGuinness, N., R. Anwyl, and M. Rowan. "The effects of trans-ACPD on long-term potentiation in the rat hippocampal slice." *Neuroreport.* 2(1991):688-690.
- McKinney, R.A., M. Capogna, R. Durr, B.H. Gähwiler, and S.M. Thompson. "Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation." *Nat.Neurosci.* 2(1999):44-49.
- McNaughton, B.L., R.M. Douglas, and G.V. Goddard. "Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents." *Brain Res.* 157(1978):277-293.
- Meldrum, B. and J. Garthwaite. "Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease." *Trends.Pharmacol.Sci.* 11(1990):379-387.
- Michel, A.E. and L.J. Garey. "The development of dendritic spines in the human visual cortex." *Hum.Neurobiol.* 3(1984):223-227.
- Migaud, M., P. Charlesworth, M. Dempster, L.C. Webster, A.M. Watabe, M. Makhinson, Y. He, M.F. Ramsay, R.G. Morris, J.H. Morrison, T.J. O'Dell, and S.G. Grant. "Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein." *Nature* 396(1998):433-439.
- Miller, J.P., W. Rall, and J. Rinzel. "Synaptic amplification by active membrane in dendritic spines." *Brain Res.* 325(1985):325-330.
- Miller, S.G. and M.B. Kennedy. "Regulation of brain type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>-triggered molecular switch." *Cell* 44(1986):861-870.
- Minkwitz, H.G. and L. Holz. "[The ontogenetic development of pyramidal neurons in the hippocampus (CA1) of the rat]. Die ontogenetische Entwicklung von Pyramidenneuronen aus dem Hippocampus (CA1) der Ratte." *J.Hirnforsch.* 16(1975):37-54.
- Mollgaard, K., M.C. Diamond, E.L. Bennett, M.R. Rosenzweig, and B. Lindner. "Quantitative synaptic changes with differential experience in rat brain." *Int.J.Neurosci.* 2(1971):113-127.
- Morgan, S.L. and T.J. Teyler. "VDCCs and NMDARs underlie two forms of LTP in CA1 hippocampus in vivo." *J.Neurophysiol.* 82(1999):736-740.

- Morris, R.G., E. Anderson, G.S. Lynch, and M. Baudry. "Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5." *Nature* 319(1986):774-776.
- Moser, E.I., K.A. Krobot, M.B. Moser, and R.G. Morris. "Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation." *Science* 281(1998):2038-2042.
- Moser, M.B., M. Trommald, and P. Andersen. "An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91(1994):12673-12675.
- Moss, S.J., C.D. Blackstone, and R.L. Huganir. "Phosphorylation of recombinant non-NMDA glutamate receptors on serine and tyrosine residues." *Neurochem.Res.* 18(1993):105-110.
- Mulkey, R.M., S. Endo, S. Shenolikar, and R.C. Malenka. "Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression." *Nature* 369(1994):486-488.
- Muller, D., C. Wang, G. Skibo, N. Toni, H. Cremer, V. Calaora, G. Rougon, and J.Z. Kiss. "PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity." *Neuron* 17(1996):413-422.
- Muller, D., N.Toni and P.A. Buchs : "Spine changes associated with LTP", Hippocampus, sous presse.
- Muller, W. and J.A. Connor. "Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca<sup>2+</sup> responses." *Nature* 354(1991):73-76.
- Murphy, G.G. and D.L. Glanzman. "Mediation of classical conditioning in *Aplysia californica* by long-term potentiation of sensorimotor synapses [see comments]." *Science* 278(1997):467-471.
- Mussa, G.C., M. Zaffaroni, and F. Mussa. "Thyroid and growth: thyroid hormones and development of the nervous system." *J.Endocrinol.Invest.* 12(1989):85-89.
- Nadler, J.V. "Role of excitatory pathways in the hippocampal damage produced by kainic acid." *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 27(1981):395-402.
- Nayak, A., D.J. Zastrow, R. Lickteig, N.R. Zahniser, and M.D. Browning. "Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis." *Nature* 394(1998):680-683.
- Neuhoff, H., J. Roeper, and M. Schweizer. "Activity-dependent formation of perforated synapses in cultured hippocampal neurons." *Eur.J.Neurosci.* 11(1999):4241-4250.
- Nguyen, P.V. and E.R. Kandel. "A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices." *J.Neurosci.* 16(1996):3189-3198.
- Nieto-Sampedro, M., C.M. Bussineau, and C.W. Cotman. "Isolation, morphology, and protein and glycoprotein composition of synaptic junctional fractions from the brain of lower vertebrates: antigen PSD-95 as a junctional marker." *J.Neurosci.* 2(1982a):722-734.
- Nieto-Sampedro, M., S.F. Hoff, and C.W. Cotman. "Perforated postsynaptic densities: probable intermediates in synapse turnover." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79(1982b):5718-5722.
- Nieto-Sampedro, M., C.M. Bussineau, and C.W. Cotman. "Turnover of brain postsynaptic densities after selective deafferentation: detection by means of an antibody to antigen PSD- 95." *Brain Res.* 251(1982):211-220.
- Nishimune, A., J.T. Isaac, E. Molnar, J. Noel, S.R. Nash, M. Tagaya, G.L. Collingridge, S. Nakanishi, and J.M. Henley. "NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission." *Neuron* 21(1998):87-97.

- Noel, J., G.S. Ralph, L. Pickard, J. Williams, E. Molnar, J.B. Uney, G.L. Collingridge, and J.M. Henley. "Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism." *Neuron* 23(1999):365-376.
- Nordeen, K.W. and E.J. Nordeen. "Anatomical and synaptic substrates for avian song learning." *J.Neurobiol.* 33(1997):532-548.
- Nunzi, M.G., F. Milan, D. Guidolin, P. Polato, and G. Toffano. "Effects of phosphatidylserine administration of aged-related structural changes in the rat hippocampus and septal complex." *Pharmacopsychiatry.* 22 Suppl 2(1989):125-128.
- Nusser, Z., R. Lujan, G. Laube, J.D. Roberts, E. Molnar, and P. Somogyi. "Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus." *Neuron* 21(1998):545-559.
- Nusser, Z., E. Mulvihill, P. Streit, and P. Somogyi. "Subsynaptic segregation of metabotropic and ionotropic glutamate receptors as revealed by immunogold localization." *Neuroscience* 61(1994):421-427.
- Ofir, R., V.J. Dwarki, D. Rashid, and I.M. Verma. "CREB represses transcription of fos promoter: role of phosphorylation." *Gene Expr.* 1(1991):55-60.
- Parsons, B., T.C. Rainbow, N.J. MacLusky, and B.S. McEwen. "Progesterone receptor levels in rat hypothalamic and limbic nuclei." *J.Neurosci.* 2(1982):1446-1452.
- Peters, Palay, and Webster. *The fine structure of the nervous system.* 1991. (GENERIC)  
Ref Type: Generic
- Peters, A. and I.R. Kaiserman-Abramof. "The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines." *Am.J.Anat.* 127(1970):321-355.
- Petralia, R.S., J.A. Esteban, Y.X. Wang, J.G. Partridge, H.M. Zhao, R.J. Wenthold, and R. Malinow. "Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses." *Nat.Neurosci.* 2(1999):31-36.
- Pierce, J.P., K. van Leyen, and J.B. McCarthy. "Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines." *Nat.Neurosci.* 3(2000):311-313.
- Pockett, S. and A. Figurov. "Long-term potentiation and depression in the ventral horn of rat spinal cord in vitro." *Neuroreport.* 4(1993):97-99.
- Pongracz, F. "The function of dendritic spines: a theoretical study." *Neuroscience* 15(1985):933-946.
- Popov, V.I., L.S. Bocharova, and A.G. Bragin. "Repeated changes of dendritic morphology in the hippocampus of ground squirrels in the course of hibernation." *Neuroscience* 48(1992):45-51.
- Qian, Z., M.E. Gilbert, M.A. Colicos, E.R. Kandel, and D. Kuhl. "Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation." *Nature* 361(1993):453-457.
- Racca, C., F.A. Stephenson, P. Streit, J.D. Roberts, and P. Somogyi. "NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area." *J.Neurosci.* 20(2000):2512-2522.
- Rampon, C., Y.P. Tang, J. Goodhouse, E. Shimizu, M. Kyin, and J.Z. Tsien. "Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice." *Nat.Neurosci.* 3(2000):238-244.

- Raymond, L.A., C.D. Blackstone, and R.L. Huganir. "Phosphorylation and modulation of recombinant GluR6 glutamate receptors by cAMP-dependent protein kinase." *Nature* 361(1993):637-641.
- Robinson, T.E. and B. Kolb. "Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine." *Eur.J.Neurosci.* 11(1999):1598-1604.
- Rocha, M. and M. Sur. "Rapid acquisition of dendritic spines by visual thalamic neurons after blockade of N-methyl-D-aspartate receptors." *Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A.* 92(1995):8026-8030.
- Rogan, M.T., U.V. Staubli, and J.E. LeDoux. "Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala [published erratum appears in *Nature* 1998 Feb 19;391(6669):818]." *Nature* 390(1997):604-607.
- Rosenmund, C., J.D. Clements, and G.L. Westbrook. "Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse." *Science* 262(1993):754-757.
- Rothman, S.M., J.H. Thurston, and R.E. Hauhart. "Delayed neurotoxicity of excitatory amino acids in vitro." *Neuroscience* 22(1987):471-480.
- Rusakov, D.A., H.A. Davies, E. Harrison, G. Diana, G. Richter-Levin, T.V. Bliss, and M.G. Stewart. "Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus." *Neuroscience* 80(1997):69-77.
- Schierhorn, H. "[Structural change in neocortical pyramidal neurons in man in the 5th to 9th decade] Strukturwandel neokortikaler Pyramidenneurone des Menschen während des 5. bis 9. Dezenniums." *Psychiatr.Neurol.Med Psychol.(Leipz.)* 33(1981):664-673.
- Schlaggar, B.L., K. Fox, and D.D. O'Leary. "Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex." *Nature* 364(1993):623-626.
- Schuman, E.M. "Synapse specificity and long-term information storage." *Neuron* 18(1997):339-342.
- Schuster, T., M. Krug, and J. Wenzel. "Spinules in axospinous synapses of the rat dentate gyrus: changes in density following long-term potentiation." *Brain Res.* 523(1990):171-174.
- Schwartzkroin, P.A. and P. Andersen. "Glutamic acid sensitivity of dendrites in hippocampal slices in vitro." *Adv.Neurol.* 12(1975):45-51.
- Segal, I., I. Korkotian, and D.D. Murphy. "Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? ." *Trends.Neurosci.* 23(2000):53-57.
- Shepherd, G.M. "The dendritic spine: a multifunctional integrative unit." *J.Neurophysiol.* 75(1996):2197-2210.
- Shepherd, G.M. and K.M. Harris. "Three-dimensional structure and composition of CA3-->CA1 axons in rat hippocampal slices: implications for presynaptic connectivity and compartmentalization." *J.Neurosci.* 18(1998):8300-8310.
- Shi, S.H., Y. Hayashi, R.S. Petralia, S.H. Zaman, R.J. Wenthold, K. Svoboda, and R. Malinow. "Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation." *Science* 284(1999):1811-1816.
- Shigemoto, R., A. Kulik, J.D. Roberts, H. Ohishi, Z. Nusser, T. Kaneko, and P. Somogyi. "Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone." *Nature* 381(1996):523-525.

- Sigrist, S.J., P.R. Thiel, D.F. Reiff, P.E. Lachance, P. Lasko, and C.M. Schuster. "Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions [see comments]." *Nature* 2000.Jun.29.;405.(6790.):1062.-5. 405:1062-1065.
- Simpkins, J.W., P.S. Green, K.E. Gridley, M. Singh, N.C. de Fiebre, and G. Rajakumar. "Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease." *Am.J.Med* 103(1997):19S-25S.
- Sirevaag, A.M. and W.T. Greenough. "Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. II. Synaptic morphometry." *Brain Res.* 351(1985):215-226.
- Sommer, B., K. Keinanen, T.A. Verdoorn, W. Wisden, N. Burnashev, A. Herb, M. Kohler, T. Takagi, B. Sakmann, and P.H. Seeburg. "Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS." *Science* 249(1990):1580-1585.
- Song, I., S. Kamboj, J. Xia, H. Dong, D. Liao, and R.L. Huganir. "Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors." *Neuron* 21(1998):393-400.
- Sorra, K.E. and K.M. Harris. "Occurrence and three-dimensional structure of multiple synapses between individual radiatum axons and their target pyramidal cells in hippocampal area CA1." *J.Neurosci.* 13(1993):3736-3748.
- Sorra, K.E., J.C. Fiala, and K.M. Harris. "Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation." *J.Comp.Neurol.* 398(1998a):225-240.
- Sorra, K.E. and K.M. Harris. "Stability in synapse number and size at 2 hr after long-term potentiation in hippocampal area CA1." *J.Neurosci.* 18(1998b):658-671.
- Sousa, N., N.V. Lukoyanov, M.D. Madeira, O.F. Almeida, and M.M. Paula-Barbosa. "Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement." *Neuroscience.* 97(2000):253-266.
- Spacek, J. and K.M. Harris. "Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat." *J.Neurosci.* 17(1997):190-203.
- Staubli, U., D. Chun, and G. Lynch. "Time-dependent reversal of long-term potentiation by an integrin antagonist ." *J.Neurosci.* 18(1998):3460-3469.
- Staubli, U., O. Thibault, M. DiLorenzo, and G. Lynch. "Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory." *Behav.Neurosci.* 103(1989):54-60.
- Stein-Behrens, B., M.P. Mattson, I. Chang, M. Yeh, and R. Sapolsky. "Stress exacerbates neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus." *J.Neurosci.* 14(1994):5373-5380.
- Sterio, D.C. "The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector." *J.Microsc.* 134(1984):127-136.
- Stoppini, L., P.A. Buchs, and D. Muller. "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue." *J.Neurosci.Methods* 37(1991):173-182.
- Storm-Mathisen, J. "Accumulation of glutamic acid decarboxylase in the proximal parts of presumed GABA-ergic neurones after axotomy." *Brain Res.* 87(1975):107-109.
- Storm-Mathisen, J. and L.L. Iversen. "Uptake of [3H]Glutamic acid in excitatory nerve endings: light and electronmicroscopic observations in the hippocampal formation of the rat." *Neuroscience* 4(1979):1237-1253.

- Storm-Mathisen, J., A.K. Leknes, A.T. Bore, J.L. Vaaland, P. Edminson, F.M. Haug, and O.P. Ottersen. "First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry." *Nature* 301(1983):517-520.
- Suen, P.C., K. Wu, E.S. Levine, H.T. Mount, J.L. Xu, S.Y. Lin, and I.B. Black. "Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1." *Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A.* 94(1997):8191-8195.
- Sunanda, M.S. Rao, and T.R. Raju. "Effect of chronic restraint stress on dendritic spines and excrescences of hippocampal CA3 pyramidal neurons--a quantitative study." *Brain Res.* 694(1995):312-317.
- Super, H., S.P. Perez, and E. Soriano. "Survival of Cajal-Retzius cells after cortical lesions in newborn mice: a possible role for Cajal-Retzius cells in brain repair." *Brain Res.Dev.Brain Res.* 98(1997):9-14.
- Suzuki, T. and K. Okumura-Noji. "NMDA receptor subunits epsilon 1 (NR2A) and epsilon 2 (NR2B) are substrates for Fyn in the postsynaptic density fraction isolated from the rat brain." *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 216(1995):582-588.
- Takumi, Y., V. Ramirez-Leon, P. Laake, E. Rinvik, and O.P. Ottersen. "Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses." *Nat.Neurosci.* 2(1999):618-624.
- Tamas, G., E.H. Buhl, A. Lorincz, and P. Somogyi. "Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons." *Nat.Neurosci.* 3(2000):366-371.
- Tan, S.E., R.J. Wenthold, and T.R. Soderling. "Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons." *J.Neurosci.* 14(1994):1123-1129.
- Tang, Y.P., E. Shimizu, G.R. Dube, C. Rampon, G.A. Kerchner, M. Zhuo, G. Liu, and J.Z. Tsien. "Genetic enhancement of learning and memory in mice." *Nature* 401(1999):63-69.
- Tarrant, S.B. and A. Routtenberg. "Postsynaptic membrane and spine apparatus: proximity in dendritic spines." *Neurosci.Lett.* 11(1979):289-294.
- Teyler, T.J., R.M. Vardaris, D. Lewis, and A.B. Rawitch. "Gonadal steroids: effects on excitability of hippocampal pyramidal cells." *Science* 209(1980):1017-1018.
- Trommald, M. and G. Hulleberg. "Dimensions and density of dendritic spines from rat dentate granule cells based on reconstructions from serial electron micrographs." *J.Comp.Neurol.* 377(1997):15-28.
- Van Reempts, J., M. Dikova, L. Werbrouck, G. Clincke, and M. Borgers. "Synaptic plasticity in rat hippocampus associated with learning." *Behav.Brain Res.* 51(1992):179-183.
- Vanderklish, P., T.C. Saido, C. Gall, A. Arai, and G. Lynch. "Proteolysis of spectrin by calpain accompanies theta-burst stimulation in cultured hippocampal slices." *Brain Res.Mol.Brain Res.* 32(1995):25-35.
- Ventura, R. and K.M. Harris. "Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes." *J.Neurosci.* 19(1999):6897-6906.
- Vincent, S.R. and E.G. McGeer. "A substance P projection to the hippocampus." *Brain Res.* 215(1981):349-351.
- Volkmar, F.R. and W.T. Greenough. "Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat." *Science* 176(1972):1145-1147.

- Vozech, F. and J. Myslivecek. "Quantitative changes of dendrites in rat dentate gyrus and basal nucleus of Meynert after passive avoidance training in the neonatal period." *Neurosci.Lett.* 204(1996):21-24.
- Walmsley, B., F.R. Edwards, and D.J. Tracey. "Nonuniform release probabilities underlie quantal synaptic transmission at a mammalian excitatory central synapse." *J.Neurophysiol.* 60(1988):889-908.
- Wan, J. and M. Poo. "Activity-induced potentiation of developing neuromuscular synapses." *Science* 285(1999):1725-1728.
- Wang, Y.T. and M.W. Salter. "Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases." *Nature* 369(1994):233-235.
- Warren, S.G., A.G. Humphreys, J.M. Juraska, and W.T. Greenough. "LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats." *Brain Res.* 703(1995):26-30.
- Weeks, A.C., T.L. Ivanco, J.C. LeBoutillier, R.J. Racine, and T.L. Petit. "Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: I. The intermediate maintenance phase." *Synapse* 31(1999):97-107.
- Weeks, A.W., T.L. Ivanco, J.C. LeBoutillier, R.J. Racine, and T.L. Petit. "The degree of potentiation is associated with synaptic number during the maintenance of long-term potentiation in the rat dentate gyrus." *Brain Res.* 798(1998):211-216.
- Wenzel, J., W. Kirsche, G. Kunz, H. Neumann, M. Wenzel, and E. Winkelmann. "[Light and electron microscopy studies on dendrite spines in the hippocampal pyramidal neurons (CA 1) of the rat]  
Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Dendritenspines an Pyramiden-Neuronen des Hippocampus (CA 1) bei der Ratte." *J.Hirnforsch.* 13(1973):387-408.
- Wenzel, J., G. Lammert, U. Meyer, and M. Krug. "The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain." *Brain Res.* 560(1991):122-131.
- Westrum, L.E. "Synaptic contacts on axons in the cerebral cortex." *Nature* 210(1966):1289-1290.
- Wo, Z.G. and R.E. Oswald. "Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels." *Trends.Neurosci.* 18(1995):161-168.
- Wong, E.H. and J.A. Kemp. "Sites for antagonism on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex." *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 31(1991):401-425.
- Woolley, C.S. "Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus." *Horm.Behav.* 34(1998):140-148.
- Woolley, C.S., E. Gould, M. Frankfurt, and B.S. McEwen. "Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons." *J.Neurosci.* 10(1990a):4035-4039.
- Woolley, C.S., E. Gould, and B.S. McEwen. "Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons." *Brain Res.* 531(1990b):225-231.
- Woolley, C.S., H.J. Wenzel, and P.A. Schwartzkroin. "Estradiol increases the frequency of multiple synapse boutons in the hippocampal CA1 region of the adult female rat." *J.Comp.Neurol.* 373(1996):108-117.



- Wu, K., J.L. Xu, P.C. Suen, E. Levine, Y.Y. Huang, H.T. Mount, S.Y. Lin, and I.B. Black. "Functional trkB neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density." *Brain Res.Mol.Brain Res.* 43(1996):286-290.
- Wu, L., D. Wells, J. Tay, D. Mendis, M.A. Abbott, A. Barnitt, E. Quinlan, A. Heynen, J.R. Fallon, and J.D. Richter. "CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses." *Neuron* 21(1998):1129-1139.
- Wyszynski, M., J. Lin, A. Rao, E. Nigh, A.H. Beggs, A.M. Craig, and M. Sheng. "Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor." *Nature* 385(1997):439-442.
- Xu, L., R. Anwyl, and M.J. Rowan. "Spatial exploration induces a persistent reversal of long-term potentiation in rat hippocampus." *Nature* 394(1998):891-894.
- Yakel, J.L., P. Vissavajhala, V.A. Derkach, D.A. Brickey, and T.R. Soderling. "Identification of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92(1995):1376-1380.
- Yuste, R., A. Majewska, and K. Holthoff. "From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines ." *Nat.Neurosci.* 3(2000):653-659.
- Zhang, L.I., H. Tao, and M. Poo. "Visual input induces long-term potentiation of developing retinotectal synapses ." *Nat.Neurosci.* 3(2000):708-715.
- Zheng, F. and J.P. Gallagher. "Metabotropic glutamate receptors are required for the induction of long-term potentiation." *Neuron* 9(1992):163-172.
- Ziff, E.B. "Enlightening the postsynaptic density." *Neuron* 19(1997):1163-1174.
- Zigmond, M.J. Bloom, F.E, Landis, S.C., Roberts, J.L. and Squire, L.R. "Fundamental neuroscience". Academic press (1999)
- Ziv, N.E. and S.J. Smith. "Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation." *Neuron* 17(1996):91-102.