

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1753

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences biologiques et Médicales

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement

Le 25 Novembre 2010

*Par **Magali Mondin***

Née le 6 Janvier 1984 à Talence

Rôle de l'interaction Neurexine-1 β /Neuroligine-1 dans l'assemblage des post-synapses glutamatergiques et le recrutement des récepteurs AMPA

Membres du Jury

NAGY Frédéric	Directeur de recherche (CNRS)	Président du jury
VAROQUEAUX Frédérique	Directeur de recherche (Max Planck)	Rapporteur
FAIVRE-SARRAILH Catherine	Directeur de recherche (CNRS)	Rapporteur
SCHEIFFELE Peter	Professeur (Biozentrum)	Examineur
GERROW Kimberly	Post-doctorante (INSERM)	Examineur
HEINE Martin	Directeur de recherche (IFN)	Membre invité
THOUMINE Olivier	Chargé de recherche (CNRS)	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Très honorée de leur présence, je tiens à remercier les membres du jury : le Dr. Frédéric Nagy, le Dr. Frédérique Varoqueaux, le Dr. Catherine Faivre-Sarrailh, le Pr. Peter Scheiffele, le Dr. Kimberly Gerrow et le Dr. Martin Heine.

Je remercie Christophe Mulle de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je remercie également Daniel Choquet pour m'avoir aidé à développer ma curiosité scientifique en me donnant la chance de travailler dans son équipe.

Je voudrais adresser un immense merci à Olivier Thoumine pour la confiance qu'il m'a accordé au cours de ces trois années ainsi que pour son soutien et son respect de la science et du travail. Merci aussi pour ses encouragements constants et son enthousiasme communicatif (je lui dois la photo du mois de la PICIN, le début de la gloire).

Au cours de mon expérience dans la recherche, j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes qui ont influencé plus ou moins directement mes choix. Merci à Françoise Coussen pour m'avoir fait découvrir ce monde. Tu m'as appris à parler aux cellules (vous aurez remarqué le « tu ») et ce n'est quand même pas donné à tout le monde. Merci à Marie-Christine Lombard pour avoir été fière de nous et nous l'avoir souvent dit pendant (et après) les deux années d'EPHE. Merci aussi à Fred J. premier spécimen d'étudiant en thèse que j'ai rencontré tôt un matin (vers 11h), avec qui j'ai fait mes premières images de neurones sur fond de David Bowie.

Un grand merci à Eli, Marcel Freud personnel et amie attentionnée. Ta clairvoyance et ta sincérité m'ont beaucoup apporté. Merci aussi à Delphine pour son optimisme légendaire, dont je ne citerai ici qu'un exemple : «Ce n'est pas positif, mais ce n'est pas totalement négatif». Merci à Christelle, je continue de croire que ça doit être sympa de vivre dans ton monde.

Merci aussi à la PICIN, je suis une fan de la première heure de vos hommages aux chanteurs disparus. Merci à mon Jéjé, « meilleur gestionnaire landais nain et chauve » du monde, reconverti en « tour operator » pour les Seychelles (oui c'est plutôt rare).

Cette aventure ne se serait pas aussi bien passée, sans les copains du lab, copains de galère et de grands craquages salvateurs. Merci Fred, Lucie, Deb et Béa, pour les parties de jungle speed endiablées, les grands moments dans le Cantal (mais ce qui se passe dans la Cantal, reste dans le Cantal) et pour les moments de confiance. Merci à la « Jousey team », Jouseyte, maxi Jousey, midi Jousey, mini Jousey et Akel ... Merci Jojo, de m'avoir rappelé que le monde extérieur existe et que l'on peut même s'y marrer. Julien, Damien et Julien, merci pour nos discussions de coursive très culturelles...en quelques mots vous me faites rêver. A Akel, c'est promis un jour j'arriverai à te rendre un service.

Aux copains qui ne sont pas du lab (si c'est possible). Alex, la coloc magique, un jour on l'aura cette villa en première ligne. Tom, Mart et Ju, 10 ans de belotes, à base de salami de pâtes carbo et de cassage de tibia. Merci à vous d'être là en toutes circonstances.

Merci aussi à, mon copain Polo, Alice et Nico, Eric, Olivier R et Greg, David, à Maître Christophe Blanchet, Pato, Nelson, Mario et Virginie, sans oublier Peggy, Dany, Pierrot et Julie, Nono (le chouchou de ces dames), Natacha, mes petits « Anaël et Mika » et mon collègue Roro.

Enfin, un immense que dis-je un gigantesque merci à mes parents, à Tita et Nano, pour m'avoir fait confiance année après année et pour leur soutien permanent.

Tout ça pour dire, qu'il y a de belles balades à faire dans le coin...

RESUME

Dans le système nerveux central, la synaptogenèse est un processus complexe multi-étapes qui se déroule aux contacts axones/dendrites. Les molécules d'adhérence neurexines/neuroligines jouent un rôle essentiel dans ce processus, en créant un lien physique entre les compartiments pré- et post-synaptiques et en participant au recrutement des complexes macromoléculaires essentiels à la fonction synaptique. Plus spécifiquement, le complexe neurexine-1 β /neuroligine-1 induit la formation de post-synapses excitatrices, en recrutant des molécules d'échafaudage telles que PSD-95 et des récepteurs du glutamate.

Mon travail de thèse a consisté à étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu par les adhésions neurexines/neuroligines lors de la formation des post-synapses glutamatergiques. En utilisant des systèmes biomimétiques (neurexine purifiée fixée sur des billes, ou agrégée par des anticorps réticulés), nous avons induit des adhésions spécifiques neurexine-1 β /neuroligine-1 sur des neurones d'hippocampe en culture. Nous avons ainsi étudié la distribution dynamique des composants post-synaptiques (récepteurs AMPA, PSD-95) endogènes ou étiquetés avec des protéines fluorescentes, par vidéo-microscopie.

Dans un premier article, nous avons montré que la formation de ces contacts induisait un recrutement rapide de PSD-95 ainsi que des récepteurs NMDA et AMPA fonctionnels. En utilisant des récepteurs AMPA recombinants, j'ai montré que ce recrutement était dicté par la sous-unité GluA2.

Dans une deuxième étude, en comparant le recrutement de PSD-95 induit par la neurexine avec des anticorps non-activants, nous avons mis en évidence un mécanisme d'activation spécifique de neuroligine-1 induit par la liaison de neurexine-1 β . L'utilisation de mutants ponctuels de neuroligine-1 a permis de montrer que cette activation passe probablement par la déphosphorylation d'une tyrosine unique située dans le domaine C-terminal de la neuroligine-1.

Enfin, en étudiant la diffusion latérale des rAMPA de surface par suivi de particules uniques fluorescentes (Quantum dots), ainsi qu'une batterie d'outils moléculaires pour moduler les adhésions neurexine/neuroligine (sur-expression, siRNA, souris KO), nous avons montré que les rAMPA sont recrutés aux adhésions neurexine-1 β /neuroligine-1 via l'échafaudage PSD-95 et que ce recrutement nécessite la diffusion des récepteurs dans la membrane plasmique. Nous proposons ainsi que les récepteurs AMPA soient recrutés aux contacts naissants via un mécanisme original de diffusion/piégeage.

Mots-clé : Synaptogenèse, neuroligine-1, neurexine-1 β , adhérence, PSD-95, AMPA

ABSTRACT

In the central nervous system, synaptogenesis is a multi step process occurring at axo-dendritic contacts. Neurexins/neuroligins adhesions are particularly involved in this process, making a bridge between the pre- and the post-synapse, and participating to the recruitment of macromolecular complexes essential for synaptic function. More precisely neurexin-1 β /neuroligin-1 complex is specifically involved in the formation of excitatory synapses, inducing the recruitment of glutamatergic post-synapses components, such as PSD-95, and glutamate receptors.

During my PhD, I focused on the molecular mechanisms involved in glutamatergic post-synapses formation triggered by neurexin-1 β /neuroligin-1 adhesions. Using biomimetic models (beads coated with purified neurexin, or purified neurexin cross-linked with aggregated antibodies) we induced specific neurexin-1 β /neuroligin-1 adhesions on cultured hippocampal neurons. We then studied the dynamic distribution of either endogenous or recombinant post-synaptic components (PSD-95, AMPARs) with live-imaging techniques.

First, we showed that the formation of these contacts induced a rapid recruitment of PSD-95 and functional NMDA and AMPA receptors. Using recombinant AMPA receptors, I showed that this recruitment was mediated by GluA2 subunit.

In a second study, using systematic comparison between the recruitment of PSD-95 induced either by neurexin-1 β or by “non activating” antibody binding on neuroligin-1, we revealed a specific activation mechanism of neuroligin-1 induced by neurexin-1 β binding. Using point mutations on neuroligin-1, we showed that this activation mechanism is mediated by a tyrosine dephosphorylation on neuroligin-1 intracellular tail.

Finally, we studied AMPA receptor surface diffusion with single particle tracking experiments, using different molecular tools to perturb neurexin-1 β /neuroligin-1 adhesions (overexpression, RNA interference, KO mice). We showed that AMPA receptors recruitment at new-formed neurexin-1 β /neuroligin-1 adhesions occurs through PSD-95, and involves surface diffusion of AMPA receptors. We proposed an original diffusion/trap mechanism of AMPA receptors at nascent contacts.

Key Words: Synaptogenesis, neuroligin-1, neurexin-1 β , adhesion, PSD-95, AMPA

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Magali Mondin, Eric Hosy, Martin Heine, Florian Levet, Christel Poujol, Christophe Blanchet, Daniel Choquet, Olivier Thoumine. Neurexin-neurologin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 (submitted)

Grégory Giannone, **Magali Mondin**, Edouard Saint-Michel, Béatrice Tessier, Daniel Choquet, Olivier Thoumine. Ligand-activation of neurologin-1 by neurexin-1 β triggers PSD-95 recruitment through tyrosine dephosphorylation (submitted)

Katalin Czondör, **Magali Mondin**, Mikaël Garcia, Jean-Baptiste Sibarita, Daniel Choquet, Olivier Thoumine. A Diffusion/Reaction model to predict AMPA receptor trapping at synapses (In preparation)

Magali Mondin, Mario Carta, Elisabeth Normand, Christophe Mulle, Françoise Coussen. Profilin II regulates the exocytosis of glutamate receptors of the kainate type. JBC. *In Press*

J-M Revest, N Kaouane, **M Mondin**, A Le Roux, F Rougé-Pont, M Vallée, J Barik, F Tronche, A Desmedt and P V Piazza. The enhancement of stress-related memory by glucocorticoids depends on synapsin-Ia/Ib. Molecular Psychiatry, 2010

Martin Heine, Olivier Thoumine, **Magali Mondin**, Béatrice Tessier, Grégory Giannone, Daniel Choquet. Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neurologin contacts. PNAS, 2008

Mondin Magali, Moreau Violaine, Genot Elisabeth, Combe Christian, Ripoche Jean, Dubus Isabelle. Alterations in cytoskeletal protein expression by mycophenolic acid in human mesangial cells Requires Rac inactivation. Biochem pharmacol, 2007

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Magali Mondin, Eric Hosy, Martin Heine, Daniel Choquet, Olivier Thoumine. The neurologin1/neurexin1 β interaction promotes AMPA receptor recruitment at post-synapses through a diffusion trap mechanism. (FENS Forum, 2010, Amsterdam, Netherlands)

Magali Mondin, Béatrice Tessier, Christel Poujol, Gregory Giannone, Daniel Choquet, Olivier Thoumine. The neurologin1/ β neurexin interaction promotes AMPA receptors recruitment and stabilization at post-synapses through a diffusion trap mechanism. (Gordon Research Conference: Excitatory Synapses & Brain Function, 2009, Les diablerets, Switzerland)

Magali Mondin, Béatrice Tessier, Christel Poujol, Gregory Giannone, Daniel Choquet, Olivier Thoumine. The neuroligin1/ β neurexin interaction promotes AMPA receptors recruitment and stabilization at post-synapses through a diffusion trap mechanism. (Société française des neurosciences, 2009, Bordeaux, France)

Magali Mondin, Béatrice Tessier, Christel Poujol, Gregory Giannone, Daniel Choquet, Olivier Thoumine. The neuroligin1/ β neurexin interaction promotes AMPA receptors recruitment and stabilization at post-synapses. (New frontiers in neurophotonics, 1st Franco-canadian symposium, 2008, Bordeaux, France)

Magali Mondin, Martin Heine, Gregory Giannone, Béatrice Tessier, Olivier Thoumine, Daniel Choquet. Post-synapses triggered by neurexin-neuroligin binding rapidly recruit functional NMDA and AMPA receptors. (FENS Forum, 2008, Geneva, Switzerland)

COMMUNICATIONS ORALES

Magali Mondin, Eric Hosy, Martin Heine, Daniel Choquet, Olivier Thoumine. Diffusion/Trapping of AMPA receptors at neurexin-neuroligin adhesions through PSD-95. (8th Synapse Day Meeting, 2010, Bordeaux, France)

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	10
I. Vue d'ensemble des post-synapses glutamatergiques	11
A. Les récepteurs du glutamate de type AMPA	12
1. <i>Structure des rAMPA</i>	12
2. <i>Assemblage et expression des rAMPA</i>	14
3. <i>Mécanismes d'adressage des rAMPA aux synapses</i>	15
a. <i>Transport vésiculaire dendritique</i>	15
b. <i>Insertion/internalisation</i>	15
c. <i>Trafic de surface des rAMPA</i>	16
d. <i>Trafic sous-unité et activité-dépendant</i>	17
B. Les protéines d'échafaudage impliquées dans la rétention synaptique des rAMPA	18
II. La synaptogenèse dans le SNC	20
A. Les étapes de la synaptogenèse	20
B. Modèles d'étude de la synaptogenèse	23
C. Mécanismes de transport des composants synaptiques	24
1. <i>Transport des composants pré-synaptiques</i>	24
2. <i>Transport des composants post-synaptiques</i>	25
D. Rôle de l'activité synaptique dans la synaptogenèse: cas des synapses glutamatergiques	27
E. Modèles d'étude appliqués au rôle des protéines d'adhérence dans la synaptogenèse	28
1. <i>Etudes de perte ou de gain de fonction</i>	28
2. <i>Le modèle de co-culture et le concept d'hémi synapse</i>	28
3. <i>Microsphères recouvertes de protéines d'adhérence</i>	30
III. Molécules d'adhérence : de la structure à la fonction dans la synaptogenèse	31
A. SynCAMs	31
1. <i>Structure, partenaires protéiques et expression</i>	31
2. <i>Rôle des SynCAMs dans la synaptogenèse</i>	33

B. Cadhérines	34
1. <i>Structure, partenaires protéiques et expression</i>	34
2. <i>Rôle des cadhérines dans la synaptogenèse</i>	36
C. Éphrines/récepteurs Eph	37
1. <i>Structure, partenaires protéiques et expression</i>	37
2. <i>Rôle des éphrines/rEph dans la synaptogenèse</i>	39
D. Neurexines	40
1. <i>Structure, partenaires protéiques et expression</i>	40
2. <i>Rôle des neurexines dans la synaptogenèse</i>	41
E. LRRTMs	42
1. <i>Structure, partenaires protéiques et expression</i>	42
2. <i>Rôle des LRRTMs dans la synaptogenèse</i>	43
F. Neuroligines	44
1. <i>Structure, partenaires protéiques et expression</i>	44
2. <i>Rôle des neuroligines dans la synaptogenèse</i>	46
a. <i>Les études de gain ou de perte de fonction en culture</i>	46
b. <i>Les études de gain ou de perte de fonction: modèles animaux</i>	48
c. <i>Etudes de la fonction synaptogène des neuroligines</i>	49
d. <i>Les complexes neurexines/neuroligines participent au contrôle de l'équilibre excitation/inhibition</i>	50
e. <i>Pathologies associées avec des dysfonctions des complexes neurexines/neuroligines</i>	52
OBJECTIFS	55
RESULTATS	56
I. Article1 : Activity-independent and subunit-specific recrutement of functional AMPA receptors at neurexin/neuroligin contacts	56
A. Problématique	56
B. Résultats majeurs	57

II. Article 2: Ligand-activation of neuroligin-1 by neurexin-1β triggers PSD-95 recruitment through a phosphotyrosine switch	70
A. Problématique	70
B. Résultats majeurs	71
III. Article 3: Neurexin-neuroligin adhesions capture AMPA receptors through PSD-95	116
A. Problématique	116
B. Résultats majeurs	116
DISCUSSION/PERSPECTIVES	165
I. Evolution des modèles biomimétiques	165
II. Mécanismes de recrutement	166
A. Mise en place de l'échafaudage PSD-95	166
B. Recrutement des rAMPA	167
1. <i>Les rAMPA sont recrutés de manière indépendante de l'activité mais dépendante de leur composition en sous-unité</i>	167
2. <i>Le recrutement des rAMPA aux contacts Nrx1β/Nlg1, implique un mécanisme de diffusion latérale dans la membrane plasmique</i>	169
3. <i>Les rAMPA sont recrutés via des « plateformes » de PSD-95</i>	169
III. Assemblage par compétition	170
IV. Rôle primordial des complexes Nrx/Nlg dans la synaptogenèse	171
V. Extension du modèle de diffusion piégeage des rAMPA, de la synaptogenèse à la plasticité	172
VI. Activation par le ligand	173
BIBLIOGRAPHIE	176

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les synapses sont des jonctions intercellulaires spécialisées, dédiées au transfert d'information d'un neurone à sa cible, généralement un autre neurone. Dans le système nerveux central (SNC) des vertébrés, la plupart des synapses sont des synapses chimiques, qui sont des structures asymétriques composées d'une terminaison pré-synaptique et d'une densité post-synaptique étroitement apposées. Dans le cerveau humain, chacun des 10^{11} neurones établit environ 10000 contacts synaptiques (Garner et al., 2002). Les synapses chimiques peuvent être de plusieurs types, selon les neurotransmetteurs qu'elles utilisent. Il existe ainsi les synapses excitatrices, dont le glutamate est le principal neurotransmetteur, mais aussi les synapses inhibitrices (Glycine, GABA : acide γ -aminobutyrique) et les synapses modulatrices (Sérotonine, Dopamine...).

La terminaison pré-synaptique contient des centaines de vésicules remplies de neurotransmetteur (Figure 1). La fusion de ces vésicules synaptiques (SV) avec la membrane plasmique en réponse à un potentiel d'action se fait au niveau de sites spécifiques de la terminaison, les zones actives (Figure 1) (Burns and Augustine, 1995). La fusion des SV entraîne la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique, un espace de 20-25 nm entre les cellules pré- et post-synaptiques (Figure 1) (Schikorski and Stevens, 1997). Une fois libérés, les neurotransmetteurs se lient à des récepteurs spécifiques ancrés dans la membrane et dans la densité post-synaptique (Figure 1). L'activation des récepteurs induit la génération de flux ioniques, une dépolarisation locale, l'activation de canaux ioniques voltage-dépendants, ainsi que diverses cascades de signalisation. L'ensemble de cette séquence d'évènements représente les bases de la transmission synaptique et du transfert d'information dans le SNC.

Lors de la formation des synapses, un même neurone reçoit différents types d'afférences et doit être capable d'y associer les éléments post-synaptiques appropriés. **Les complexes adhésifs trans-synaptiques** jouent un rôle clé, à la fois dans l'initiation et la formation des contacts entre cellule pré- et post-synaptique, mais aussi dans les phénomènes de différenciation synaptique et de recrutement des éléments essentiels à la fonction synaptique. Depuis les années 80, un grand nombre de complexes adhésifs ont été identifiés pour leurs rôles dans la formation des synapses. Nous allons ici, essayer de comprendre comment l'ensemble de ces complexes permettent la mise en place des synapses. Ont-ils des rôles spécifiques ou au contraire coopèrent-ils afin d'assurer la mise en place de synapses fonctionnelles ?

Dans le cas des synapses glutamatergiques, l'efficacité ainsi que la force de transmission sont dépendantes de la mise en place d'éléments essentiels tels que les

récepteurs du glutamate de type AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate, rAMPA) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate, rNMDA), ainsi que les protéines d'échafaudage permettant d'ancrer et de stabiliser les récepteurs au niveau des sites de libération. Le déroulement temporel, ainsi que les mécanismes moléculaires responsables de la mise en place de ces composants essentiels ne sont pas encore complètement élucidés.

Dans l'introduction, nous nous intéresserons au rôle des complexes adhésifs dans la mise en place des synapses et plus particulièrement à la mise en place des post-synapses excitatrices glutamatergiques fonctionnelles. Nous détaillerons plus particulièrement les cadhérines, SynCAMs (Synaptic Cell Adhesion Molecule), éphrines/récepteurs Eph (rEph), neurexines/LRRTM (Leucine-Rich Repeat TransMembrane protein) et neurexines/neuroligines (Nrx/Nlg).

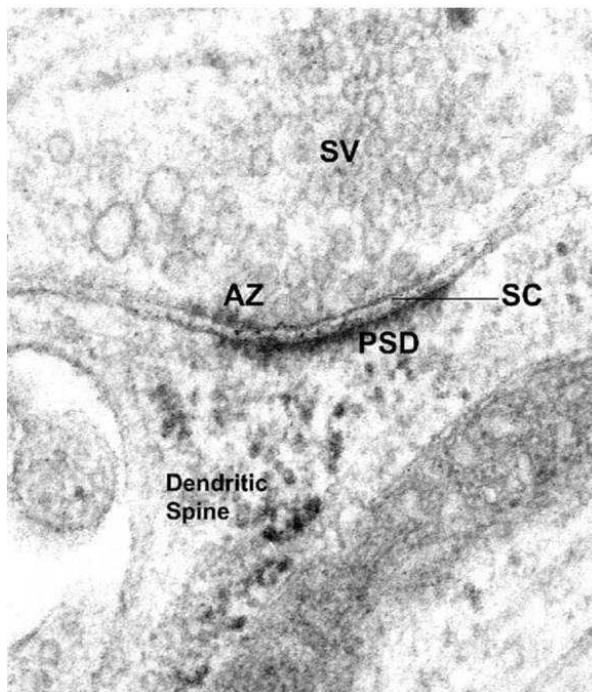


Figure 1 : Micrographie de l'ultra-structure d'une synapse excitatrice de neurones d'hippocampe en culture. La terminaison axonale est détectée par la présence des vésicules pré-synaptiques (SV) ancrées au niveau de la membrane de la zone active (AZ). La fente synaptique (SC) est visible entre les membranes pré- et post-synaptiques. Apposée à la zone active, la densité post-synaptique (PSD) est clairement visible comme un élément dense aux électrons. Modifié d'après (Boeckers, 2006).

I. Vue d'ensemble des post-synapses glutamatergiques

Dans les années 1950, des études de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence une caractéristique fondamentale des post-synapses excitatrices (Palay and Palade, 1955). En effet, la membrane post-synaptique apparaît comme plus épaisse et surtout comme très dense aux électrons (Figure 1) et a ainsi été nommée densité post-synaptique (PSD). La PSD forme un réseau protéique de 30 à 40 nm d'épaisseur, dont les composants ont été identifiés par des expériences d'isolement des synaptosomes par fractionnement, puis d'identification par immuno-détection ou spectrométrie de masse

(Phillips et al., 2001; Boeckers, 2006). On peut classer les protéines de la PSD en 6 catégories, les protéines du cytosquelette, les protéines G et les adaptateurs, les protéines de signalisation (incluant les kinases et les phosphatases), les protéines d'adhérence (sur lesquelles nous reviendrons plus tard), les protéines d'échafaudage et enfin, les récepteurs et les canaux membranaires. Les protéines d'échafaudage jouent un rôle particulier dans le trafic, ainsi que dans l'adressage et la stabilisation des récepteurs du glutamate au niveau des synapses. Ces propriétés seront abordées dans ce chapitre dans le cas particulier des rAMPA.

A. Les récepteurs du glutamate de type AMPA

Il existe deux types de récepteurs du glutamate. Les récepteurs ionotropiques qui forment des canaux ioniques et les récepteurs métabotropiques qui sont couplés à des protéines G. Les récepteurs ionotropiques peuvent être activés spécifiquement par différents agonistes. Cette propriété a permis de les classer en trois groupes, les rAMPA, les rNMDA et les récepteurs de type kaïnate (Dingledine et al., 1999). Les rAMPA sont responsables de la majorité de la transmission excitatrice rapide, alors que les récepteurs NMDA présentent des cinétiques plus lentes et jouent un rôle déterminant dans l'induction de la potentialisation et de la dépression à long terme (LTP et LTD) de la transmission synaptique. Brièvement, l'efficacité de la transmission synaptique peut être modulée par l'ajout ou la suppression rapide de récepteurs AMPA à la synapse. Lors des phénomènes de LTP et de LTD, la densité de rAMPA synaptiques est modulée sur de longues périodes (> 1 heure). Ces mécanismes sont considérés comme étant les corrélats moléculaires des phénomènes d'apprentissage (Malinow and Malenka, 2002; Nicoll, 2003). Il est donc primordial de comprendre les mécanismes par lesquels les rAMPA sont adressés et stabilisés aux synapses, au cours du développement synaptique ainsi que lors des phénomènes de plasticité.

1. Structure des rAMPA

Les rAMPA sont des hétérotétramères formés par la combinaison des sous-unités GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4. Chaque sous-unité contient environ 900 acides aminés et a un poids moléculaire d'environ 105 kDa (Rogers et al., 1991). Chaque sous-unité comprend un large domaine extracellulaire N-terminal, 3 domaines transmembranaires (TM1, TM3, TM4), un domaine intra-membranaire (TM2) et un domaine intracellulaire C-terminal (Figure

2). Le ligand se fixe dans une poche créée par l'association d'une boucle extracellulaire (entre TM3 et TM4), avec le domaine N-terminal (Figure 2).

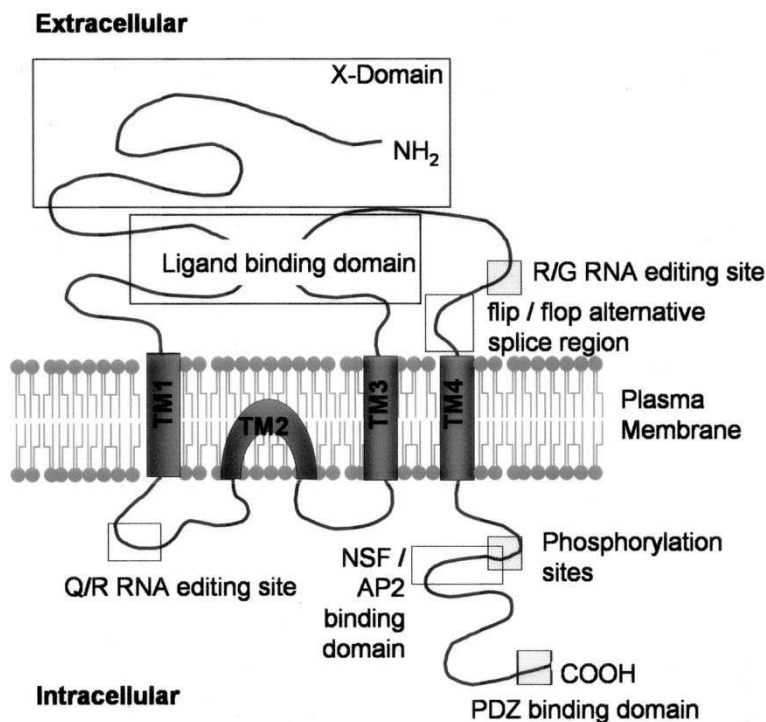


Figure 2 : Structure d'une sous-unité des rAMPA.

Le domaine N-terminal et la boucle extracellulaire forment le site de liaison du ligand. Sont aussi représentés, les domaines membranaires, ainsi que le domaine intracellulaire. Les sites d'épissage alternatif (Q/R, R/G), d'interaction avec les protéines intracellulaires, ou de phosphorylation, sont représentés par des carrés. D'après (Palmer et al., 2005)

Les sous-unités des rAMPA peuvent subir un épissage alternatif dans la boucle extracellulaire (formes flip/flop), entraînant des modifications des propriétés pharmacologiques et cinétiques du canal (Sommer et al., 1990). Les sous-unités GluA2 et GluA4, peuvent être exprimées sous une forme longue ou courte suite à un épissage alternatif dans le domaine intracellulaire (Gallo et al., 1992; Kohler et al., 1994). Seules les formes courtes sont capables de lier les domaines PDZ (Dev et al., 1999). 90% des sous-unités GluA2 sont exprimées sous leur forme courte alors que les sous-unités GluA4 sont majoritairement exprimées sous leur forme longue. Les sous-unités GluA2, 3 et 4 possèdent aussi un site d'édition de l'ARN en amont du site d'épissage flip/flop. Ce site R/G induit des modifications des propriétés de désensibilisation du récepteur (Lomeli et al., 1994). Enfin GluA2 porte un autre site d'édition de l'ARN, le site Q/R. Ce site se situe dans une zone importante pour la formation du canal et son édition (présente dans 99% des sous-unités GluA2 chez l'adulte) rend le canal imperméable au calcium (Sommer et al., 1991; Higuchi et al., 1993).

2. Assemblage et expression des rAMPA

De manière générale, les rAMPA sont synthétisés et assemblés dans le réticulum endoplasmique (RE) au niveau somatique. Les récepteurs néoformés sont alors exportés vers le Golgi, puis vers les dendrites, où le réseau trans-golgien ainsi que les structures de sécrétion sont présents (Pierce et al., 2001; Horton and Ehlers, 2003). Il existe aussi une synthèse locale dendritique des rAMPA, qui semble majoritairement régulée par l'activité synaptique (Ju et al., 2004; Sutton et al., 2006).

Une étude mettant en relation la stoechiométrie de l'association des sous-unités des rAMPA et leurs propriétés de conductance a permis de mettre en évidence que les canaux formés contiennent uniquement deux types de sous-unités différentes (Mansour et al., 2001). De plus, des expériences de co-immunoprécipitation de chacune des sous-unités dans l'hippocampe adulte ont mis en évidence l'existence d'hétéromères GluA1/GluA2 (majoritaires) et GluA2/GluA3 (Wentholt et al., 1996). La sous-unité GluA2 éditée au niveau du site Q/R est spécifiquement retenue au niveau du RE. De ce fait, la sous-unité GluA2 se retrouve en excès dans le RE par rapport aux autres sous-unités, ce qui permet d'augmenter la probabilité qu'elle fasse partie de tous les assemblages. Une fois les hétéromères formés, ils peuvent être exportés du RE vers le Golgi (Greger et al., 2002). La sous-unité GluA4 n'est exprimée que pendant les 10 premiers jours de développement post-natal dans l'hippocampe, en association avec GluA1 (Zhu et al., 2000). Enfin, les seuls homomères détectés dans l'hippocampe, sont des homomères GluA1, qui ne représentent que 8% de la population totale des rAMPA (Wentholt et al., 1996).

Après 9-10 jours en culture, 50% des rAMPA sont exprimés à la surface des neurones hippocampiques (Hall and Soderling, 1997). Dans ce même modèle de culture, des marquages immuno-cytochimiques des sous-unités des rAMPA ont permis de montrer que tôt dans le développement (avant 6 DIV), les rAMPA sont localisés de manière diffuse dans tous les neurites, y compris l'axone en développement (Craig et al., 1993; Mammen et al., 1997). Plus tard dans le développement, les rAMPA sont majoritairement enrichis au niveau des synapses et sont présents en faible densité dans la membrane extra-synaptique (Mammen et al., 1997; Nusser et al., 1998; Cottrell et al., 2000; Pickard et al., 2000). Plus précisément, les rAMPA sont localisés dans les synapses excitatrices, en face des sites de libération du glutamate (Craig et al., 1994).

3. Mécanismes d'adressage des rAMPA aux synapses

a. Transport vésiculaire dendritique

L'étude des dynamiques de transport de sous-unités recombinantes des rAMPA ont mis en évidence l'existence d'un transport intracellulaire dendritique rapide de la sous-unité GluA1. En effet, GluA1 peut être transportée du soma vers les dendrites distaux, mais aussi de manière rétrograde (Perestenko and Henley, 2003). L'existence de ce transport intracellulaire dendritique suggère l'implication de moteurs moléculaires, tels que les myosines, les dynéines ou les kinésines. En effet, diverses études ont montré un couplage entre les rAMPA et ces moteurs moléculaires via des adaptateurs, ou des protéines d'échafaudage (Setou et al., 2002; Wu et al., 2002; Lise et al., 2006). Des expériences de perturbation de ces moteurs moléculaires induisent des diminutions des réponses synaptiques de type AMPA, indiquant un défaut d'adressage des rAMPA aux synapses (Kim and Lisman, 2001; Lise et al., 2006). De plus, l'utilisation d'un siRNA (ARN interférence) contre la myosine Vb perturbe l'adressage des rAMPA dans les épines dendritiques (Wang et al., 2008).

b. Insertion/internalisation

Les rAMPA sont internalisés et réinsérés à la membrane de manière constitutive. En effet, le fait de bloquer les mécanismes d'exocytose post-synaptiques entraîne une diminution de l'amplitude des réponses AMPA synaptiques, alors que l'inhibition de l'endocytose induit une augmentation de l'amplitude de ces réponses (Luscher et al., 1999). Ces expériences indiquent que le recyclage constitutif des rAMPA, qui nécessite environ 20 minutes, est nécessaire à l'apport et au maintien des récepteurs à la synapse. Par la suite, des études de biochimie, ou d'immuno-marquage des rAMPA de surface, ont confirmé un recyclage constitutif en 10 à 30 minutes (Ehlers, 2000; Passafaro et al., 2001). De nombreuses études se sont intéressées à la localisation des sites d'exocytose et d'endocytose au niveau des synapses. Tout d'abord il apparaît que les endosomes de recyclage sont situés à proximité et non dans les épines (Park et al., 2006). Des études ont ainsi montré que l'exocytose des rAMPA s'effectue en extra-synapse, au niveau de sites non apposés à des pré-synapses (Passafaro et al., 2001; Yudowski et al., 2007; Lin et al., 2009). Cependant, lors de l'application de protocoles de LTP chimique sur des neurones en culture, l'exocytose des rAMPA se fait directement dans l'épine, dans une zone adjacente à la PSD (Wang et al., 2008). Ces données indiquent que des changements d'activité synaptique peuvent délocaliser les sites d'exocytose. De la même manière, il est proposé que les sites

d'endocytose des rAMPA soient adjacents à la PSD et que l'internalisation des récepteurs se fasse donc en péri-synapse (Blanpied et al., 2002; Petralia et al., 2003). Le fait que les sites d'endo-exocytose ne soient pas localisés au sein des synapses indique l'existence d'un mécanisme d'adressage complémentaire permettant la diffusion des récepteurs dans la membrane plasmique (Figure 3).

c. Trafic de surface des rAMPA

L'étude du trafic de surface des récepteurs membranaires a été rendue possible par le développement conjoint de techniques d'imagerie et d'outils moléculaires, permettant d'avoir accès aux récepteurs exprimés à la surface de neurones vivants. En effet, d'une part l'utilisation de récepteurs recombinants fusionnés à la pHluorin dans des expériences de FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching), a permis d'étudier la diffusion membranaire de populations de récepteurs (Ashby et al., 2006; Frischknecht et al., 2009). Et, d'autre part, le développement d'anticorps spécifiques des domaines extracellulaires des sous-unités des rAMPA, a donné accès aux études de suivi de particules ou de molécules uniques (Borgdorff and Choquet, 2002; Tardin et al., 2003; Groc et al., 2004; Bats et al., 2007). L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence 1/ que les rAMPA diffusent dans le plan de la membrane plasmique, 2/ que les récepteurs peuvent changer de comportement en quelques secondes, alternant entre diffusion libre, confinement et immobilisation, 3/ que leur diffusion est plus importante en extra-synapse que dans la synapse, où ils adoptent un comportement confiné. Il a notamment été démontré qu'au cours du développement *in vitro* la diffusion des rAMPA à la surface de neurones en culture diminue et qu'en parallèle leur confinement augmente, indiquant une corrélation entre le développement synaptique et la stabilisation des rAMPA aux synapses (Borgdorff and Choquet, 2002; Tardin et al., 2003; Bats et al., 2007). De plus, les rAMPA sont immobilisés aux synapses par leur interaction avec PSD-95 via leur sous-unité auxiliaire, la stargazine (Bats et al., 2007). Cette étude permet de mettre en évidence le concept de diffusion/piégeage, où les récepteurs diffusant dans la membrane synaptique sont piégés aux synapses par leurs partenaires intracellulaires ou membranaires. Ainsi l'adressage et la rétention des rAMPA aux synapses semble répondre à un modèle en trois étapes consécutives (Figure 3) : exocytose des rAMPA intracellulaires en péri/extra-synapse, diffusion latérale dans le plan de la membrane plasmique et rétention via les interactions avec les protéines d'échafaudage (Opazo and Choquet, 2010).

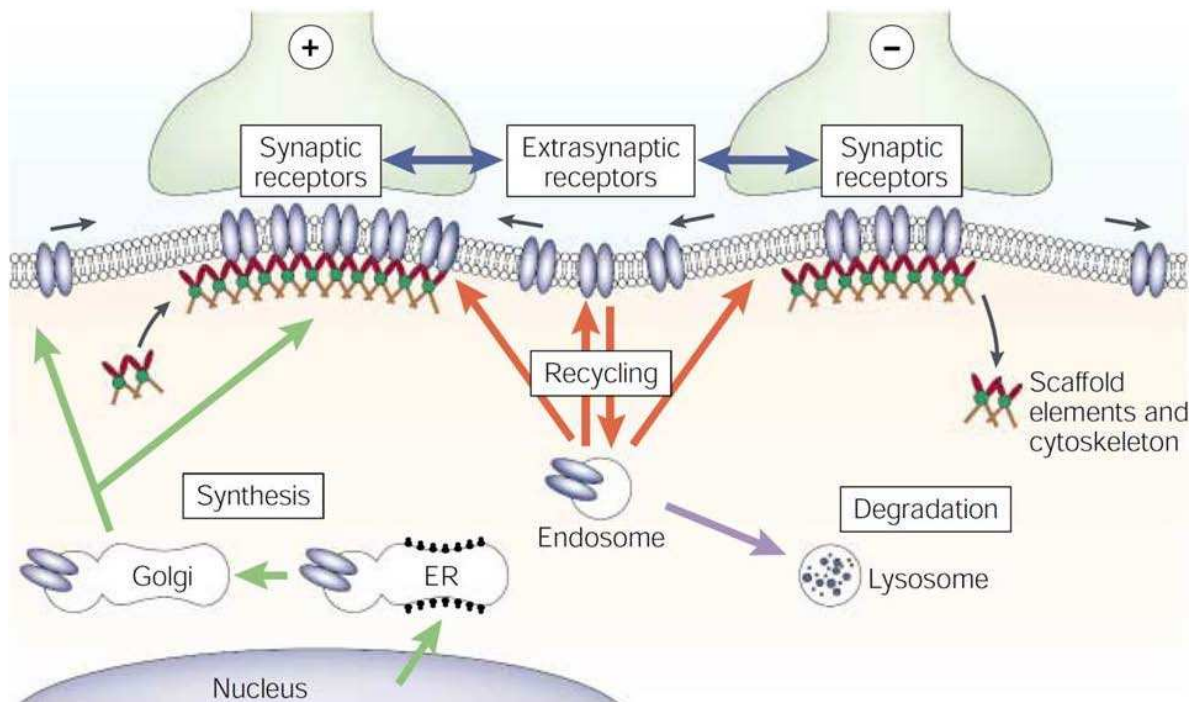


Figure 3 : Schéma représentant les modes de trafic des rAMPA. Après insertion dans la membrane, les récepteurs extra-synaptiques diffusent vers la synapse où ils seront stabilisés par l'ajout de protéines d'échafaudage (Synapse +). Au contraire, lorsque l'interaction avec l'échafaudage est rompue (Synapse -), les rAMPA quittent la synapse par diffusion latérale et vont pouvoir soit rejoindre une autre synapse, soit entrer dans les voies de recyclage et/ou de dégradation. D'après (Choquet and Triller, 2003).

d. Trafic sous-unité et activité-dépendant

Des études menées sur les sous-unités GluA1 et GluA2 recombinantes ont permis de mettre en évidence des caractéristiques de trafic intrinsèques à chaque sous-unité. La surexpression d'une des sous-unités favorise la formation de récepteurs homomériques, permettant ainsi d'étudier les propriétés fonctionnelles de chaque sous-unité (Shi et al., 2001). Dans cette étude, les auteurs ont pu montrer que l'expression de la sous-unité GluA2 dans des cultures organotypiques d'hippocampe induit une insertion des récepteurs recombinants dans les synapses. Cette insertion se traduit par une diminution de la rectification de la courbe courant/voltage des courants mesurés, spécifique de la sous-unité GluA2 (Shi et al., 2001). Au contraire, la sous-unité GluA1 n'est pas adressée aux synapses dans les conditions basales, mais nécessite la co-expression de CAMKII pour être insérée dans les synapses et induire une augmentation de la transmission AMPA (Shi et al., 2001). Ces expériences ont permis de démontrer que les sous-unités GluA1 et GluA2 ont des modes de trafic différents. En effet, la sous-unité GluA2 est insérée de manière constitutive aux synapses, alors que l'insertion de GluA1 dépend de l'activité synaptique. Ces résultats

ont été ensuite confirmés par des études du recyclage des sous-unités GluA1 et GluA2 recombinantes étiquetées avec des protéines fluorescentes observées sur cellules vivantes, ou étiquetées avec des épitopes et étudiées après immuno-marquage (Passafaro et al., 2001; Lin et al., 2009). Ces expériences ont montré que l'insertion de GluA1 dans la membrane plasmique est stimulée par l'activité synaptique (Passafaro et al., 2001; Lin et al., 2009). Cependant, ces deux études présentent des observations différentes quant à l'insertion de la sous-unité GluA2. En effet, l'utilisation de la sous-unité GluA2 étiquetée avec un épitope HA clivable par la thrombine, montre une insertion constitutive et rapide de GluA2 à la membrane (Passafaro et al., 2001). Au contraire, aucune insertion à la membrane n'a été observée pour la sous-unité GluA2 fusionnée à la pHluorin dans les conditions basales (Lin et al., 2009). Les différences entre ces deux études peuvent être dues à des différences dans les modèles utilisés, entre immuno-marquage et observation de la fluorescence sur cellules vivantes. Cependant, la co-expression des sous-unités GluA1 et GluA2 recombinantes, présente en électrophysiologie comme avec les expériences d'imagerie sur cellules vivantes, les caractéristiques d'insertion à la membrane de GluA1, indiquant que GluA1 dicte les propriétés d'insertion des rAMPA (Shi et al., 2001; Lin et al., 2009). D'autre part, ces études ont aussi démontré que la régulation différentielle du trafic de GluA1 et GluA2 est dictée par leur queue intracellulaire C-terminale respective.

B. Les protéines d'échafaudage impliquées dans la rétention synaptique des rAMPA

La rétention synaptique des rAMPA se fait majoritairement par leurs interactions avec les protéines d'échafaudage à domaine PDZ (PSD-95/disc-large/zona) contenues dans la PSD (Figure 3). Les domaines PDZ sont des domaines de modulation des interactions protéiques qui lient l'extrémité C-terminale d'autres protéines. Leur spécificité d'interaction définit les domaines PDZ de type I, II ou III. Ils sont le plus souvent exprimés en tandem, ce qui permet, en liant différents peptides sur une même protéine, de créer des complexes macromoléculaires. Dans les synapses, de nombreuses protéines à domaine PDZ sont impliquées dans l'organisation et la structure des compartiments synaptiques (pour revue, voir (Kim and Sheng, 2004)). Les sous-unités des rAMPA possèdent un site de liaison aux domaines PDZ à la fin de leur domaine intracellulaire C-terminal et peuvent ainsi lier directement ou indirectement via leurs sous-unité auxiliaires, les TARPs (Transmembrane AMPAR Regulatory Proteins) (Tomita, 2010), les protéines d'échafaudage. Les protéines à domaines PDZ les plus abondantes dans la PSD, sont les MAGUKs (Membrane Associated GUanylate Kinases) de la famille de PSD-95 (PSD-95, PSD-93, SAP-102, SAP-97) (Kim and

Sheng, 2004; Elias and Nicoll, 2007). Les membres de cette famille contiennent trois domaines PDZ, un domaine SH3 (src homology 3) et un domaine guanylate kinase inactif (GUK) (Montgomery et al., 2004).

Des études de gain de fonction des MAGUKs de la famille PSD-95, ont permis de mettre en évidence leur rôle dans l'adressage et la stabilisation des rAMPA aux synapses. En effet, la surexpression de PSD-95, PSD-93 ou SAP-102 dans des neurones en culture induit une augmentation de l'amplitude des courants AMPA évoqués et miniatures (El-Husseini et al., 2000; Schnell et al., 2002; Elias et al., 2006). L'expression de PSD-95 se traduit alors par une augmentation du nombre de rAMPA de surface localisés au niveau des synapses (El-Husseini et al., 2000). De la même manière, dans un modèle de culture de tranches organotypiques d'hippocampe, l'expression de PSD-95 induit une potentialisation de l'amplitude des réponses AMPA, due à une incorporation de rAMPA aux synapses (Stein et al., 2003; Ehrlich and Malinow, 2004). Au contraire, l'utilisation de shRNA (small hairpin RNA) dirigé contre l'expression de PSD-95, induit une diminution de 50% de l'amplitude des réponses AMPA, accompagnée par une diminution de 50% du contenu synaptique en rAMPA (Elias et al., 2006). Les rAMPA lient PSD-95 via la stargazine (ou les TARPs en général) (Schnell et al., 2002). La surexpression de stargazine induit une augmentation de l'adressage des rAMPA à la surface des dendrites (Schnell et al., 2002). Cependant l'adressage des rAMPA aux synapses ainsi que leur piégeage au niveau des agrégats de PSD-95 nécessite la séquence de liaison aux domaines PDZ de la stargazine (Schnell et al., 2002; Bats et al., 2007).

SAP-97 est la seule MAGUK de la famille de PSD-95 qui lie de manière directe les rAMPA. En effet, la sous-unité GluA1 interagit de manière spécifique avec le second domaine PDZ de SAP-97 (Leonard et al., 1998; Cai et al., 2002). Les effets de la surexpression de SAP-97 sur la transmission AMPA ne sont pas aussi clairs que pour les autres membres de la famille de PSD-95. En effet, il semble que la capacité de SAP-97 à potentialiser la transmission AMPA dépende de l'abondance des autres MAGUKs à la PSD (Schluter et al., 2006), des différents isoformes exprimés (Rumbaugh et al., 2003; Regalado et al., 2006), ou d'une combinaison de ces facteurs. Cependant, SAP-97 participe à l'incorporation de GluA1 à la synapse (Rumbaugh et al., 2003; Nakagawa et al., 2004). Il a été proposé qu'après l'insertion dans la membrane plasmique SAP-97 soit dissociée du récepteur (Sans et al., 2001). Ainsi PSD-95 comme SAP-97 jouent toutes deux un rôle important dans l'adressage des rAMPA aux synapses, mais PSD-95 est aussi impliquée dans la rétention et la stabilisation des rAMPA dans la synapse.

Enfin, l'extrémité C-terminale des sous-unités GluA2 et GluA3 des rAMPA contient un motif de liaison aux domaines PDZ de classe II. Elles peuvent donc aussi interagir avec les protéines à domaine PDZ: GRIP (Glutamate Receptor-Interacting Protein) et PICK1 (Protein

Interacting with C-Kinase) (Dong et al., 1997; Dev et al., 1999). L'interaction des rAMPA avec PICK1 ou GRIP régule leur adressage à la membrane ainsi que leur ancrage et leur maintien à la synapse (Dong et al., 1997; Osten et al., 2000; Hanley, 2008).

II. La synaptogenèse dans le SNC

A. Les étapes de la synaptogenèse

La synaptogenèse est un évènement complexe car bien qu'il soit continu dans le temps, il peut se diviser en plusieurs étapes critiques (Figure 4).

Tout d'abord, il y a un contact initial au cours duquel l'une des extensions neuronales (axone ou dendrite), reconnaît l'autre comme une cible potentielle et appropriée. Ce contact initial est notamment induit et stabilisé par des molécules d'adhérence de la famille des cadhérines (Figure 4a). Par la suite, les complexes Nrx/Nlg, éphrines/rEph ou encore SynCAM permettent l'étape d'induction (Figure 4b) puis la différenciation pré- et post-synaptique (Figure 4c), c'est-à-dire l'accumulation des éléments essentiels à la fonction synaptique. Au cours de cette étape, on observe ainsi la formation des zones actives pré-synaptiques et des densités post-synaptiques. Enfin, la dernière phase, la plus longue consiste en la maturation structurale et fonctionnelle de la synapse néoformée (Figure 4d). Les synapses sont des structures dynamiques, dont le contenu pré- et post-synaptique est échangé, modifié en permanence. Cette dynamique permet leur maintien sur de longues périodes (Figure 4e).

Le contact initial entre deux cellules peut avoir lieu au niveau axo-dendritique, axo-somatique, ou axo-axonal. Certains neurones du système nerveux forment des connexions avec des partenaires spatialement très éloignés. Ceci implique que les axones doivent progresser et s'étendre dans les tissus pour pouvoir ensuite contacter leurs cibles. L'exploration de l'environnement est menée par le cône de croissance. Cette recherche ne se fait pas de manière aléatoire, en effet, les cônes de croissance expriment des récepteurs capables de reconnaître toute une variété de facteurs de guidage. Ces molécules de guidage peuvent être diffusibles, i.e. sécrétées par les cellules cibles, ou exprimées à la surface de cibles intermédiaires. Elles peuvent être attractives comme répulsives. Leur présence ainsi que l'expression de leurs récepteurs dans une fenêtre spatiale et temporelle très précise, permet aux axones de naviguer au sein du système nerveux en développement afin d'atteindre leurs cibles spécifiques (pour revue, voir (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Sanes and Yamagata, 2009)).

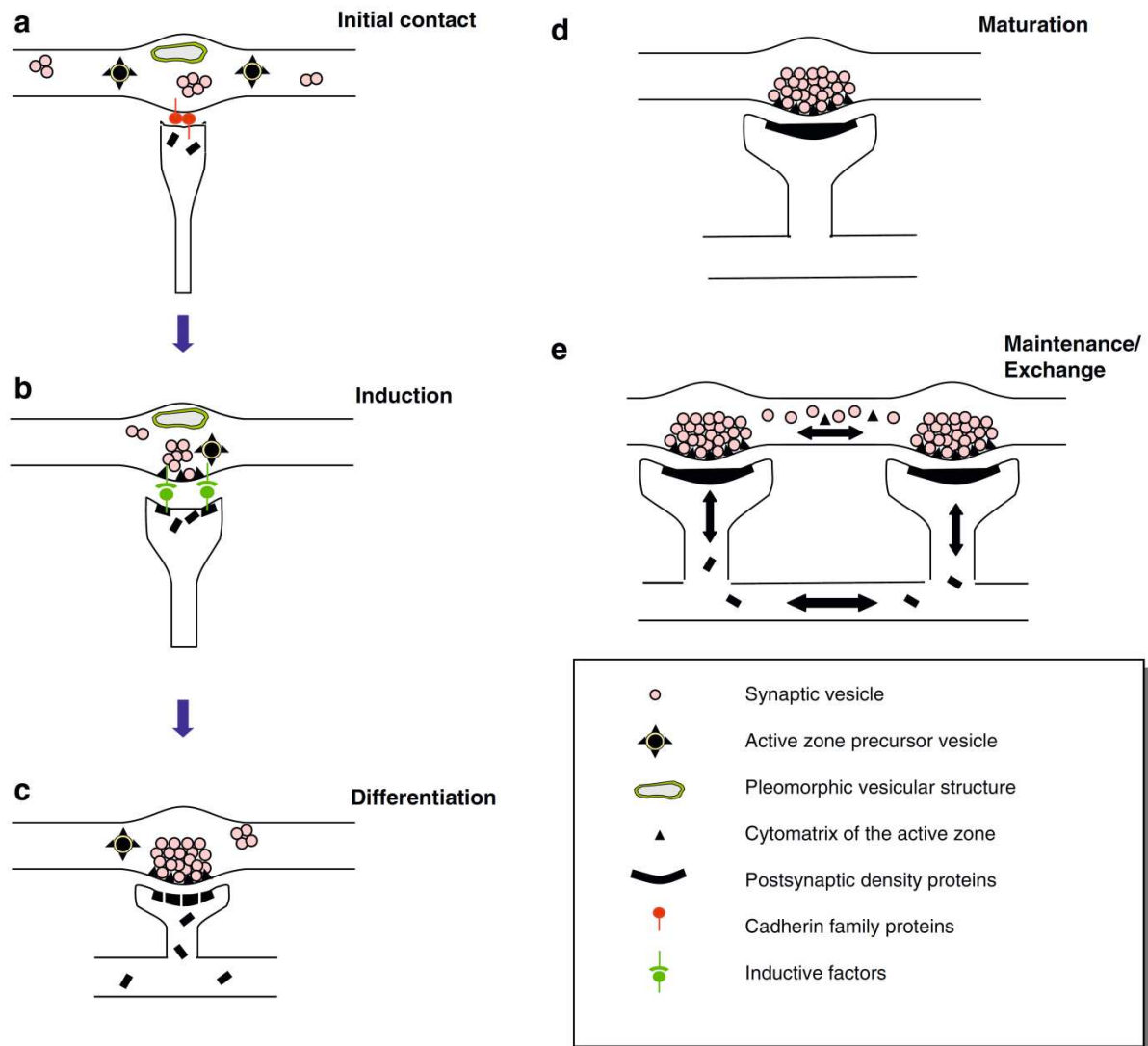


Figure 4 : Schéma représentant les différentes étapes de la synaptogenèse dans le SNC. D'après (Garner et al., 2006).

La formation d'un contact entre deux neurones peut aussi être initiée par des structures dendritiques motiles comme le cône de croissance dendritique ou les filopodes dendritiques. En effet, *in vitro* comme *in vivo*, il a été montré que les filopodes présentent une dynamique et une motilité permettant une exploration locale de leur environnement. Ce comportement est ainsi impliqué dans l'initiation de la formation de contacts avec les axones voisins (Ziv and Smith, 1996; Dunaevsky et al., 1999). Les filopodes ont une durée de vie très courte, de l'ordre de 10 minutes (Ziv and Smith, 1996), ce qui implique que l'établissement du contact adhésif est limité dans le temps et donc que la décision d'initier la formation d'une synapse doit être rapide.

L'expression de molécules d'adhérence trans-synaptiques au niveau des axones et des neurites entrant en contact permet la stabilisation de ces interactions et l'initiation des phénomènes de différenciation et de maturation synaptique essentiels à la mise en place de

synapses fonctionnelles. La formation des boutons pré-synaptiques, consiste en l'agrégation des SV et en la formation des zones actives (un réseau d'éléments du cytosquelette sur lequel les vésicules synaptiques s'amarrent et fusionnent), mais aussi en l'assemblage de la machinerie d'endo/exocytose à proximité des zones actives (Garner et al., 2000a; Dresbach et al., 2001). D'autre part, la différenciation post-synaptique induit la formation de la PSD, qui permet d'agréger et de localiser les récepteurs aux neurotransmetteurs ainsi que d'autres protéines au niveau de la membrane post-synaptique (Sheng and Pak, 1999; Bolton et al., 2000; Garner et al., 2000b; Scannevin and Huganir, 2000).

Après la formation des contacts et la différenciation des compartiments pré- et post-synaptiques, une phase plus longue de maturation et de stabilisation a lieu (Figure 5d). Cette transition implique des modifications structurales et fonctionnelles. Au niveau morphologique par exemple, on observe une augmentation du nombre de SV, ainsi que l'apparition de densités synaptiques plus prononcées. Les structures post-synaptiques changent de morphologie et évoluent du filopode dendritique ou de l'axe dendritique vers l'épine de type « champignon ». Ce changement de structure puis sa stabilisation reposent sur des régulations des dynamiques de polymérisation/dépolymérisation de l'actine (pour revue voir (Ethell and Pasquale, 2005; Tada and Sheng, 2006)).

En parallèle de ces changements structuraux, la maturation synaptique s'effectue aussi au niveau fonctionnel. Dans l'hippocampe, au niveau pré-synaptique, il a été observé des changements dans la quantité de SV ainsi que dans la probabilité de libération de ces vésicules (Chavis and Westbrook, 2001). Ces changements s'accompagnent de modifications dans le contenu en récepteurs aux neurotransmetteurs dans la membrane post-synaptique. En effet au niveau des synapses excitatrices immatures, les rNMDA contiennent la sous-unité GluN2B, alors que dans les synapses matures, la sous-unité GluN2B est remplacée par la sous-unité GluN2A (van Zundert et al., 2004; Petralia et al., 2005). Ce changement de sous-unité modifie les cinétiques de la transmission synaptique NMDA. Au niveau des synapses GABAergiques, cette maturation fonctionnelle existe aussi. En effet, tôt dans le développement, le GABA est un neurotransmetteur excitateur. Du fait d'une forte concentration intracellulaire en ions Chlore (Cl^-), l'activation des récepteurs post-synaptiques par le GABA induit une sortie d'ions Cl^- et donc une dépolarisation du neurone. Au cours de la maturation, l'expression du co-transporteur K^+/Cl^- (KCC2), permet de réduire la concentration intracellulaire en Cl^- . Ainsi l'activation des récepteurs du GABA, induit une entrée de Cl^- et donc une hyperpolarisation du neurone post-synaptique (Ben-Ari, 2002).

Cette phase de maturation permet ainsi aux synapses d'acquérir leurs propriétés de transmission. Cependant, bien que l'on parle de maturation et de stabilisation, la structure synaptique n'est jamais figée, mais est en constant remaniement afin d'adapter les propriétés de transmission au milieu et aux événements. Ces changements fonctionnels et

structuraux qui ont lieu après la synaptogenèse font partie des phénomènes de plasticité synaptique.

B. Modèles d'étude de la synaptogenèse

Afin d'observer la mise en place des réseaux neuronaux *in vivo*, de nombreuses études utilisent des modèles où le développement embryonnaire est visible et où les cellules sont accessibles par des techniques d'imagerie confocale, ou à 2-photons, tels que les têtards de xénope, ou les embryons de poulet (Sato and Momose-Sato, 2008; Chen et al., 2010). Sur les mammifères, les techniques d'imagerie ne permettent pas encore de suivre le développement des synapses sur l'animal éveillé. Une alternative consiste à utiliser des cultures de tranches organotypiques, observées par microscopie confocale au cours du temps (Mendez et al., 2010). Ces études permettent de mettre en évidence des phénomènes fidèles à ceux observés *in vivo*, mais présentent des difficultés techniques qui empêchent de disséquer les cinétiques fines, ou les mécanismes moléculaires impliqués dans la synaptogenèse.

Pour étudier la chronologie de la formation des contacts, bien que moins fidèle, le modèle le plus simple est celui de la culture de neurones dissociés. En effet, il permet d'observer à la fois la formation des neurites, la création de contacts entre dendrites et axones, la localisation des protéines synaptiques et enfin d'étudier l'apparition de contacts fonctionnels. Même si dans ce modèle, le décours précis de la synaptogenèse peut changer en fonction de la densité de la culture, la séquence d'évènements conduisant à la formation des contacts a été identifiée. Les cellules dissociées, une fois étalées sur leur substrat de culture, vont en 2-3 jours, émettre des prolongements qui vont se différencier en axones ou en dendrites. Après 5-6 jours en culture, les neurites de différentes cellules commencent à entrer en contact (Dotti et al., 1988). A cet âge, des expériences d'immuno-marquage ont montré l'existence de structures pré-synaptiques, ainsi que d'agrégats de rNMDA non apposés à ces pré-synapses. C'est à partir de 9 jours de culture que des rAMPA apparaissent localisés au niveau des synapses et à partir de 12 jours, les rNMDA sont eux aussi localisés en face des structures pré-synaptiques (Rao et al., 1998). Ainsi, bien que ces mesures dépendent de la densité de neurones en culture, Il semble que l'apparition de synapses fonctionnelles se fasse à partir de la deuxième semaine *in vitro*.

Le développement des techniques dynamiques d'imagerie sur cellules vivantes, ainsi que des outils de biologie moléculaire permettant d'étiqueter des protéines d'intérêt avec des molécules fluorescentes, ont permis d'observer la mise en place de synapses individuelles. Par exemple, le groupe de N. Ziv a exprimé une construction de PSD-95 fusionnée à la GFP

(Green Fluorescent Protein) dans des neurones en culture, puis a observé en vidéo-microscopie, le recrutement de PSD-95:GFP lors de la formation de nouveaux contacts synaptiques. Dans ce modèle, PSD-95 peut être recrutée aux synapses naissantes en une heure (Bresler et al., 2001). Le même type d'expérience a été réalisé pour observer le recrutement des composants pré-synaptiques, en utilisant une construction VAMP:GFP (Vesicular Associated Membrane Protein, protéine pré-synaptique participant à l'amarrage et à la fusion des vésicules de neurotransmetteur avec la membrane plasmique). Lors de la formation d'un contact entre neurite et axone, des agrégats de VAMP:GFP situés en périphérie sont rapidement (30 min à 2 heures) recrutés aux contacts néoformés (Ahmari et al., 2000). Enfin, il semble qu'il y ait une séquence d'apparition des différents composants synaptiques. Une étude réalisant des immuno-marquages rétrospectifs de différents composants synaptiques après avoir observé la formation de contacts synaptiques a pu établir la chronologie de recrutement des éléments synaptiques (Friedman et al., 2000). Ainsi, il semble que les composants pré-synaptiques soient recrutés légèrement plus tôt (<60 min) que les composants post-synaptiques (75-120 min) (Friedman et al., 2000).

Ainsi, le recrutement des composants pré-et post-synaptiques aux contacts naissants semble être un phénomène assez rapide, qui peut se dérouler en quelques heures au niveau de la synapse individuelle. La formation d'un réseau complexe ainsi que sa maturation doivent être des étapes bien plus longues, expliquant les différences de cinétiques observées selon les études.

C. Mécanismes de transport des composants synaptiques

1. Transport des composants pré-synaptiques

Le transport des composants pré-synaptiques se fait essentiellement par transport de vésicules contenant des complexes macromoléculaires (Figure 5). Deux types de précurseurs sont présents : Les PTVs (piccolo transport vesicles) et les STVs (SV protein transport vesicles) (Figure 5a). Les PTVs sont des vésicules denses aux électrons qui sont capables de se déplacer de manière rapide dans les axones des neurones jeunes. Ces vésicules, contiennent de nombreux éléments des zones actives, tels que piccolo et bassoon, ou des protéines impliquées dans l'exocytose des vésicules de neurotransmetteur (syntaxine, snap-25, Munc-18) (Zhai et al., 2001; Shapira et al., 2003). Les STVs se distinguent des PTVs par leur morphologie et leur structure biochimique (Zhai et al., 2001). Les STVs sont aussi très mobiles dans les axones en développement et sont stabilisées au niveau des contacts entre axones et dendrites (Ahmari et al., 2000). Dans les axones

immatures, des sites primitifs d'accumulation des SV et de leur machinerie de recyclage peuvent se former de manière spontanée (Figure 5b), pour poursuivre leur maturation après l'établissement d'un contact axo-dendritique. La formation d'un contact axone/dendrite induit le recrutement des PTVs et leur fusion avec la membrane plasmique, ainsi que l'agrégation des STVs au niveau de la future zone active (Figure 5c). Au cours de la maturation, la machinerie d'endo/exocytose des SV devient fonctionnelle et l'accumulation des SV permet de former une réserve importante de neurotransmetteur (Figure 5e).

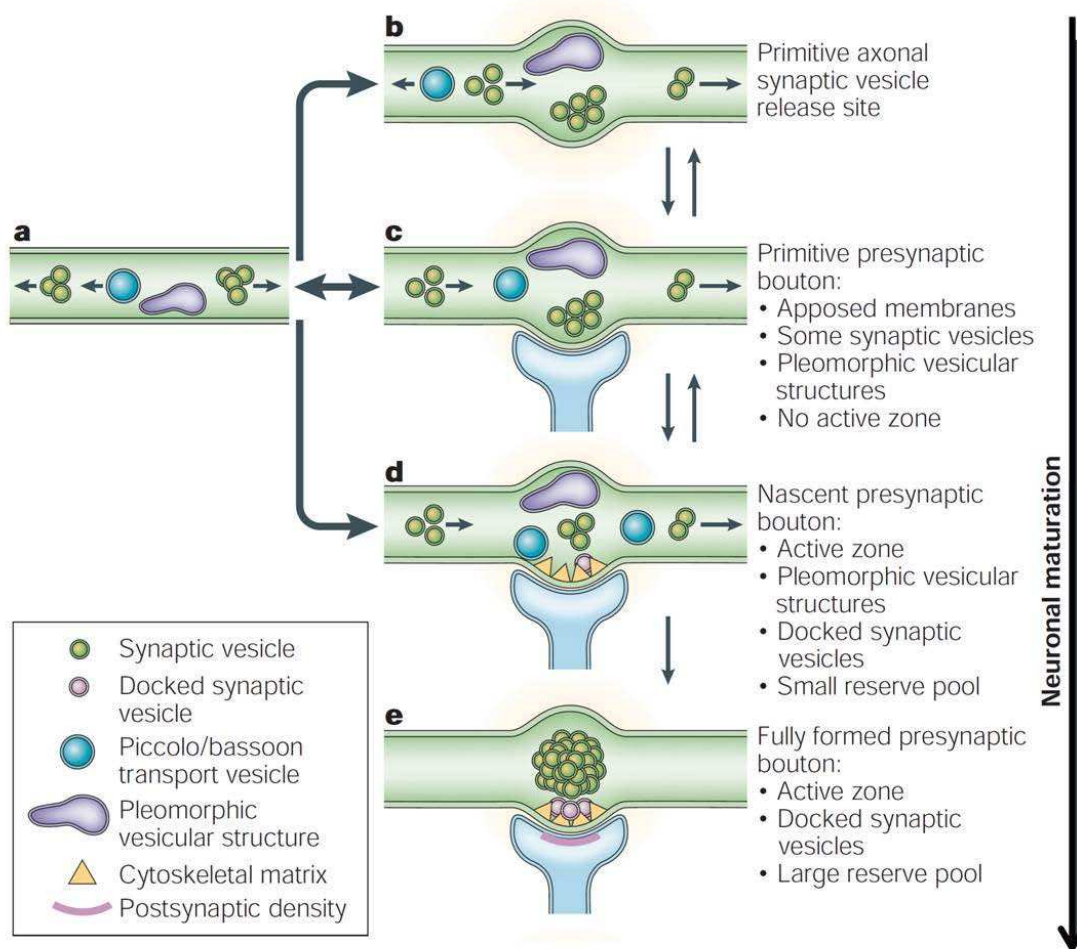


Figure 5 : Schéma représentant le modèle de transport des composants pré-synaptiques. D'après (Ziv and Garner, 2004)

2. Transport des composants post-synaptiques

Les mécanismes de transport des composants post-synaptiques sont à l'heure actuelle moins bien identifiés que ceux des composants pré-synaptiques. En effet, des résultats expérimentaux tendent à montrer que les protéines post-synaptiques sont recrutées aux synapses naissantes de manière séquentielle et à partir d'une population diffuse, alors

que d'autres études montrent un recrutement par vésicules de transport similaire à celui observé en pré-synapse.

De nombreuses études sur des neurones en culture se sont intéressées à la mise en place des synapses glutamatergiques, c'est-à-dire au recrutement de PSD-95 (protéine d'échafaudage majeure) et des récepteurs du glutamate (AMPA, NMDA). Les dynamiques d'assemblage des synapses ont notamment été étudiées sur cellules vivantes en suivant PSD-95:GFP. Lors de la formation d'un contact axone/dendrite, il a été observé que l'accumulation de PSD-95:GFP au niveau de ce contact se fait à partir d'un pool diffus de PSD-95, en 30 minutes à 1 heure (Bresler et al., 2001). De même, il a été montré qu'avant la formation des synapses, les récepteurs AMPA sont distribués de manière diffuse à la surface des neurones, puis lors de la synaptogenèse, ces mêmes récepteurs sont déplacés vers les synapses naissantes (Mammen et al., 1997). Enfin, une étude qui s'est intéressée aux cinétiques d'accumulation des différents composants post-synaptiques aux synapses néoformées, montre qu'il y a un recrutement séquentiel de PSD-95, puis des récepteurs du glutamate de type AMPA et NMDA (Friedman et al., 2000).

Cependant, toujours dans des modèles de cultures de neurones jeunes, des structures semblables à des vésicules de transport ont pu être observées. En effet, à 7 jours *in vitro*, seulement 50% des agrégats de PSD-95 sont synaptiques (apposés à une pré-synapse) (Gerrow et al., 2006). Ces agrégats contiennent en plus de PSD-95 d'autres molécules de la PSD, tels que Shank, ou GKAP et sont mobiles dans les neurites. Il a notamment été montré que ces agrégats sont capables d'être recrutés au niveau de contacts synaptiques néoformés (Gerrow et al., 2006). D'autre part, il existe des agrégats de récepteurs NMDA ou AMPA bien avant la formation des synapses. Dans le cas des récepteurs NMDA, les agrégats se déplacent dans les dendrites via les microtubules et sont ainsi recrutés aux synapses naissantes (Washbourne et al., 2002; Barrow et al., 2009).

L'ensemble de ces études ne permet donc pas d'établir un schéma précis des mécanismes de recrutement des composants post-synaptiques aux synapses naissantes. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les différences observées. Tout d'abord, sur les modèles en culture peu matures, il se peut que la densité de cellules ne permettent pas la formation de suffisamment de contacts et biaise ainsi la distribution des différents partenaires. De même, le fait d'utiliser la surexpression de protéines recombinantes peut aussi déplacer les équilibres d'interaction protéine/protéine en entrant en compétition avec les protéines endogènes.

D. Rôle de l'activité synaptique dans la synaptogenèse: cas des synapses glutamatergiques

Un évènement clé de la synaptogenèse est l'insertion de récepteurs du glutamate fonctionnels dans la membrane post-synaptique en face des sites de libération pré-synaptiques. De nombreuses études d'immuno-marquages sur des neurones en culture, se sont intéressées à la mise en place des rAMPA et des rNMDA au cours du développement, afin de savoir si les deux types de récepteurs sont recrutés en même temps ou de manière séquentielle. Certaines de ces études ont mis en évidence l'existence de synapses immatures ne contenant pas de rAMPA, appelées synapses silencieuses (Gomperts et al., 1998; Petralia et al., 1999; Pickard et al., 2000). Il a été proposé que ces synapses ne deviendraient matures qu'après l'acquisition de rAMPA post-synaptiques induite par l'activation coordonnée des éléments pré- et post-synaptiques. Cependant, des études électrophysiologiques montrent que toutes les synapses contiennent des rAMPA. En effet, en culture, toutes les synapses présentent des courants de type AMPA induits par iontophorèse de glutamate (Cottrell et al., 2000). De plus, il a été montré que dans l'hippocampe, les synapses immatures contiennent des rAMPA et des rNMDA (Groc et al., 2002), mais que les réponses AMPA sont très labiles et peuvent être abolies ou renforcées selon le type de stimulation appliqué (Groc et al., 2006). Les expériences d'immuno-marquages permettent de regarder une population de synapses à un temps donné, sans savoir quel était leur contenu préalable en rAMPA, ce qui explique peut être les différences observées entre les expériences de marquage et d'électrophysiologie. De manière intéressante, au cours de la synaptogenèse, les rAMPA sont plus mobiles dans la membrane plasmique que les rNMDA et seule la diffusion des rAMPA est affectée par des changements d'activité synaptique (Groc et al., 2004). Ces expériences indiquent que lors du développement, les rAMPA sont moins stables que les rNMDA dans la membrane plasmique, expliquant ainsi le fait que selon l'activité synaptique, les rAMPA puissent quitter les synapses. Donc l'activité synaptique semble un élément important pour stabiliser les rAMPA au niveau des synapses immatures et induire les phénomènes de maturation, mais est-ce un évènement essentiel au recrutement des récepteurs du glutamate ?

Tout d'abord, dans des neurones de souris invalidées pour les gènes de Munc-13 ou Munc-18, présentant une perte partielle ou complète de libération de neurotransmetteur, il se forme autant de synapses que dans des neurones sauvages et ces synapses sont identiques d'un point de vue morphologique et fonctionnel (Augustin et al., 1999; Verhage et al., 2000). De plus, il a été observé que le fait de bloquer la libération de glutamate évoquée par les potentiels d'action, avec de la TTX (Tétradotoxine), ou le fait de bloquer les rNMDA

avec un antagoniste spécifique (APV), n'empêche pas l'accumulation de rAMPA comme de rNMDA aux synapses naissantes (Craig et al., 1994; Friedman et al., 2000). Ainsi, le recrutement des composants post-synaptiques et plus précisément des récepteurs du glutamate aux synapses naissantes, semble être indépendant de l'activité synaptique.

E. Modèles d'étude appliqués au rôle des protéines d'adhérence dans la synaptogenèse

1. Etudes de perte ou de gain de fonction

Afin d'étudier le rôle des protéines d'adhérence dans la synaptogenèse, de nombreuses études ont utilisé les techniques de gain ou de perte de fonction, en mesurant la densité de synapses comme critère quantitatif. Tout d'abord, la surexpression de protéines d'intérêt dans des neurones en culture, a permis d'identifier le rôle de nombreux complexes adhésifs dans la synaptogenèse. L'utilisation de siRNA ou de shRNA, permet d'induire des délétions aigues de l'expression d'une protéine cible, dans des neurones en culture, mais aussi *in vivo*, en utilisant l'infection virale (Chih et al., 2005; Kayser et al., 2006; Saglietti et al., 2007; Kayser et al., 2008; de Wit et al., 2009). L'utilisation de siRNA comme outils de criblage a notamment permis d'identifier des molécules d'adhérence nécessaires à la formation des synapses dans des neurones en culture (Paradis et al., 2007). Enfin, pour étudier les fonctions physiologiques des protéines impliquées dans la synaptogenèse *in vivo*, des animaux invalidés pour les gènes candidats ont été générés (Knock out, KO) (Missler et al., 2003; Kayser et al., 2006; Varoqueaux et al., 2006; Kayser et al., 2008; Linhoff et al., 2009).

2. Le modèle de co-culture et le concept d'hémi synapse

Les molécules d'adhérence impliquées dans la différenciation des compartiments pré- et post-synaptiques sont caractérisées par leur fonction synaptogène, i.e., lorsque leur expression est suffisante pour induire une différenciation des éléments pré- ou post-synaptiques.

Afin d'étudier le rôle synaptogène de molécules candidates, le modèle le plus décrit dans la littérature est celui de la co-culture. Il consiste à faire exprimer la molécule d'intérêt à des cellules hétérologues (COS-7, HEK 293) et à mettre ces cellules en culture avec des neurones dissociés. On observe ensuite l'accumulation de marqueurs spécifiques des pré-

synapses ou des post-synapses au niveau des contacts entre les cellules hétérologues et les neurones (Figure 6).

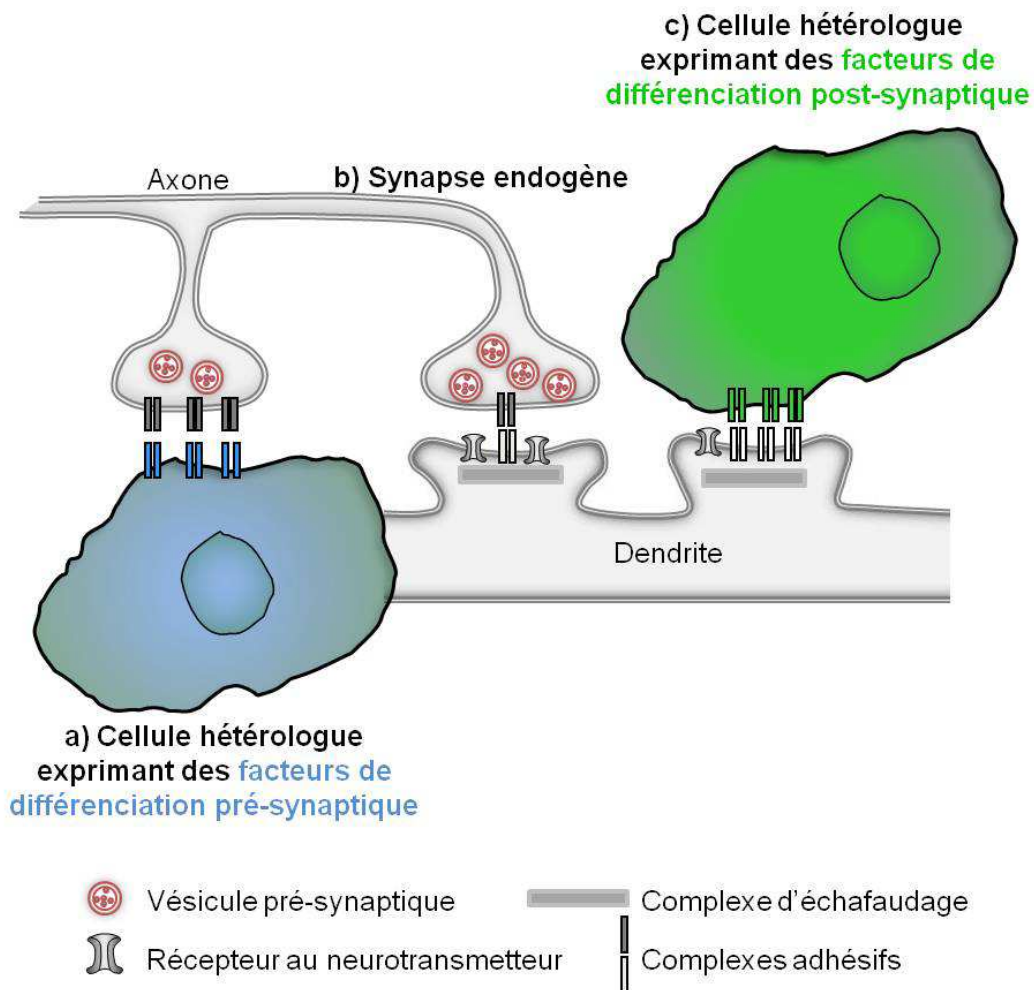


Figure 6 : Modèle d'étude de la différenciation synaptique. Des cellules hétérologues exprimant soit des facteurs de différenciation pré-synaptique (en bleu, **a**), soit des facteurs de différenciation post-synaptique (en vert, **c**), sont cultivées avec des neurones dissociés. Aux contacts entre ces cellules on observe la mise en place d'éléments post-synaptiques et pré-synaptiques (respectivement). Contrairement à une synapse endogène (**b**) ces contacts forment des héli synapses.

Avec ce modèle, les cellules hétérologues n'expriment qu'une seule protéine neuronale, ce qui permet d'avoir une vue simplifiée par rapport aux réelles interactions mises en place au niveau d'une synapse. D'autre part, le fait d'étudier les interactions entre deux types cellulaires différents permet d'identifier facilement les contacts néoformés par la protéine d'intérêt (Biederer and Scheiffele, 2007). Enfin, ces modèles ont introduit le concept d'héli synapse, i.e. le fait de pouvoir former une post-synapse fonctionnelle indépendamment de la présence d'une pré-synapse fonctionnelle et vice versa. En effet, entre une cellule hétérologue exprimant par exemple des facteurs de différenciation pré-

synaptique et un axone (Figure 6a), il a été observé le recrutement des composants pré-synaptiques essentiels à la fonction synaptique (protéines d'échafaudage, composants des SV, machinerie de recyclage des vésicules) (Scheiffele et al., 2000; Biederer et al., 2002; Sara et al., 2005; Kayser et al., 2006; Fogel et al., 2007). Contrairement à une synapse endogène (Figure 6b), ce contact ne présente pas de post-synapse fonctionnelle capable de répondre à la libération de neurotransmetteur afin de transmettre une information. Cependant, il a été observé que ces pré-synapses formées sont fonctionnelles et capables de libérer du glutamate et d'activer des rAMPA recombinants exprimés eux aussi dans les cellules hétérologues (Fu et al., 2003; Sara et al., 2005). Ce modèle de co-culture permet ainsi d'identifier de manière rapide et aisée le caractère synaptogène d'une molécule. Récemment, en utilisant le modèle de co-culture entre cellules hétérologues et neurones comme test fonctionnel, le groupe d'A. M. Craig a évalué la capacité synaptogène de centaines de protéines transmembranaires, afin d'identifier de nouveaux candidats (Linhoff et al., 2009).

3. Microsphères recouvertes de protéines d'adhérence

D'autres modèles se sont inspirés de celui de la co-culture pour étudier plus en détail la synaptogenèse. Notamment, les cellules hétérologues peuvent être remplacées par des billes de latex ou de silicate recouvertes de la protéine d'intérêt (Figure 7). Dans ces modèles, les billes peuvent être recouvertes de lipides, permettant de fixer des protéines recombinantes purifiées fusionnées à une ancre GPI (glycosyl-phosphatidylinositol) (Dean et al., 2003) (Figure 7a), ou fonctionnalisées avec des anticorps secondaires permettant de fixer des protéines recombinantes purifiées fusionnées au fragment constant (Fc) des Immunoglobulines (Graf et al., 2004; Breillat et al., 2007; Saglietti et al., 2007; Heine et al., 2008a) (Figure 7c). Les billes peuvent aussi être couplées à des anticorps dirigés contre un épitope extracellulaire de la protéine d'intérêt, ce qui permet d'étudier les effets de l'agrégation indépendamment de la liaison du ligand endogène (Dean et al., 2003; Graf et al., 2004). Ce modèle a l'avantage de pouvoir contrôler le moment de la formation des contacts et ainsi d'étudier de manière plus précise les cinétiques de recrutement et de mise en place des composants synaptiques.

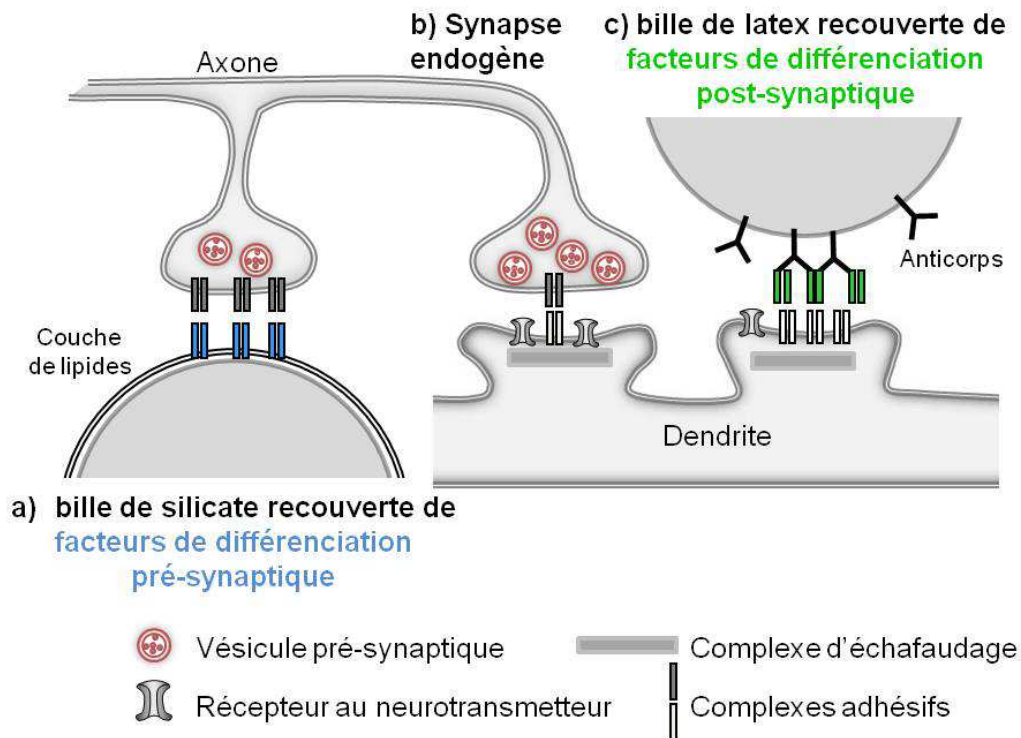


Figure 7 : Modèle d'étude de la différenciation synaptique. Des neurones en culture sont mis en contact avec des billes recouvertes de facteurs de différenciation purifiés. (a) Un facteur de différenciation pré-synaptique est fixé sur les billes via une ancre GPI. (c) Un facteur de différenciation post-synaptique est fixé sur les billes via des anticorps. Contrairement à une synapse endogène (b) ces contacts forment des hémisynapses.

III. Molécules d'adhérence : de la structure à la fonction dans la synaptogenèse

A. SynCAMs

1. Structure, partenaires protéiques et expression

Il existe 4 protéines de la famille des SynCAMs (SynCAM1-4). Ce sont des protéines contenant un domaine extracellulaire N-terminal, un domaine transmembranaire simple et une queue intracellulaire C-terminale (protéine transmembranaire de type I). Les SynCAMs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig). La séquence extracellulaire est composée de 3 domaines Ig permettant la formation d'interactions homophiles (Figure 8), mais aussi hétérophiles (SynCAM1/2, SynCAM3/4) (Fogel et al., 2007; Thomas et al., 2008).

Au niveau pré-synaptique, des expériences de biochimie ont montré que SynCAM interagit avec CASK (Calcium/calmodulin-dependent Serine protein Kinase) (Figure 8) (Biederer et al., 2002). CASK est une protéine pré-synaptique de la famille des MAGUKs qui contient un domaine homologue à CAMKII (Calcium/calModulin-dependent protein Kinase II) lui conférant une activité de phosphorylation. Il a été montré que CASK participe à la libération des vésicules de neurotransmetteur pré-synaptiques (Atasoy et al., 2007). De plus, au niveau synaptique, CASK est associée aux canaux calciques de type N et P/Q et il a été montré que cette interaction est essentielle au trafic et à la localisation de ces canaux au niveau des zones actives (Maximov et al., 1999; Maximov and Bezprozvanny, 2002). La co-expression de SynCAM avec CASK dans des cellules hétérologues permet d'induire le recrutement de CASK à la membrane plasmique (Biederer et al., 2002). Enfin, SynCAM interagit avec différents membres de la famille des protéines 4.1 (Figure 8) par une séquence de liaison aux domaines FERM, située dans la queue intracellulaire, sous la membrane plasmique (Hoy et al., 2009).

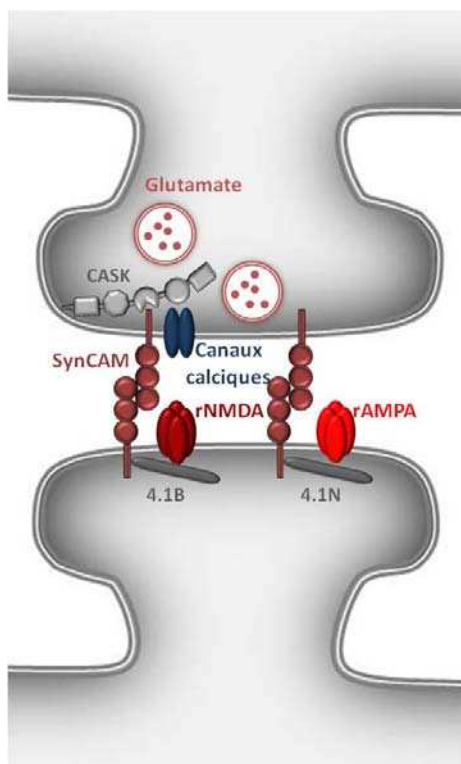


Figure 8 : Schéma représentant les partenaires protéiques des complexes SynCAMs. Au niveau pré-synaptique, SynCAM interagit avec CASK et participe à la formation de pré-synapses fonctionnelles. Au niveau post-synaptique SynCAM interagit avec la famille des protéines 4.1. Cette interaction pourrait participer au recrutement des rNMDA et des rAMPA.

SynCAM1 est exprimée préférentiellement dans le cerveau, mais aussi dans d'autres tissus. Au contraire, l'expression de SynCAM2-4 n'est détectée que dans le tissu nerveux, impliquant des fonctions spécifiques de ces molécules dans le cerveau (Fogel et al., 2007). De plus, les SynCAMs sont exprimées très tôt lors du développement et sont préférentiellement exprimées dans les neurones. (Fogel et al., 2007; Thomas et al., 2008).

Enfin, *in vitro*, ces protéines sont localisées au niveau synaptique et il a été montré qu'elles se situent *in vivo* à la fois dans la membrane pré-synaptique et dans la membrane post-synaptique (Biederer et al., 2002; Fogel et al., 2007).

2. Rôle des SynCAMs dans la synaptogenèse

D'une part, la surexpression de SynCAM1 et 2 dans des neurones d'hippocampe en culture induit une augmentation du nombre de structures pré-synaptiques, qui est corrélée avec une augmentation de la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs miniatures (mEPSCs) (Sara et al., 2005; Fogel et al., 2007). Au contraire, la surexpression du domaine intracellulaire C-terminal de SynCAM1 dans des neurones d'hippocampe en culture, induit une diminution du nombre de synapses, ainsi qu'une diminution du taux de libération/recyclage des SV (Biederer et al., 2002). Ce domaine agit ainsi comme un dominant négatif bloquant l'interaction de SynCAM avec ses partenaires intracellulaires. Ainsi la surexpression de SynCAM favorise la formation de synapses et cet effet nécessite l'interaction de SynCAM avec ses partenaires intracellulaires. Le knock-out de SynCAM1 a été généré (V. Stein, séminaire Bordeaux 2), mais n'a pas encore été caractérisé d'un point de vue fonctionnel.

D'autre part, le modèle de co-culture a permis de mettre en évidence le rôle synaptogène de SynCAM. En effet, les axones de neurones hippocampiques au contact de cellules HEK 293 exprimant SynCAM 1 ou 2, présentent une accumulation de syntaxine ou de synapsine, des marqueurs pré-synaptiques (machinerie de la fusion des SV) (Biederer et al., 2002; Fogel et al., 2007). De plus, au niveau des contacts axones/cellules HEK, la dynamique de recyclage des SV, est comparable à celle observée au niveau d'une synapse endogène (Biederer et al., 2002). Dans le même modèle de co-culture, il a été montré que les pré-synapses induites par SynCAM sont capables de libérer du glutamate de manière spontanée ou après stimulation. En effet, quand une sous-unité des rAMPA est co-exprimée en surface des cellules HEK, il est possible de mesurer des courants de type AMPA dans les cellules formant un contact avec un axone (Sara et al., 2005). L'expression de SynCAM est donc suffisante pour induire la formation de pré-synapses fonctionnelles. Cependant, l'expression de SynCAM dans des cellules PC12, ou l'utilisation de billes de latex recouvertes de protéine SynCAM purifiée, n'induit aucune accumulation de PSD-95, de rNMDA ou de rAMPA dans les dendrites de neurones en contact (Nam and Chen, 2005; Breillat et al., 2007). Au contraire, une étude récente a montré que dans un modèle d'agrégation de SynCAM avec des billes de latex, la co-expression des protéines 4.1B et 4.1N impliquées dans l'exocytose des rAMPA (Lin et al., 2009), permettait d'induire un recrutement des rNMDA et AMPA (respectivement) aux contacts bille/neurone (Figure 8)

(Hoy et al., 2009). Ces études ont ainsi permis de mettre en évidence que les complexes homophiles SynCAMs sont spécifiquement impliqués dans la différenciation pré-synaptique glutamatergique, alors que leur rôle dans la différenciation post-synaptique semble encore peu clair.

B. Cadhérines

1. Structure, partenaires protéiques et expression

La superfamille des cadhérines compte plus de 80 membres qui ont été classés en sous-familles, notamment celle des cadhérines classiques. Ce sont des protéines transmembranaires de type I, contenant un segment extracellulaire caractérisé par la répétition en tandem d'un domaine appelé EC (5 domaines EC pour les cadhérines classiques) et un domaine intracellulaire. Le domaine EC est composé d'environ 110 acides aminés et a une structure proche de celui des Ig. C'est par les domaines EC que les cadhérines établissent des interactions homophiles dépendantes du calcium et plus particulièrement via les domaines EC1 et EC2 (Yagi and Takeichi, 2000; Shan et al., 2004)).

Au niveau intracellulaire, les cadhérines interagissent avec le cytosquelette d'actine via les caténines (Figure 9) et plus particulièrement, la β -caténine. La β -caténine est une protéine cytosolique qui relie les cadhérines au cytosquelette d'actine par son interaction avec l' α -caténine. En effet, l' α -caténine possède dans son domaine N-terminal un site de liaison à la β -caténine et un site de liaison à l'actine dans son domaine C-terminal. De plus, l' α -caténine interagit avec des protéines de liaison de l'actine favorisant la polymérisation de l'actine, telles que la vinculine, l' α -actinine ou les formines (Kobielak and Fuchs, 2004). Au niveau synaptique, les caténines comme la N-cadhérine, sont impliquées dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. Il a été montré qu'une délétion de la β -caténine induit des changements morphologiques des épines dendritiques et du cytosquelette d'actine (Okuda et al., 2007). De même, une délétion de l' α -caténine, induit une augmentation de la motilité des épines, alors que sa surexpression les stabilise (Abe et al., 2004).

Enfin, la β -caténine possède un motif de liaison aux domaines PDZ, par lequel elle lie des protéines d'échafaudage parmi lesquelles, S-SCAM. Dans des neurones en culture, l'expression de β -caténine recrute S-SCAM aux synapses (Nishimura et al., 2002). Ainsi par son interaction avec β -caténine, la N-Cadhérine est liée à l'échafaudage post-synaptique (Figure 9) et participe donc potentiellement au recrutement et/ou à la stabilisation d'autres molécules d'adhérence ou de récepteurs aux neurotransmetteurs. De plus, des expériences de biochimie ont mis en évidence que: 1/ dans le cerveau, les sous-unités GluA1 et GluA4

des rAMPA peuvent être co-immunoprécipitées (Nuriya and Huganir, 2006) 2/ dans les neurones en culture, la N-cadhérine et la sous unité GluA2 sont associées et que cette interaction se fait par le domaine N-terminal extracellulaire de GluA2 (Figure 9) (Saglietti et al., 2007). Enfin, la N-cadhérine interagit avec NPRAP (neural plakophilin-related arm protein), qui lie GRIP et forme ainsi un complexe avec les rAMPA (Figure 9) (Silverman et al., 2007).

Les cadhérines classiques apparaissent très vite au niveau des synapses en développement. En effet, elles sont déjà présentes au site de contact initial axo-dendritique (Benson and Tanaka, 1998; Lee et al., 2003). De manière intéressante, on observe dans des neurones en culture l'expression de N-cadhérine dans les synapses néoformées qu'elles soient excitatrices ou inhibitrices. Cependant, la N-cadhérine est peu à peu perdue des synapses inhibitrices au cours du développement, mais est maintenue préférentiellement dans les synapses excitatrices (Benson and Tanaka, 1998). La N-Cadhérine, est localisée à la fois au niveau pré- et post-synaptique (Uchida et al., 1996; Jontes et al., 2004). *In vivo*, au niveau des synapses matures entre fibres moussues et neurones pyramidaux de CA3, il apparaît que la cadhérine est localisée en périphérie de la zone active dans un sous-domaine appelé « puncta adherentia » (Uchida et al., 1996).

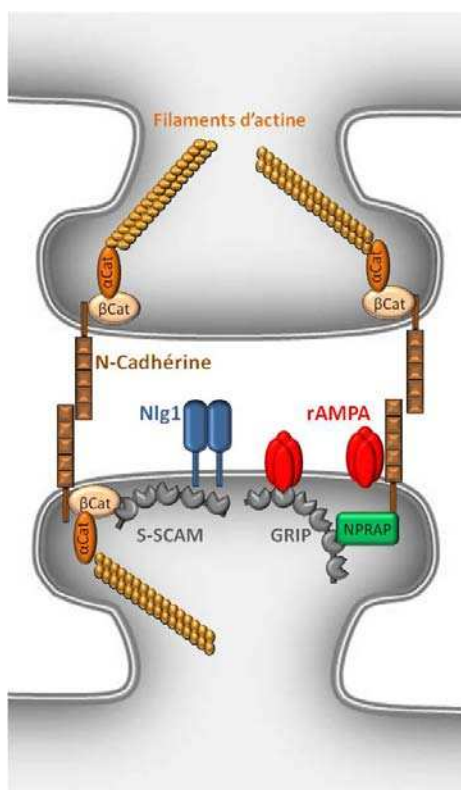


Figure 9 : Schéma représentant les partenaires protéiques des complexes N-Cadhérines. Via les caténines, la N-Cadhérine est liée au cytosquelette d'actine. La β -caténine relie aussi la N-Cadhérine à l'échafaudage post-synaptique via S-SCAM. Enfin, la N-Cadhérine interagit de manière indirecte avec les rAMPA via NPRAP et GRIP et de manière directe avec leur domaine extracellulaire.

2. Rôle des cadhérines dans la synaptogenèse

La surexpression d'un dominant négatif bloquant la fonction adhésive de la N-Cadhérine dans des neurones d'hippocampe en culture, induit une réduction du nombre de pré-synapses actives, ainsi qu'une diminution du nombre d'agrégats de PSD-95 (Togashi et al., 2002). De manière complémentaire, des neurones en culture invalidés pour le gène de la N-Cadhérine forment moins de synapses et présentent moins de spots de PSD-95 que des neurones sauvages. De plus, ces synapses contiennent en moyenne moins d'agrégats de Nlg1 (Stan et al., 2010). Enfin, l'utilisation d'un siRNA dirigé contre la N-Cadhérine dans des neurones en culture induit une diminution de la fréquence des mEPSCs AMPA, traduisant une diminution du nombre d'afférences excitatrices (Saglietti et al., 2007). De la même manière l'utilisation de siRNA dirigé contre les cadhérines 11 et 13 dans des neurones en culture entraîne une diminution du nombre de synapses excitatrices (Paradis et al., 2007). Ainsi, les cadhérines participent à la formation des synapses et pourraient jouer un rôle important dans le recrutement et la localisation d'autres molécules d'adhérence au niveau des contacts naissants.

Au contraire, bien que l'expression de la N-Cadhérine ait un effet sur le nombre de synapses elle ne présente pas de fonction synaptogène. En effet, dans des expériences de co-culture, où des cellules HEK exprimant la N-Cadhérine sont mises en contacts avec des neurones, il n'a pas été observé de formation des pré-synapses, que cela soit par l'accumulation de marqueur pré-synaptiques, ou par la capacité à délivrer du glutamate (Scheiffele et al., 2000; Sara et al., 2005; Linhoff et al., 2009). De la même manière, la liaison des billes de latex recouvertes de N-Cadhérine à la surface des neurones en culture, n'induit pas de différenciation post-synaptique (recrutement de PSD-95) (Heine et al., 2008a). Ces données suggèrent donc un rôle différent de la N-Cadhérine au cours de la synaptogenèse.

La combinaison de différentes études, montre que les cadhérines, par leurs propriétés adhésives, sont impliquées dans les phases précoces de formation et de stabilisation transitoire des contacts néoformés. Tout d'abord, la N-cadhérine bien que présente très tôt dans le développement au niveau des contacts inhibiteurs et excitateurs, n'est finalement conservée au cours du développement que dans les synapses excitatrices (Benson and Tanaka, 1998). De plus, l'expression d'un dominant négatif de la N-Cadhérine dans des neurones en culture immatures induit une diminution du nombre de synapses excitatrices (Togashi et al., 2002; Bozdagi et al., 2004). Au contraire, il a été observé que les cadhérines ne sont pas essentielles pour maintenir l'intégrité de certaines jonctions synaptiques matures (Benson and Tanaka, 1998; Zhang and Benson, 2001). Ces expériences impliquent donc un rôle spécifique des cadhérines dans les étapes plus

précoces de la synaptogenèse. D'autre part, les cadhérines E et N ne sont pas localisées au niveau des mêmes synapses dans le *stratum lucidum* (région CA3 de l'hippocampe). Cette localisation différentielle renforce l'hypothèse selon laquelle, les cadhérines 1/ instruisent la spécificité de contact lors de l'arrivée des axones au contact des dendrites, 2/ verrouillent ces contacts par leurs propriétés adhésives (Fannon and Colman, 1996). De plus, les expériences de perte de fonction des cadhérines ou des caténines montrent que ces complexes sont impliqués dans le maintien de la morphologie des épines dendritiques (Abe et al., 2004; Okuda et al., 2007). De plus, dans les synapses matures, les complexes N-Cadhérines sont localisés en péri-synapse (Uchida et al., 1996). Enfin, une étude récente a montré que dans des neurones invalidés pour la N-Cadhérine (NCad^{-/-}), l'agrégation de Nlg1 au niveau des synapses est réduite par rapport aux neurones sauvages (Stan et al., 2010). L'augmentation du nombre de synapses induite par la surexpression de Nlg1 est abolie dans les neurones NCad^{-/-}, mettant en évidence l'importance de la N-Cadhérine dans la fonction de Nlg1 dans la synaptogenèse (Stan et al., 2010). Une délétion des domaines PDZ de S-SCAM réduit de manière significative la co-localisation de la N-Cadhérine endogène et de Nlg1 endogène dans des neurones en culture sauvage, suggérant que cette coopération entre N-Cadhérine et Nlg1 se fait par l'intermédiaire de S-SCAM (Stan et al., 2010).

Ainsi, l'ensemble de ces données met en évidence des rôles différents des cadhérines au niveau de la mise en place ou du maintien des synapses. Tout d'abord, par leurs propriétés adhésives, elles sont impliquées au niveau des synapses naissantes dans les étapes de formation et de stabilisation transitoire des contacts, puis au niveau des synapses matures elles participent au maintien de la structure et de l'organisation des synapses. Enfin, la N-Cadhérine pourrait permettre de stabiliser les protéines d'adhérence comme les Nlg au niveau des contacts naissants et participer de manière indirecte à la mise en place des composants essentiels à la fonction synaptique.

C. Éphrines/récepteurs Eph

1. Structure, partenaires protéiques et expression

Les éphrines sont des petites molécules ancrées dans la membrane plasmique. Les éphrinesA1-5 possèdent une ancre GPI (glycosyl phosphatidyl-inositol) et se lient aux rEphA, alors que les éphrinesB1-3 ont un domaine transmembranaire et se lient aux rEphB. L'interaction éphrines/rEph se fait entre l'unique domaine extracellulaire des éphrines (RBD=receptor binding domain) et le domaine N-terminal des rEph (LBD=ligand binding domain) (Figure 10) (Barton et al., 2004). Les rEph possèdent aussi deux domaines de

liaison à la fibronectine dans le segment extracellulaire, ainsi qu'un domaine tyrosine kinase au niveau intracellulaire, permettant l'activation de voies de signalisation (Barton et al., 2004; Moeller et al., 2006; Tolias et al., 2007).

Les rEph, lient des protéines à domaine PDZ au niveau post-synaptique. Des études de biochimie ont permis de démontrer des interactions directes entre les rEph et les protéines à domaine PDZ, GRIP et PICK (Torres et al., 1998). De plus, dans des neurones en culture l'expression du rEphB2 permet de faciliter l'adressage membranaire des rAMPA et cet effet est dépendant de la séquence de liaison aux domaines PDZ du rEphB2 (Figure 10) (Kayser et al., 2006). Enfin, il a été montré que les rEphB sont capables de lier directement la sous-unité GluN1 des rNMDA et de les agréger (Dalva et al., 2000).

Les éphrines et les rEph sont exprimés de manière ubiquitaire dans les tissus au cours du développement, mais sont plus abondants au niveau du système nerveux (Barton et al., 2004). De plus, les rEph ainsi que les éphrines sont largement exprimés à la fois dans le système nerveux en développement et dans le cerveau adulte (Yamaguchi and Pasquale, 2004). Enfin, dans l'hippocampe, les éphrinesB ainsi que les rEphB sont enrichis au niveau des synapses (Torres et al., 1998).

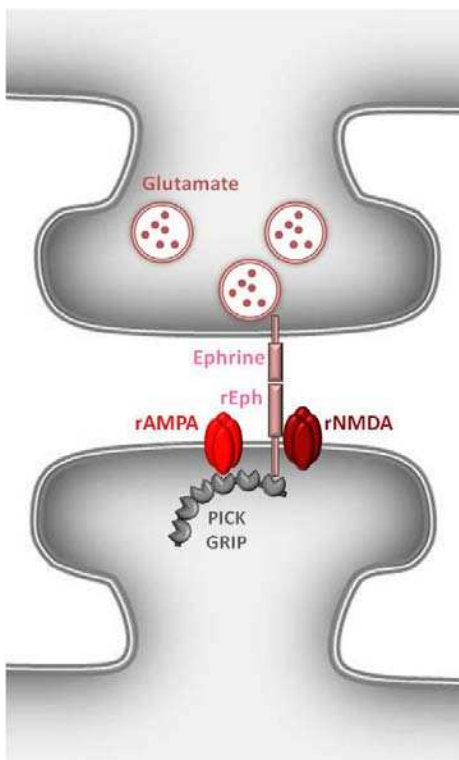


Figure 10 : Schéma représentant les partenaires protéiques des complexes éphrines/rEph. En post-synapse, les rEph lient PICK et GRIP, qui sont impliquées dans l'adressage et la stabilisation des rAMPA aux synapses. Les rEph lient de manière directe le domaine extracellulaire des rNMDA et les agrègent après activation par les éphrines. Enfin, les complexes éphrines/rEph participent à la différenciation pré-synaptique.

2. Rôle des éphrines/rEph dans la synaptogenèse

D'une part, l'utilisation de siRNA, ou shRNA dirigés contre le rEphB2 dans des neurones corticaux, induit une diminution du nombre de synapses et du nombre d'épines (Kayser et al., 2006; Kayser et al., 2008). Cet effet s'accompagne d'une diminution de la fréquence des mEPSCs traduisant une diminution du nombre d'afférences excitatrices (Kayser et al., 2006). De manière complémentaire, la surexpression du rEphB2 induit une augmentation de la densité de rAMPA de surface ainsi qu'une augmentation du nombre de synapses contenant la sous-unité GluN1 des rNMDA (Dalva et al., 2000; Kayser et al., 2006). Enfin, chez des jeunes animaux invalidés pour les trois gènes des rEphB (KO EphB_{1,2,3}), il a été observé une réduction de la densité des synapses excitatrices (diminution du marquage VGlut, diminution de PSD-95 dans les filopodes) (Kayser et al., 2006). Des expériences sur des neurones en culture issus de souris KO EphB_{1,2,3}, ou de souris invalidées pour les gènes des rEphB1 et 3 (KO EphB_{1,3}), ont permis de confirmer le rôle du rEphB2 dans la synaptogenèse. En effet, comparées aux cultures de neurones sauvages, les cultures KO EphB_{1,2,3} présentent une diminution du nombre de synapses excitatrices plus importante que les cultures KO EphB_{1,3}. Enfin, la réexpression du rEphB2 dans les cultures KO EphB_{1,2,3} suffit à récupérer cet effet et à rétablir un nombre de synapses comparable à celui des cultures sauvages (Kayser et al., 2008). L'ensemble de ces données montre que les rEphB sont nécessaires à la synaptogenèse et plus particulièrement que le rEphB2 est suffisant pour promouvoir la formation de synapses excitatrices.

D'autre part, les axones des neurones en co-culture avec des cellules HEK exprimant le rEphB2 présentent une accumulation de SV2 (synaptic vesicle protein 2, protéine impliquée dans la régulation de la dynamique de fusion et de recyclage des SV) (Kayser et al., 2006). Donc le rEphB2 est un facteur de différenciation pré-synaptique (Figure 10). De plus, la stimulation de neurones exprimant le rEphB1 avec des éphrinesB1 induit une co-agrégation des rEphB1 et des récepteurs NMDA (Figure 10) (Dalva et al., 2000). Au contraire, l'expression d'éphrineB1 en surface de cellules HEK n'induit pas d'accumulation de marqueurs pré-synaptiques au niveau des axones en contact avec les cellules (Scheiffele et al., 2000). Ainsi, les éphrines sont impliquées spécifiquement dans la différenciation post-synaptique. Ainsi les interactions éphrinesB/rEphB participent aux mécanismes de différenciation pré- et post-synaptique.

D. Neurexines

1. Structure, partenaires protéiques et expression

Les Nr_x ont tout d'abord été identifiées comme des récepteurs à l' α -latrotoxine (Ushkaryov et al., 1992). Cette toxine issue du venin de l'araignée « veuve noire » se fixe à des récepteurs pré-synaptiques et induit une libération massive de neurotransmetteur. Les Nr_x sont des protéines transmembranaires de type I. Chez les mammifères, il existe trois gènes codant pour différents isoformes de Nr_x1-3. Chaque gène est sous le contrôle de deux promoteurs, induisant la synthèse de deux classes de Nr_x, les neurexines- α (Nr α), ou les neurexines- β (Nr β) (Tabuchi and Sudhof, 2002). Les formes α et β sont identiques dans leur domaine intracellulaire, mais différent dans leur domaine extracellulaire. En effet celui-ci se compose de 6 domaines LNS (laminin, Nr_x, sex hormon-binding domain) entre lesquels s'intercalent 3 domaines EGF (epidermal growth factor) pour les formes α , alors que les formes β ne comptent qu'un seul domaine LNS (Missler and Sudhof, 1998). C'est par ce domaine LNS que les Nr_x interagissent avec leurs ligands, les neuroligines, ou les LRRTMs (Figure 11). Le domaine extracellulaire des Nr_x possède différents sites d'épissage alternatif (5 pour les formes α , 2 pour les formes β) (Ullrich et al., 1995). Le site d'épissage S4 qui permet l'insertion de 30 résidus et qui est commun aux formes α et β des Nr_x (Ichtchenko et al., 1996), joue un rôle particulièrement intéressant dans la spécificité d'interaction entre LRRTM2 et Nlg1, ou avec les différentes Nlg (Figure 11) (Comoletti et al., 2006; Siddiqui et al., 2010). L'existence de deux promoteurs pour chaque gène de Nr_x, ainsi que des différents sites d'épissage conduit à la synthèse de près d'un millier d'isoformes de Nr_x dont la fonction n'est pas encore connue, mais dont on suppose qu'ils instruisent un codage de la spécificité synaptique.

Au niveau pré-synaptique, des expériences de biochimie ont montré que les Nr_x interagissent avec CASK (Figure 10) (Hata et al., 1996; Biederer et al., 2002). Il a été montré récemment que CASK via son domaine kinase est capable de phosphoryler le domaine intracellulaire de Nr_x, de manière activité-dépendante (Mukherjee et al., 2008). La fonction de cette phosphorylation de Nr_x dans la transmission synaptique n'a pas encore été élucidée.

Pour étudier la localisation des Nr_x, l'équipe de T. Sudhölz a réalisé des marquages des ARN messagers de chacun des 6 isoformes de Nr_x. Ils ont pu observer que chaque isoforme présente un patron d'expression qui varie selon les structures du cerveau. Par exemple, Nr_x1 α est exprimée de manière assez homogène dans toutes les régions du cerveau, alors que Nr_x1 β n'est exprimée que dans les couches supérieures du cortex, le

thalamus et l'hippocampe. De plus à l'intérieur de chaque structure, il existe des régionalisations d'expression. Dans l'hippocampe, *Nrx1 α* est exprimée dans toutes les régions, alors que *Nrx1 β* est exprimée dans le gyrus dentelé, dans les régions CA3/CA2, mais est absente des neurones pyramidaux et des interneurons de CA1 (Ullrich et al., 1995). Le fait que les *Nrx* soient des récepteurs à la latrotoxine, ainsi que diverses expériences d'immuno-marquage ou de fractionnement cellulaire montrent que les *Nrx* sont enrichies dans la synapse et qu'elles s'expriment majoritairement au niveau pré-synaptique (Sugita et al., 1999; Berninghausen et al., 2007). Il existe cependant une expression des *Nrx* au niveau post-synaptique dont le rôle serait d'inhiber la fonction synaptogène des *Nlg* (Taniguchi et al., 2007).

2. Rôle des neurexines dans la synaptogenèse

Des études menées sur des simples, doubles ou triples KO des *Nrx α* , ont permis de mettre en évidence leur rôle dans la régulation de la libération pré-synaptique des neurotransmetteurs. Plus précisément, les *Nrx α* permettent un couplage fonctionnel des canaux calciques à la machinerie d'exocytose des vésicules pré-synaptiques (Missler et al., 2003; Zhang et al., 2005). De plus, la délétion des *Nrx α* induit une diminution spécifique de la densité des synapses inhibitrices, suggérant un rôle particulier des *Nrx α* dans la formation des synapses inhibitrices (Missler et al., 2003). Enfin, il a été montré que l'agrégation de *Nrx β* par des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire, est suffisante pour induire une différenciation pré-synaptique et que cet effet nécessite le domaine intracellulaire de *Nrx* permettant l'interaction avec CASK (Dean et al., 2003).

L'expression de *Nrx1 β* dans des cellules hétérologues, ou son couplage sur des billes de latex sont capables d'induire le recrutement de protéines spécifiques des post-synapses excitatrices ou inhibitrices, telles que *Nlg1* et *Nlg2*, des protéines d'échafaudage (PSD-95 et géphyrine respectivement) ou des récepteurs aux neurotransmetteurs (rNMDA et rGABA respectivement) au niveau des dendrites des neurones d'hippocampe en contact (Graf et al., 2004; Barrow et al., 2009). De même, l'expression de *Nrx* dans des cellules COS-7 mises en co-culture avec des neurones induit une accumulation de LRRTM 1 et 2 recombinants dans les dendrites en contacts avec les cellules COS-7 (Siddiqui et al., 2010). Enfin, dans un modèle de co-culture, l'expression de *Nrx1* dans des cellules PC12, induit une accumulation de PSD-95 et de rNMDA recombinants au niveau des dendrites des neurones contactant les cellules. Dans cette étude, les auteurs montrent que ce recrutement est indépendant de la présence d'une pré-synapse active dans le cas de PSD-95 et des rNMDA, mais que l'application en bain de glutamate et de glycine, permet d'induire aussi le recrutement de rAMPA recombinants (Nam and Chen, 2005). L'ensemble de ces données ont ainsi permis

de montrer que les Nr_x participent à la différenciation des post-synapses excitatrices et inhibitrices (Figure 11).

E. LRRTMs

1. Structure, partenaires protéiques et expression

Le rôle des protéines de la famille des LRRTMs dans la synaptogenèse a été mis en évidence très récemment (Linhoff et al., 2009). Les protéines de type LRR (Leucine Rich Repeats) sont connues pour intervenir dans les interactions protéine/protéine. Le domaine LRR est un motif commun à de nombreux domaines extracellulaires de protéines transmembranaires, ou à des protéines sécrétées impliquées dans des interactions ligand/récepteur, ou dans les adhérences cellulaires (Kobe and Kajava, 2001). Les LRRTMs sont des protéines transmembranaires de type I. Elles possèdent un domaine extracellulaire contenant 10 motifs LRR encadrés par des séquences riches en cystéines, suivi par un domaine transmembranaire et une queue intracellulaire de 71 ou 72 acides aminés (Lauren et al., 2003). En étudiant les propriétés d'interaction de LRRTM2 avec les isoformes de Nr_x (Nr_x1-3, formes α et β , formes -S4 et +S4), il a été montré que LRRTM2 ne peut lier que les formes -S4 des Nr_x1, 2 et 3 (Siddiqui et al., 2010), avec une association majoritaire avec Nr_x1 β , par rapport à Nr_x2 β et Nr_x3 β (Figure 11) (de Wit et al., 2009).

De la même manière, des expériences de biochimie et d'imagerie sur cellules en culture ont montré que LRRTM2 interagit avec PSD-95 via son domaine C-terminal intracellulaire et que cette interaction permettrait de réguler l'adressage membranaire des rAMPA (Figure 11) (de Wit et al., 2009).

Les LRRTMs 1-4 sont majoritairement exprimées dans le cerveau et de manière homogène dans toutes les structures cérébrales. Ces protéines sont exprimées à la fois dans le cerveau adulte et dans le cerveau en développement et sont notamment présentes dans les premiers jours de développement post-natal. *In vivo*, l'expression des LRRTMs est restreinte aux neurones (Lauren et al., 2003). Enfin, l'expression de LRRTMs recombinants dans des neurones en culture se fait au niveau des post-synapses excitatrices (Linhoff et al., 2009).

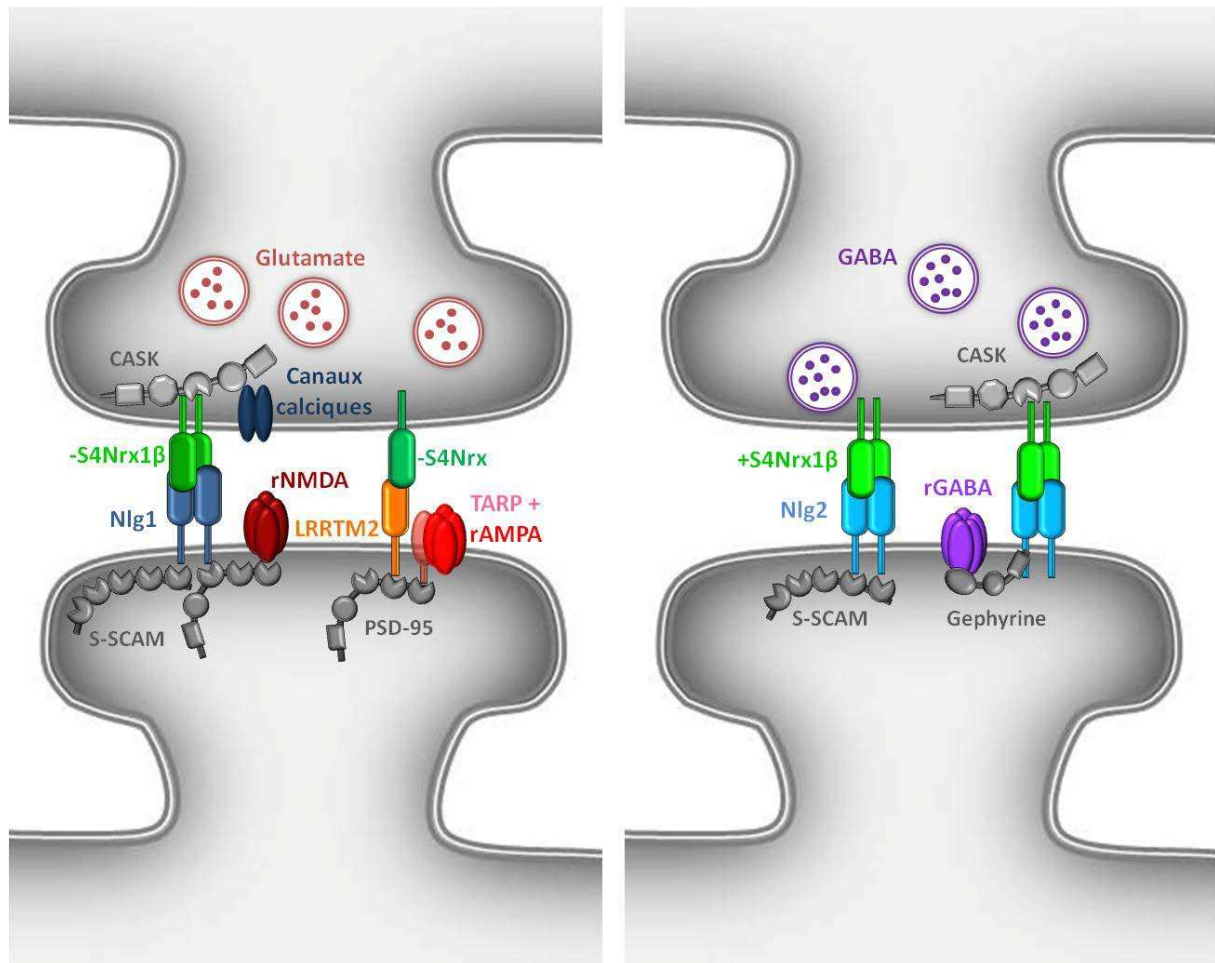


Figure 11 : Schéma représentant les partenaires protéiques des complexes NrxF/Nlg et des complexes NrxF/LRRTM. Les NrxF pré-synaptiques lient par leur domaine intracellulaire la protéine CASK elle-même impliquée dans l'agrégation des canaux calciques aux synapses. Les Nlg et LRRTMs lient les protéines d'échafaudage post-synaptique. Les NrxF induisent une différenciation post-synaptique, alors que les Nlg et LRRTMs induisent une différenciation pré-synaptique. L'isoforme -S4NrxF1β lie préférentiellement Nlg1 et ce complexe induit la formation et la différenciation des synapses excitatrices par le recrutement de PSD-95 et des rNMDA. Au contraire, l'isoforme +S4NrxF1β lie Nlg2 et ce complexe est impliqué dans la formation des synapses inhibitrices, avec le recrutement de géphyrine et des rGABA. LRRTM2 lie les formes -S4 des NrxF et ces complexes participent à la formation des synapses excitatrices glutamatergiques et à la mise en place des rAMPA.

2. Rôle des LRRTMs dans la synaptogenèse

D'une part, l'expression de LRRTM2 dans des cultures de neurones est suffisante pour induire une augmentation du nombre de synapses (détectées par un marquage de synapsine, ou synaptophysine) et plus spécifiquement du nombre de synapses excitatrices (augmentation du nombre de spots de PSD-95 et de VGlut, mais pas d'effet sur VGAT) (Ko et al., 2009a; Siddiqui et al., 2010). L'utilisation d'un shRNA dirigé contre LRRTM2 dans des

neurones en culture diminue au contraire le nombre de synapses excitatrices et induit *in vivo*, une diminution de l'amplitude des eEPSCs AMPA et NMDA (de Wit et al., 2009). De manière intéressante, les souris invalidées pour LRRTM1 ne présentent pas de réduction du nombre de synapses, suggérant une compensation par les autres membres de la famille des LRRTMs ou par les Nlg (Linhoff et al., 2009).

D'autre part, l'expression de LRRTM1 ou LRRTM2 dans des cellules COS-7 induit la formation d'hémi pré-synapses excitatrices fonctionnelles caractérisées par l'accumulation de synapsine et VGlut (aucun effet sur VGAT) dans les axones en contact avec les cellules COS-7 (Ko et al., 2009a; Linhoff et al., 2009). En couplant le domaine extracellulaire LRR de LRRTM2 à des billes, il a été montré que ce domaine est suffisant pour instruire la différenciation pré-synaptique (Linhoff et al., 2009). Dans ce modèle de co-culture, l'expression de LRRTM2 n'induit pas d'accumulation de PSD-95 au niveau des neurites, indiquant un rôle spécifique de LRRTM2 dans la différenciation pré-synaptique (Ko et al., 2009a). Il semble que la fonction synaptogène de LRRTM2, soit dépendante de celle des Nrx. Dans les expériences de co-culture, la différenciation pré-synaptique induite par l'expression de LRRTM2, est bloquée par l'utilisation de Nrx1 β soluble empêchant l'interaction avec la Nrx endogène (Ko et al., 2009a). Enfin, en inhibant la synthèse de Nrx1 avec des shRNA dans des neurones mis en co-culture avec des cellules hétérologues exprimant LRRTM2, on n'observe plus de différenciation pré-synaptique au niveau des contacts axones/cellules (de Wit et al., 2009). Ainsi, les complexes Nrx1/LRRTM2 participent spécifiquement à la différenciation des synapses excitatrices (Figure 11).

F. Neuroligines

1. Structure, partenaires protéiques et expression

Chez les mammifères, il existe 4 gènes codant pour des Nlg1-4. Les Nlg1-3 sont communes à tous les mammifères, alors que Nlg4 n'est exprimée que chez l'homme (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996; Bolliger et al., 2001). Les Nlg sont aussi des protéines transmembranaires de type I. Le domaine extracellulaire se compose d'un seul domaine homologue à l'acétylcholinestérase, mais qui ne possède pas d'activité enzymatique. Les Nlg sont des ligands endogènes des Nrx. En effet, Nrx et Nlg sont co-immunoprécipitées à partir d'extraits de cerveau (Ichtchenko et al., 1995). Les Nlg forment des dimères constitutifs par une interaction au niveau du domaine extracellulaire (Dean et al., 2003). Ces dimères interagissent avec deux molécules de Nrx par leur domaine extracellulaire (Figure 11) (Arac et al., 2007). L'interaction entre Nrx et Nlg est dépendante

du calcium. Plus précisément, au niveau extracellulaire des Nr x et des Nlg des résidus permettent de coordonner la liaison de deux ions calcium (Arac et al., 2007). Le domaine extracellulaire des Nlg comportent deux sites d'épissage alternatif, le site SSA commun à toutes les Nlg et le site SSB (insertion de 8 résidus), uniquement présent sur Nlg1 (Ichtchenko et al., 1996; Boucard et al., 2005). Les Nlg lient les Nr x α et β avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Comoletti et al., 2006; Arac et al., 2007; Lee et al., 2010). La présence ou non de l'insert au niveau du site SSB des Nlg va orienter les interactions avec les formes α ou β des Nr x . En effet, en absence de cet insert (toujours le cas pour Nlg2, 3 et 4), les Nlg lient aussi bien les formes α ou β indépendamment de la présence d'un insert en position S4 de la Nr x . Au contraire la présence de cet insert en position SSB (uniquement pour Nlg1), restreint les interactions possibles aux formes β des -S4Nr x (Figure 11) (Comoletti et al., 2006; Lee et al., 2010). Dans le cadre de l'interaction avec Nr x 1 β , on obtient ainsi une hiérarchie dans l'affinité des interactions avec les Nlg, que l'on peut représenter ainsi : Nlg1>Nlg4>>Nlg3>Nlg2 (Comoletti et al., 2006; Chen et al., 2008). Ainsi, les différents variants d'épissage de Nlg présentent des différences d'affinité pour les isoformes des Nr x , créant ainsi un « code d'interaction » qui pourrait être impliqué dans l'acquisition de la spécificité synaptique.

Au niveau post-synaptique, Nlg1 interagit de manière directe via sa séquence de liaison aux domaines PDZ, avec PSD-95 et S-SCAM (Synaptic SCAffolding Molecule) (Figure 11) (Irie et al., 1997; Hirao et al., 1998). De même le domaine intracellulaire de Nlg2 est capable d'interagir avec PSD-95, S-SCAM, mais aussi avec géphyrine, une protéine d'échafaudage des synapses inhibitrices ne contenant pas de domaine PDZ (Figure 11) (Irie et al., 1997; Biederer, 2006; Sumita et al., 2007; Pouloupoulos et al., 2009). PSD-95 comme S-SCAM interagissent de manière directe avec les rNMDA (Niethammer et al., 1996; Hirao et al., 1998) et PSD-95 interagit de manière indirecte avec les rAMPA (Chen et al., 2000; Schnell et al., 2002). Au niveau des synapses inhibitrices, géphyrine interagit avec des sous-unités des récepteurs au GABA (rGABA) et est impliquée dans l'agrégation de ces récepteurs au niveau des synapses inhibitrices (Berninghausen et al., 2007; Kneussel and Loebrich, 2007; Tretter et al., 2008). Ainsi, les protéines d'échafaudage semblent être un lien physique entre les Nlg et les récepteurs aux neurotransmetteurs. Enfin, l'interaction des Nlg avec les protéines d'échafaudage, peut aussi jouer un rôle dans la régulation de la fonction synaptique. Par exemple il a été proposé que l'interaction Nlg1/PSD-95 permette de contrôler de façon rétrograde, la probabilité de libération de glutamate des pré-synapses et ainsi de réguler la réponse post-synaptique (Futai et al., 2007).

Alors que Nlg4 est exprimée de manière ubiquitaire chez l'homme (Bolliger et al., 2001), les Nlg 1, 2 et 3 sont exclusivement exprimées dans le système nerveux central et leur profil d'expression corrèle avec le développement synaptique (Irie et al., 1997; Song et

al., 1999). De plus, les Nlg1-3 sont exprimées de manière homogène dans l'ensemble des structures du cerveau (Varoqueaux et al., 2006). Les Nlg sont exprimées au niveau des membranes post-synaptiques, mais ont une spécificité de localisation selon le type de synapse. En effet, alors que Nlg3 s'exprime dans tout type de synapses, Nlg1 est spécifiquement exprimée au niveau des synapses excitatrices et Nlg2 est spécifique des synapses inhibitrices (Song et al., 1999; Varoqueaux et al., 2004; Budreck and Scheiffele, 2007).

2. Rôle des neuroligines dans la synaptogenèse

a. Les études de gain ou de perte de fonction en culture

De nombreuses études se sont intéressées aux effets induits par un gain de fonction des protéines de la famille des neuroligines. De manière générale dans des neurones en culture, la surexpression de Nlg1, 2 ou 3 induit un doublement du nombre de structures synaptiques détectées soit par des marqueurs communs aux synapses inhibitrices et excitatrices (synapsine), soit par des marqueurs spécifiques (VGlut, VGAT) (Dean et al., 2003; Prange et al., 2004; Chih et al., 2005; Chubykin et al., 2007). Au contraire, l'utilisation de siRNA dirigé contre les Nlg1, 2 ou 3 bloque cet effet et induit même une diminution du nombre de synapses, renforçant ainsi l'importance des Nlg dans la synaptogenèse (Chih et al., 2005). Plus précisément, Nlg1 induit préférentiellement la formation de synapses excitatrices, alors que Nlg2 favorise la formation de synapses inhibitrices (Figure 11). En effet, l'expression de Nlg1 induit une augmentation de la densité du marquage VGlut, VGAT, PSD-95, Homer, GluA2/3 et GluN1 (Dean et al., 2003; Prange et al., 2004; Chih et al., 2005). Au niveau fonctionnel, bien que l'expression de Nlg1 induise une augmentation de la fréquence des mEPSCs AMPA et des mIPSCs (courants post-synaptiques inhibiteurs miniatures) (Prange et al., 2004) seule l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs évoqués de type AMPA (eEPSCs) est augmentée (Chubykin et al., 2007). Au contraire, la surexpression de Nlg2 induit une forte augmentation du marquage VGAT spécifique des synapses inhibitrices (Chih et al., 2005). De plus, la surexpression de Nlg2 n'a aucun effet sur les eEPSCs, mais induit une augmentation de l'amplitude des eIPSCs (courants post-synaptiques inhibiteurs évoqués) (Chubykin et al., 2007).

L'utilisation de mutants de Nlg1 permettant d'abolir soit l'interaction avec PSD-95 (Nlg1 Δ C, délétion du domaine C-terminal), soit l'interaction avec Nr_x (Nlg1Swap, domaine extracellulaire échangé avec celui de l'acétylcholinestérase) (Scheiffele et al., 2000), a permis de mettre en évidence l'importance de ces domaines. La surexpression de Nlg1 Δ C, induit une augmentation du nombre de synapses, au même titre que Nlg1 sauvage. Au

contraire, Nlg1Swap est incapable d'induire cet effet (Chih et al., 2005), indiquant que le rôle de Nlg1 dans la formation de contacts synaptiques est dépendant de son interaction avec Nrx et non de son interaction avec les partenaires intracellulaires (Figure 12). L'expression du mutant Nlg1 Δ C, empêche l'accumulation de PSD-95, ou des rAMPA, ayant pour effet une diminution de l'amplitude et de la fréquence des mEPSCs AMPA (Nam and Chen, 2005). D'autre part, l'expression du mutant Nlg1Swap induit une accumulation de PSD-95 ou des rNMDA au niveau extra-synaptique (Chih et al., 2005), renforçant l'idée que l'effet d'induction de la formation des synapses est dissocié de celui du recrutement des partenaires post-synaptiques (Figure 12).

Cependant, une étude récente étudiant des mutants ponctuels du domaine extracellulaire de Nlg1, montre que certains mutants ayant perdu la capacité à lier Nrx1 α et Nrx1 β , sont toujours capables d'induire la formation de synapses lorsqu'ils sont exprimés dans des neurones en culture (Ko et al., 2009b). Cette étude suggère que ces mutants de Nlg1 ne liant plus Nrx1 α et Nrx1 β sont capables de lier d'autres molécules pré-synaptiques pour induire la formation de nouvelles synapses. Le domaine extracellulaire de Nlg1 peut lier plusieurs membres de la famille des Nrx (Chen et al., 2008; Koehnke et al., 2008; Leone et al., 2010; Siddiqui et al., 2010), impliquant l'existence de phénomènes de compensation entre les différents couples Nrx/Nlg.

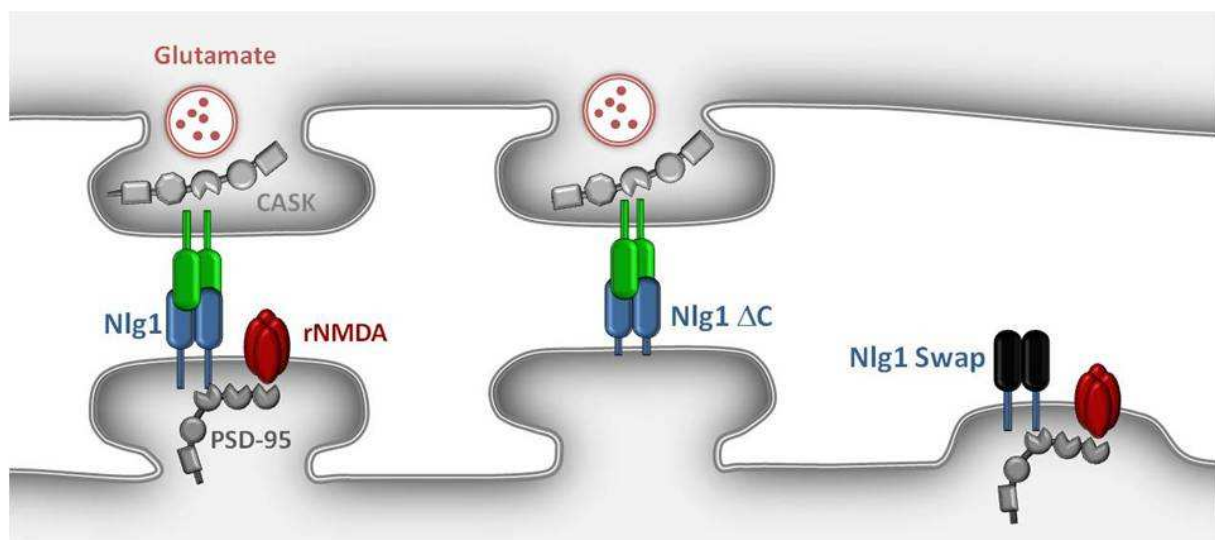


Figure 12 : Schéma représentant les effets de Nlg1 et des mutants Nlg1 Δ C et Nlg1Swap dans la formation des synapses. Le domaine extracellulaire de Nlg1 interagissant avec Nrx permet la formation de contacts entre pré- et post-synapse, alors que le domaine intracellulaire permet le recrutement des composants post-synaptiques.

b. Les études de gain ou de perte de fonction: modèles animaux

Les études utilisant des souris invalidées pour les gènes de Nlg1, 2 ou 3, (Nlg KO (Varoqueaux et al., 2006)) révèlent des effets encore plus complexes. En effet, au niveau morphologique, ces souris présentent des défauts mineurs dans le nombre de synapses ainsi que dans la morphologie des post-synapses, de la fente synaptique, ou encore dans le nombre de SV (Varoqueaux et al., 2006; Pouloupoulos et al., 2009). De plus, des cultures de neurones d'hippocampe issues de souris Nlg1 KO, présentent la même densité de synapses que des cultures de neurones sauvages (Wittenmayer et al., 2009). *In vivo* dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe, aucune diminution du nombre de synapses n'est observée chez les souris Nlg1 KO (Blundell et al., 2010). Au contraire, les souris Nlg2 KO présentent un déficit en synapses inhibitrices dans l'hippocampe (Blundell et al., 2009). Plus précisément, dans des cultures issues de Nlg2 KO, le nombre de synapses ainsi que le nombre de post-synapses inhibitrices, au niveau des neurites distaux est identique aux neurones sauvages (Pouloupoulos et al., 2009). Cependant, ces cultures présentent un déficit du nombre de synapses et de post-synapses inhibitrices au niveau somatique. Cette différence correspond *in vivo*, dans l'hippocampe, à un défaut de synapses inhibitrices dans le *Stratum pyramidale* chez les souris Nlg2 KO, mais à une distribution normale dans le *Stratum radiatum* (Pouloupoulos et al., 2009).

Au niveau fonctionnel, la délétion chronique de Nlg1, ne présente pas d'effet sur la transmission spontanée, mais induit une diminution des eEPSCs NMDA, sans affecter les eIPSCs (Chubykin et al., 2007). Au contraire, une étude récente menée sur des têtards de xénope, après injection d'oligonucléotides anti-sens (système Morpholino), a montré une diminution de la fréquence et de l'amplitude des mEPSCs AMPA chez les animaux invalidés pour l'expression de Nlg1. De plus, chez les Nlg1 KO, il a été observé dans CA1, un défaut d'induction de la potentialisation à long terme induite par une stimulation à haute fréquence (Blundell et al., 2010). Chez des animaux infectés par un virus contenant un shRNA contre Nlg1 l'induction de la LTP dans l'amygdale est complètement abolie (Kim et al., 2008b). D'autre part, la délétion de Nlg2 dans l'hippocampe, induit à la fois une diminution de la fréquence et de l'amplitude des IPSCs spontanés et miniatures dans les cellules pyramidales d'animaux jeunes et dans les cellules granulaires d'animaux adultes (Pouloupoulos et al., 2009; Jedlicka et al., 2010). Bien que ces études aient été réalisées dans des modèles ou structures cérébrales différents pouvant présenter des mécanismes de transmission distincts, elles mettent en évidence les difficultés d'interprétation entre les études de délétion chronique et aigüe. L'absence d'effet de la délétion des Nlg dans les simples KO sur la formation des synapses peut être expliquée par la mise en place de phénomènes de compensation qui sont évités par l'utilisation d'outils de délétion aigüe et par une redondance

entre les Nlg et leur capacité à lier les Nr_x. Cependant, le fait que les triples KO Nlg1-3, ne présentent pas non plus de déficit dans la formation des synapses implique l'existence d'autres molécules capables de se substituer à la fonction des Nlg. Très récemment, la famille des LRRTMs et plus particulièrement LRRTM2 a été identifiée comme étant un ligand des Nr_x et ouvre donc la possibilité d'une redondance dans la fonction des LRRTMs et des Nlg (de Wit et al., 2009; Ko et al., 2009a; Siddiqui et al., 2010). La co-expression de Nlg1 et de LRRTM2 potentialise l'effet d'augmentation du nombre de synapses induit par Nlg1, mettant à jour une coopération fonctionnelle entre ces deux molécules (Siddiqui et al., 2010). L'existence de cette redondance de fonction entre les complexes Nr_x/Nlg et Nr_x/LRRTM montre l'importance de ces complexes dans la mise en place des synapses et confirme l'hypothèse d'une compensation par l'un ou l'autre des complexes en cas de perte de fonction (Brose, 2009).

c. Etudes de la fonction synaptogène des neuroligines

L'expression de Nlg1 ou Nlg2 dans des cellules hétérologues (HEK293) en co-culture avec des neurones, induit la formation de pré-synapses aux contacts axones/HEK293 (Scheiffele et al., 2000; Graf et al., 2004; Lee et al., 2010). De même, en incubant des billes de silicate couplées avec de la Nlg1 recombinante avec des neurones en culture, on observe une co-agrégation de synapsine et de Nr_x au contact billes/axones (Dean et al., 2003). De plus, les pré-synapses induites par l'expression de Nlg1 sont fonctionnelles. En effet, elles présentent des dynamiques de recyclage des SV semblables à celle des synapses endogènes et sont capables de libérer du glutamate de manière spontanée et d'activer des rAMPA ou des rNMDA co-exprimés à la surface des cellules HEK (Fu et al., 2003; Sara et al., 2005). L'effet synaptogène des Nlg est dépendant de l'interaction trans-synaptique avec les Nr_x. En effet, dans un modèle de co-culture le mutant Nlg1Swap et des mutants ponctuels de Nlg1 ne pouvant plus lier les Nr_x sont incapables d'induire une différenciation pré-synaptique (Scheiffele et al., 2000; Ko et al., 2009b).

Les Nlg sont donc capables d'instruire une différenciation pré-synaptique alors que les Nr_x instruisent une différenciation post-synaptique. L'ensemble de ces données a ainsi mis en évidence le rôle des complexes trans-synaptiques Nr_x/Nlg dans la mise en place et la différenciation des synapses excitatrices et inhibitrices (Figure 11).

d. Les complexes neurexines/neuroligines participent au contrôle de l'équilibre excitation/inhibition

Ce qui détermine qu'une synapse sera inhibitrice ou excitatrice est le contenu des vésicules pré-synaptiques (GABA, ou glutamate), mais aussi la présence des récepteurs aux neurotransmetteurs correspondant à la membrane post-synaptique. Sur des modèles en culture, il semble que la différenciation pré-synaptique ait lieu avant la différenciation post-synaptique (Friedman et al., 2000; Okabe et al., 2001). Dans ce modèle, la mise en place de vésicules de neurotransmetteur inhibiteur ou excitateur se ferait donc avant la mise en place des récepteurs post-synaptiques. Ainsi, l'acquisition d'une spécificité pré-synaptique permettrait d'instruire la différenciation post-synaptique afin d'apposer les bons récepteurs aux neurotransmetteurs. Plusieurs types de données laissent à penser que les complexes Nrx/Nlg au-delà d'avoir un rôle dans le recrutement des protéines pré- et post-synaptiques, joueraient aussi un rôle dans l'adressage de la spécificité synaptique au cours de la synaptogenèse.

Tout d'abord *in vivo* comme en culture, l'expression de Nlg1 se fait majoritairement au niveau des synapses excitatrices, où elle est co-localisée avec les rAMPA, alors que l'expression de Nlg2 se fait préférentiellement au niveau des synapses inhibitrices, où elle est co-localisée avec les rGABA (Song et al., 1999; Graf et al., 2004; Varoqueaux et al., 2004; Chih et al., 2005; Levinson et al., 2005). Si l'expression de Nlg était suffisante pour déterminer la spécificité synaptique, elle s'accompagnerait de l'expression des protéines d'échafaudage spécifique de chaque type de synapse. Au contraire, il a été montré que l'expression des protéines d'échafaudage peut instruire l'agrégation des Nlg, ainsi que le type de synapse qu'elles vont induire (Figure 13). L'augmentation de la fréquence des mIPSCs induite par la surexpression de Nlg1 est bloquée par l'expression de PSD-95, induisant une augmentation du ratio excitation/inhibition (E/I) (Prange et al., 2004). Cet effet peut s'expliquer par le fait que dans des neurones en culture sur-exprimant PSD-95, on observe une délocalisation de Nlg2 vers les synapses excitatrices (Figure 13) (Graf et al., 2004; Levinson et al., 2005). De manière complémentaire, l'inhibition de PSD-95 par un siRNA induit une relocalisation de Nlg1 au niveau des synapses inhibitrices (Figure 13) (Prange et al., 2004). Une étude récente a montré de la même manière que l'utilisation d'un siRNA contre PSD-95 intensifie la localisation de Nlg2 au niveau des synapses inhibitrices par rapport aux synapses excitatrices, mais que l'utilisation d'un siRNA contre géphyrine, relocalise Nlg2 au niveau des synapses excitatrices (Figure 13) (Levinson et al., 2010). Ces expériences suggèrent donc que les protéines d'échafaudage sont capables de séquestrer de manière spécifique l'une ou l'autre des Nlg afin d'instruire la spécificité synaptique.

Sachant que toutes les Nlg ont la capacité de lier PSD-95 (Irie et al., 1997), comment se fait l'adressage différentiel des Nlg1 et 2 endogènes ? Une première possibilité est qu'il y ait une différence d'affinité pour l'interaction avec PSD-95, faisant que Nlg1 soit dominante sur Nlg2. A l'heure actuelle, cette hypothèse reste encore à tester. La seconde hypothèse évoquée par une étude très récente est qu'il existe une signalisation permettant d'instruire la spécificité d'interaction Nlg1/PSD-95 vs Nlg2/géphyrine. En mutant en alanine une tyrosine située dans le site de liaison à la géphyrine, en position 770 sur la queue C-terminale de Nlg2, les auteurs ont observé, une perte d'interaction avec géphyrine, ainsi qu'un défaut de recrutement dans les essais d'agrégation (Poulopoulos et al., 2009). Ces expériences indiquent que la phosphorylation de la tyrosine 770 de Nlg2 module l'interaction avec la géphyrine et donc potentiellement l'adressage de Nlg2 aux synapses inhibitrices. Cette tyrosine est conservée en position 782 sur la queue de Nlg1, suggérant que le même type de régulation puisse exister pour Nlg1 (Poulopoulos et al., 2009). Ces études suggèrent donc que les phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation pourraient participer à la régulation de la formation de synapses induite par les Nlg. A l'heure actuelle, les kinases ou les phosphatases impliquées dans ces mécanismes ne sont pas connues. Cependant, une étude récente a montré que les Nrx et les Nlg interagissent avec PTPRT (protein tyrosine phosphatase receptor type), dont la surexpression induit une augmentation du nombre de synapses excitatrices (Lim et al., 2009). Cependant, il n'a pas été montré que PTPRT puisse changer l'état de phosphorylation de Nlg1 de manière directe ou indirecte, mais cette étude permet de mettre en évidence l'implication des mécanismes de phosphorylation dans la synaptogenèse, ainsi qu'une interaction avec les Nlg. On peut se demander quels seraient alors les signaux induisant ces mécanismes de phosphorylation. Dans l'hypothèse que la différenciation post-synaptique est précédée de l'acquisition d'une spécificité pré-synaptique, on peut penser que cette signalisation vienne d'un codage par les différents isoformes de Nrx. Il a notamment été démontré que l'isoforme +S4Nrx1 β qui a une affinité plus forte pour Nlg2 induit préférentiellement la formation de synapses inhibitrices (recrutement de VGAT, géphyrine), alors que l'isoforme -S4Nrx1 β qui a une affinité plus forte pour Nlg1 induit préférentiellement la formation de synapses excitatrices (recrutement de VGlut, PSD-95) (Figure 11) (Boucard et al., 2005; Chih et al., 2006; Graf et al., 2006).

Les complexes Nlg/protéines d'échafaudage participent donc *in vitro* au contrôle de l'équilibre E/I (Figure 13). Les mécanismes précis permettant ces contrôles ainsi que l'existence d'une telle régulation *in vivo* restent à démontrer.

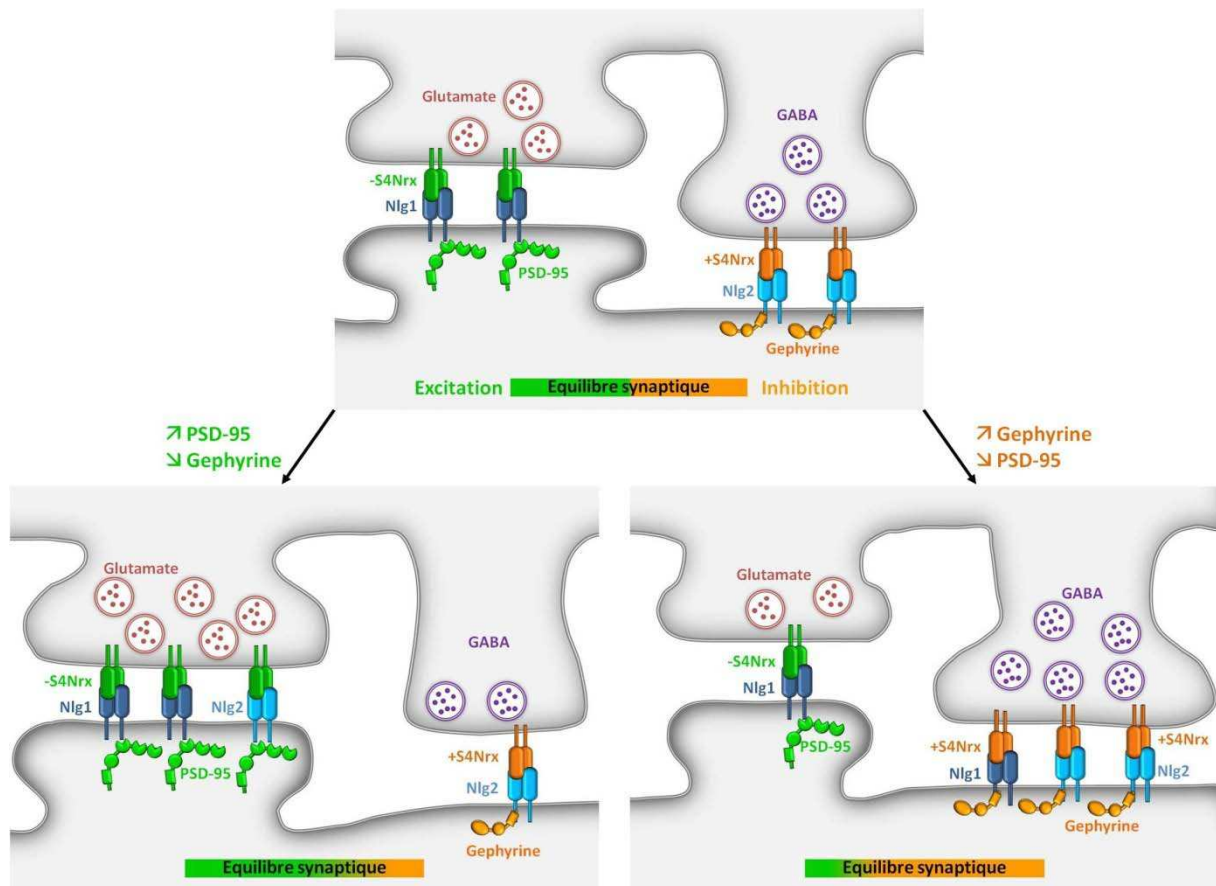


Figure 13 : Schéma représentant comment l'association neuroligines/protéines d'échafaudage peut réguler l'équilibre excitation/inhibition. A l'état basal, Nlg1 est associée à PSD-95 dans les synapses excitatrices et Nlg2 à géphyrine dans les synapses inhibitrices. Dans le cas de la surexpression de PSD-95, ou de la délétion de géphyrine, Nlg2 est délocalisée vers les synapses excitatrices, augmentant ainsi le ratio E/I. Dans le cas où le ratio géphyrine/PSD-95 est en faveur de la géphyrine, Nlg1 est relocalisée vers les synapses inhibitrices, orientant ainsi la balance E/I vers l'inhibition. Inspiré de (Levinson and El-Husseini, 2005).

e. Pathologies associées avec des dysfonctions des complexes neurexines/neuroligines

La fonction cérébrale est basée sur une balance entre excitation et inhibition. Un défaut de la balance E/I est impliqué dans de nombreuses pathologies, comme l'autisme, le syndrome de Tourette, ou la schizophrénie. L'autisme est une pathologie neuro-développementale héréditaire qui affecte environ 0.6% des enfants. L'étiologie de l'autisme étant encore inconnue, et ces troubles sont donc diagnostiqués sur la base de critères comportementaux, dont les symptômes typiques sont des déficits d'interaction sociale, des défauts de langage et des comportements répétitifs. Des anomalies génétiques, y compris des mutations ponctuelles de *Nrx1* (Feng et al., 2006; Szatmari et al., 2007; Kim et al., 2008a; Marshall et al., 2008; Yan et al., 2008), de *Nlg3* et de *Nlg4* (Jamain et al., 2003;

Laumonnier et al., 2004; Yan et al., 2005; Chocholska et al., 2006; Talebizadeh et al., 2006; Macarov et al., 2007; Lawson-Yuen et al., 2008), ont été identifiées chez des patients ou des famille de patients atteints d'autisme, montrant ainsi que ces gènes sont responsables de certaines formes monogéniques de syndromes autistiques.

Les études des mutants de Nlg dans des systèmes *in vitro*, permettent d'essayer de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'autisme. Tout d'abord l'expression de mutants ponctuels de Nlg3 et Nlg4 dans des cellules hétérologues a permis de mettre en évidence un défaut d'adressage à la membrane plasmique et une accumulation dans le RE, probablement due à un défaut dans la structure protéique (Chih et al., 2004; De Jaco et al., 2006). De plus des études de biochimie ont montré que certains de ces mutants (en l'occurrence Nlg3 Arg451Cys, trouvée chez deux frères atteints d'autisme) perdent leur affinité pour leur ligand pré-synaptique, la Nr_x1 β (Comoletti et al., 2004). Cette perte d'affinité pour la Nr_x peut être corrélée avec l'observation que ces mêmes mutants sont incapables d'induire la formation de nouvelles synapses quand ils sont exprimés dans des neurones en culture (Chih et al., 2004). Ainsi les mutations ponctuelles observées sur Nlg3 et Nlg4 induisent des défauts structuraux et fonctionnels.

Les mutations observées sur des patients humains ont été introduites dans des modèles animaux afin d'étudier leur effet *in vivo* et notamment l'induction d'un phénotype autistique significatif. Ces expériences ont été réalisées sur deux modèles animaux, l'un portant une mutation ponctuelle de Nlg3 (Arg451Cys), l'autre une mutation de perte de fonction de Nlg4 (Jamain et al., 2003). Des études de comportement ont montré que les souris portant la mutation de Nlg4, présentent des défauts importants des comportements d'interaction sociale réciproque et de communication, pouvant être interprétés comme un phénotype autistique (Jamain et al., 2008). Les souris portant la mutation ponctuelle de Nlg3 présentent elles aussi des défauts d'interaction sociale, qui sont cependant moins marqués que pour les souris Nlg4 (Tabuchi et al., 2007). De manière intéressante, la transmission synaptique inhibitrice est augmentée au niveau du cortex somato-sensoriel de ces souris, indiquant un défaut de la balance E/I qui pourrait contribuer au phénotype observé (Tabuchi et al., 2007). Ces souris présentent aussi une amélioration de performances lors des tests d'apprentissage spatial. Ce phénotype est difficilement accordable avec celui observé chez les patients portant cette mutation qui présentent des handicaps d'apprentissage (Jamain et al., 2003). Ainsi les mutations des Nlg3 et Nlg4 semblent induire chez l'animal des phénotypes plus ou moins cohérents avec ceux observés chez l'homme, indiquant que ces mutations puissent être des modèles pour étudier les causes génétiques de l'autisme. Cependant, il ne faut pas oublier que les mutations observées l'ont été dans des familles ou chez des individus. En effet d'autres études de recherche d'anomalies génétiques chez des patients atteints d'autisme n'ont pas identifié les gènes codant pour les Nlg (Vincent et al.,

2004; Gauthier et al., 2005; Blasi et al., 2006). Ainsi, par leur rôle de régulation de la balance E/I, les Nlg semblent être impliquées dans l'autisme, mais il est probable qu'elles ne soient responsables que d'une petite fraction des phénotypes observés et que ce soit de manière générale les protéines régulant la balance E/I qui participent à cette pathologie. En effet, l'autisme est un syndrome hétérogène impliquant de nombreux gènes, et seul un faible pourcentage des patients présente une étiologie commune.

	SynCAM	N-Cadhérine	Récepteurs aux ephrines	LRRTMs	Neurexines	Neuroligines
Structure	Type I	Type I	Récepteur tyrosine kinase	Type I	Type I	Type I
Domaine Extracellulaire	Ig	EC		LRR	LNS	AchE like
Partenaires extracellulaires	Homophile Hétérophile SynCAMs	Homophile N-Cadhérine	Hétérophile ephrines	Hétérophile Neurexines	Hétérophile Neuroligines LRRTMs	Hétérophile Neurexines
Partenaires intracellulaires/membranaires	CASK Protéines 4.1	β-Caténine NPRAP rAMPA	GRIP, PICK rNMDA	PSD-95	CASK	PSD-95, SSCAM Géphyrine
Phénotype surexpression	↗Densité de synapses ↗Fréquence mEPSCs	Dominant négatif (DN) ⇔ ↘ densité de synapses, ↘ PSD-95	↗ densité rAMPA de surface, ↗ rNMDA synaptique	LRRTM2 ↗ densité de synapses excitatrices	Expression dendritique ↘ densité de synapses	Nlg1,2,3 ⇔ ↗ Densité de synapses excitatrices et inhibitrices Nlg1 ↗ amplitude eEPSCs Nlg2 ↗ amplitude iEPSCs
Phénotype KO/KD	Non publié	KO, léthal, Cultures KO ⇔ ↘ densité synapses, ↘ PSD-95, ↘ Nlg1. SiRNA ⇔ ↘ Fréquence mEPSCs	siRNA ⇔ ↘ densité de synapses et d'épines, ↘ Fréquence mEPSCs KO ⇔ ↘ densité synapses excitatrices	shrRNA LRRTM2 ↘ densité de synapses excitatrices (culture), ↘ eEPSCs AMPA et NMDA (<i>in vivo</i>)	KO Nrxa, ↘ libération de neurotransmetteur ↘ densité de synapses inhibitrices.	SiRNA Nlg1,2,3 ⇔ ↘ densité de synapses Triple KO léthal. Nlg1 KO pas de différence dans densité des synapses, Nlg2 KO ↘ densité de synapses inhibitrices, ↘ courants inhibiteurs, spontanés et évoqués
Co-Cultures Billes	Différentiation pré-synapses fonctionnelles	Pas d'effet synaptogène.	éphrinesB/rEphB Différentiation pré-synaptique Co-agrégation rNMDA	LRRTM1/2 ⇔ différenciation pré-synapses fonctionnelles via l'interaction domaine LRR/Nrx	Différentiation post-synapses, excitatrice et inhibitrice (Nlg, LRRTM, PSD-95, Géphyrine, rNMDA, rAMPA, rGABA)	Différentiation pré-synapses fonctionnelles, via l'interaction domaine AchE/Nrx.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif, rappelant les structures, les partenaires protéiques, ainsi que les fonctions des molécules d'adhérence dans la synaptogenèse.

OBJECTIFS

Ainsi, plusieurs familles de molécules d'adhérence participent à la mise en place des synapses dans le SNC, depuis la formation des contacts initiaux jusqu'à la différenciation des compartiments pré- et post-synaptiques (Tableau 1). De par leurs interactions avec des partenaires extracellulaires et intracellulaires, les molécules d'adhérence participent à la régulation de la morphologie des synapses ou à la régulation de la fonction synaptique. L'existence d'un dialogue entre molécules d'adhérence, protéines d'échafaudage et récepteurs aux neurotransmetteurs montre l'importance de ces trois composants et renforce la nécessité de comprendre les phénomènes régulant leur mise en place. L'étape critique de différenciation et d'acquisition des propriétés de transmission (mise en place de l'échafaudage, des récepteurs aux neurotransmetteurs, spécification: inhibition vs excitation), est contrôlée notamment par les molécules d'adhérence. La coopération et la redondance de ces familles de protéines permettent d'assurer la mise en place des composants nécessaires à la fonction synaptique. Les complexes Nrj/Nlg jouent un rôle particulièrement intéressant dans la différenciation des compartiments pré- et post-synaptique mais aussi dans la spécification en synapses excitatrices ou inhibitrices. A l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires par lesquels les complexes Nrj/Nlg participent à la mise en place des contacts et au recrutement des composants synaptiques sont encore mal connus. Ainsi, je me suis intéressée aux cinétiques de mise en place des composants post-synaptiques (PSD-95, rAMPA) aux synapses glutamatergiques induites par les complexes Nrj1 β /Nlg1, aux mécanismes moléculaires de cet assemblage (compétition, diffusion/piégeage) et aux mécanismes de signalisation initiés par la liaison de Nrj1 β à la Nlg1.

RESULTATS

RESULTATS

Mon travail de thèse a consisté à essayer d'élucider le rôle des complexes Nr x 1 β /Nlg1 dans la formation et la fonction des post-synapses glutamatergiques. Pour cela, j'ai participé à 3 études, impliquant plusieurs collaborations au sein du laboratoire et dans lesquelles nous avons abordé différentes questions. Tout d'abord nous nous sommes intéressés à la mise en place de post-synapses fonctionnelles aux contacts Nr x 1 β /Nlg1 et au rôle de l'activité synaptique dans ces mécanismes. Dans la seconde étude, nous avons étudié l'existence d'un mécanisme de signalisation induit par la liaison de Nr x 1 β à la Nlg1 permettant d'activer sa fonction. Au cours de la troisième étude qui a représenté la plus grande partie de mon travail de thèse, je me suis intéressée aux mécanismes et aux acteurs moléculaires impliqués dans le recrutement des rAMPA aux contacts Nr x 1 β /Nlg1 et notamment au rôle du phénomène de diffusion/piégeage dans ce recrutement.

I. Article1 : Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroligin contacts

Martin Heine, Olivier Thoumine, Magali Mondin, Béatrice Tessier, Grégory Giannone et Daniel Choquet. (2008) PNAS 105(52):20947-52

A. Problématique

Les complexes Nr x /Nlg jouent un rôle important à la fois dans la fonction synaptique et dans la synaptogenèse. Les Nr x pré-synaptiques interagissent avec les Nlg post-synaptiques afin de former des complexes hétérophiles trans-synaptiques. Plus particulièrement, le complexe Nr x 1 β /Nlg1 participe au développement des synapses glutamatergiques. En effet, la surexpression de Nlg1 dans des neurones en culture induit une augmentation du nombre de synapses excitatrices. Au contraire, en bloquant de manière aigue, l'expression de Nlg1, il a été observé une diminution du nombre de synapses (Chih et al., 2005; Levinson et al., 2005). De plus, dans des modèles de co-culture, les axones au contact de cellules hétérologues exprimant Nlg1, développent des pré-synapses fonctionnelles (Scheiffele et al., 2000). De même, les dendrites de neurones au contact de cellules exprimant Nr x 1 β , ou de billes de latex recouvertes de Nr x 1 β développent des post-

synapses contenant PSD-95 et des rNMDA, mais pas de rAMPA (Graf et al., 2004; Nam and Chen, 2005). Dans ces modèles, les rAMPA ne s'accumulent aux contacts Nr x 1 β /Nlg1 qu'après activation des cultures avec du glutamate, ou en exprimant une forme constitutivement active de CAMKII (Ca²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II) (Nam and Chen, 2005). L'ensemble de ces études a montré que PSD-95 et les rNMDA sont recrutés en 24h de manière constitutive aux contacts Nr x 1 β /Nlg1, alors que le recrutement des rAMPA semble dépendant de l'activité. Nous avons donc voulu étudier de manière plus précise les cinétiques de recrutement des composants post-synaptiques aux contacts Nr x 1 β /Nlg1, ainsi que la fonctionnalité des héli post-synapses formées. Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle de l'activité synaptique et de la composition en sous-unité (GluA1 vs GluA2) dans le recrutement des rAMPA aux contacts Nr x 1 β /Nlg1.

B. Résultats majeurs

L'ensemble de cette étude a été réalisée en utilisant des billes de latex recouvertes de Nr x 1 β fusionnée avec le fragment constant (Fc) des immunoglobulines (Nr x 1 β -Fc), incubées avec des neurones d'hippocampe de rat en culture. Afin de distinguer facilement les contacts induits par les billes, des synapses endogènes, nous avons travaillé sur des neurones jeunes, entre 7 et 8 jours *in vitro*. Ce modèle nous a permis d'étudier le rôle spécifique du complexe Nr x 1 β /Nlg1 par rapport aux autres molécules d'adhérence impliquées dans la synaptogenèse et de pouvoir étudier les cinétiques de recrutement en maîtrisant le temps de contact entre Nr x 1 β et Nlg1. Dans un premier temps, en quantifiant l'accumulation de PSD-95 aux contacts billes/neurones, nous avons mis en évidence que PSD-95 est recrutée aux contacts Nr x 1 β /Nlg1 après 1 à 4 heures de formation des adhésions. L'utilisation d'imagerie calcique couplée au décageage de glutamate, ainsi que des expériences de iontophorèse de glutamate nous ont permis de montrer que des récepteurs du glutamate de type AMPA et NMDA endogènes fonctionnels sont recrutés aux contacts billes/neurones en 2 heures, indépendamment de l'activité synaptique. Enfin, en utilisant des sous-unités des rAMPA recombinantes étiquetées avec la GFP et des techniques d'immuno-marquage, nous avons montré un recrutement différentiel des sous-unités GluA1 et GluA2 aux contacts Nr x 1 β /Nlg1. En effet la sous-unité GluA2 est recrutée de manière constitutive, alors que le recrutement de la sous-unité GluA1 nécessite la présence d'activité synaptique.

Ces résultats vont à l'encontre d'études précédentes n'ayant pas observé de recrutement des rAMPA aux contacts Nr x 1 β /Nlg1 (Graf et al., 2004; Nam and Chen, 2005) et semblent aussi s'opposer au concept de la synapse silencieuse naissant sans rAMPA

(Gomperts et al., 1998; Petralia et al., 1999; Pickard et al., 2000). Cependant, l'utilisation des sous-unités recombinantes GluA1 et GluA2 et la comparaison de leur recrutement au niveau des contacts Nr1 β /Nlg1 entre billes et neurones, par rapport à celui observé aux synapses natives nous a permis d'interpréter ces différences.

Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroligin contacts

Martin Heine^{1,2}, Olivier Thoumine^{1,3}, Magali Mondin, Béatrice Tessier, Grégory Giannone, and Daniel Choquet³

Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5091, Physiologie Cellulaire de la Synapse, Institut François Magendie, Université Bordeaux 2, 33077 Bordeaux, France

Edited by Richard L. Huganir, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, and approved November 10, 2008
(received for review May 5, 2008)

A combination of cell culture and animal studies has recently shown that adhesion between neurexins and neuroligins played important roles in synapse initiation, maturation, and function. Binding of neurexin-1 β to neuroligin-1 triggers the postsynaptic clustering of the scaffold postsynaptic density protein 95, but the composition and timing of accumulation of glutamate receptors at those nascent contacts remain unclear. Using glutamate iontophoresis and patch-clamp recordings, we identified functional AMPA receptors (AMPA) and NMDA receptors at postsynaptic density protein 95 clusters induced by neurexin-1 β coated microspheres on primary hippocampal neurons. The recruitment of AMPARs occurred as early as 2 h after initial contact, and was not blocked by TTX/2-amino-5-phosphovaleric acid (APV) treatment. The differential recruitment of recombinant subunits GluR1 and GluR2, as well as the absence of rectification in voltage/current curves, further indicate that neurexin/neuroligin contacts primarily recruit GluR2-containing AMPARs. Finally, by using glutamate uncaging and calcium imaging, we show that AMPARs participate in calcium entry at neurexin-1 β induced post-synapses, most likely through the activation of voltage-gated calcium channels. Such rapid and activity-independent accumulation of functional AMPARs at neurexin-1 β -induced postsynapses points to a new role of AMPARs in synaptogenesis.

glutamate uncaging | glutamate receptors |
iontophoresis | microspheres | postsynaptic density protein 95

The neurexin-neuroligin adhesion complex plays a critical role in brain development and function (1, 2). Neurexins are localized mainly on axons and can form transsynaptic calcium-dependent heterophilic adhesion with neuroligins situated on dendrites (3). Neurexin binds presynaptic adaptors such as Ca²⁺/calmodulin activated serine-threonine kinase (4), whereas the neuroligin intracellular tail binds the scaffolding postsynaptic density protein 95 (PSD-95) (5, 6). Pathological mutations in neuroligin genes are related to autism and X-linked mental retardation in humans (7–9). In addition, neuroligin-knockout mice die shortly after birth from respiratory failure as a result of reduced network activity in brainstem centers that control respiration (10), and show selectively altered synaptic responses (11). Conversely, studies using α -neurexin-knockout mice demonstrate an essential role of α -neurexins in coupling Ca²⁺ channels to the presynaptic machinery (12) and in maintaining normal postsynaptic NMDA receptor (NMDAR) function (13).

A major role of neurexin-neuroligin adhesion in regulating synaptogenesis has emerged recently from culture studies (14). For example, over-expressing neuroligins in neurons increases synapse density (15), whereas silencing neuroligins induces the opposite (16). Furthermore, primary neurons form functional presynaptic terminals onto HEK cells expressing neuroligin (17–19) and develop postsynaptic scaffolds on fibroblasts expressing neurexin (20). These effects can be mimicked by using microspheres coated with purified neuroligin (21) or neurexin

(20), respectively. However, the kinetics with which newly formed neurexin-induced postsynaptic contacts recruit detectable functional glutamate receptors is unknown. Clusters of neuroligin-1 (Nlg1) and PSD-95 induced by neurexin-1 β after a 24 h contact duration positively immunostain for NMDARs, but not for AMPA receptors (AMPA) (20). Furthermore, the recruitment of AMPARs at neurexin/neuroligin contacts is promoted by glutamate application or constitutively active calmodulin-activated kinase II (CamKII) (22). This differential recruitment of NMDARs and AMPARs is puzzling, as AMPARs could in theory be recruited to the PSD-95 scaffold assembled by neuroligins through binding of their auxiliary subunit stargazin to PSD-95 (23, 24).

An essential question thus remains of whether functional AMPARs are present early on at nascent neurexin-induced postsynaptic differentiations, independently of NMDAR activation, in which case AMPAR activity could play unsuspected roles in regulating synaptogenesis. To address this issue, we induced neuroligin-selective postsynaptic contacts on primary neurons by using neurexin-1 β -coated microspheres, independently of pre-existing synapses, and characterized their functional properties using local glutamate delivery combined with calcium imaging and electrophysiology.

Results

Neurexin-1 β -Coated Beads Induce Nlg1-Selective Postsynaptic Differentiation. To induce selective neurexin-neuroligin contacts, primary rat hippocampal neurons at the onset of synaptogenesis [7–8 days in vitro (DIV)] were incubated with microspheres coated with purified recombinant neurexin1 β (Nrx1 β -Fc). Nrx1 β -Fc beads bound strongly to dendrites and cell bodies, in contrast to control beads coated with Fc alone (Fig. 1*A* and *C*). A treatment with 5 mM EGTA reduced binding by 50% (Fig. 1*C*), suggesting that Nrx1 β -Fc ligands interacted in a calcium-dependent manner with endogenous neuroligins on the cell surface (25), but also revealing residual adhesion to unidentified molecules. Furthermore, because Nrx1 β can bind equally well to neuroligins 1 and 2, the latter being implicated in inhibitory synapse formation (16, 20, 26), we decided thereafter to transfect Nlg1 to selectively drive the formation of excitatory postsyn-

Author contributions: M.H., O.T., M.M., G.G., and D.C. designed research; M.H., O.T., M.M., and B.T. performed research; B.T. contributed new reagents/analytic tools; M.H., O.T., and M.M. analyzed data; and M.H., O.T., G.G., and D.C. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹M.H. and O.T. contributed equally to this work.

²Present address: Leibniz Institut für Neurobiologie, Magdeburg 39118, Germany.

³To whom correspondence may be addressed. E-mail: othoumin@u-bordeaux2.fr or dchoquet@u-bordeaux2.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0804007106/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

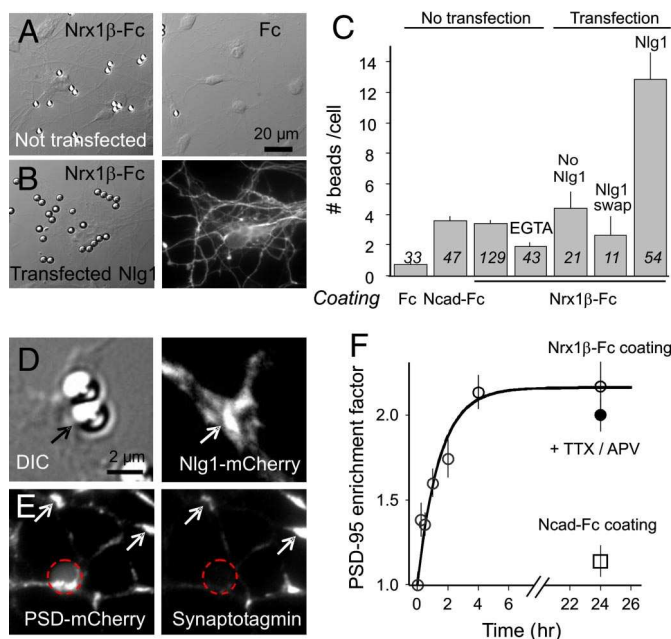


Fig. 1. Binding of β -neurexin-coated beads and recruitment of postsynaptic proteins is neuroligin-specific. (A) Rat hippocampal neurons at 7 or 8 DIV were incubated with 4- μ m microspheres coated with Nr1 β -Fc, N-cadherin-Fc (not shown), or human Fc for 1 h, then rinsed and fixed at given time intervals. Some cultures were co-transfected with PSD-95-GFP and WT Nlg1 (B) or an Nlg1 construct unable to interact with neurexin (Nlg1-SWAP). (C) Number of beads bound per cell in each condition. Data are presented as mean $\pm$ SEM and the number of beads examined is given in italics. (D) Example of recruitment of Nlg1-mCherry (arrows) at an Nr1 β -Fc bead. The enrichment factor (bead vs. neurite fluorescence levels) for Nlg1-mCherry was 1.71 ± 0.08 ($n = 18$ beads). (E) Example of recruitment of PSD-mCherry; position of the bead is represented by a dashed circle. Immuno-stained synaptotagmin puncta co-localize with spontaneous PSD-95 clusters (arrows), but not with PSD-95-mCherry accumulated at Nr1 β -Fc beads. Neuronal areas covered by synapses were $7.6\% \pm 1.0\%$ ($n = 13$) outside beads and only $4.5\% \pm 1.3\%$ ($n = 48$) at Nr1 β -Fc beads, quantitatively showing that Nr1 β -Fc beads do not recruit native synapses. (F) Time course of PSD-95-GFP accumulation at Nr1 β -Fc beads, the fit being a first-order exponential function.

apses. Neurons transfected with Nlg1 bound three times more Nr1 β -Fc-coated beads than neurons transfected with a neuroligin construct in which the ectodomain was replaced by acetylcholine esterase (Nlg1-SWAP) or non-transfected counterparts (Fig. 1C), indicating a functional Nr1 β /Nlg1 interaction. In addition, Nlg1 and PSD-95 accumulated at Nr1 β -Fc beads in large crescent-like patterns (Fig. 1D and E), distinct from small endogenous synaptic clusters, which are rather sparse at this developmental stage (27). PSD-95 was recruited by Nr1 β -Fc beads over a time course of 4 h (Fig. 1F). Control N-cadherin-Fc coated beads bound as well as Nr1 β -Fc beads (Fig. 1C) but did not recruit PSD-95 (Fig. 1F), demonstrating the specificity of the assay and confirming the inability of N-cadherin to induce synapse formation (17, 20). Thus, Nr1 β -Fc beads induced neuroligin-specific postsynaptic differentiation.

Calcium Transients Induced by Glutamate Un-Caging at Nr1 β -Fc Beads. To test for the presence of functional glutamate receptors at Nr1 β -Fc microsphere contacts, we first used a global approach based on glutamate photo-release and calcium imaging. Cells were transfected with PSD-mCherry as a live marker of postsynaptic differentiation, and loaded with the fluorescent calcium indicator Fluo-4. The observation medium contained 4-methoxy-7-nitroindolyl-caged l-glutamate, which caused no apparent excitotoxicity (28, 29), together with glycine and no

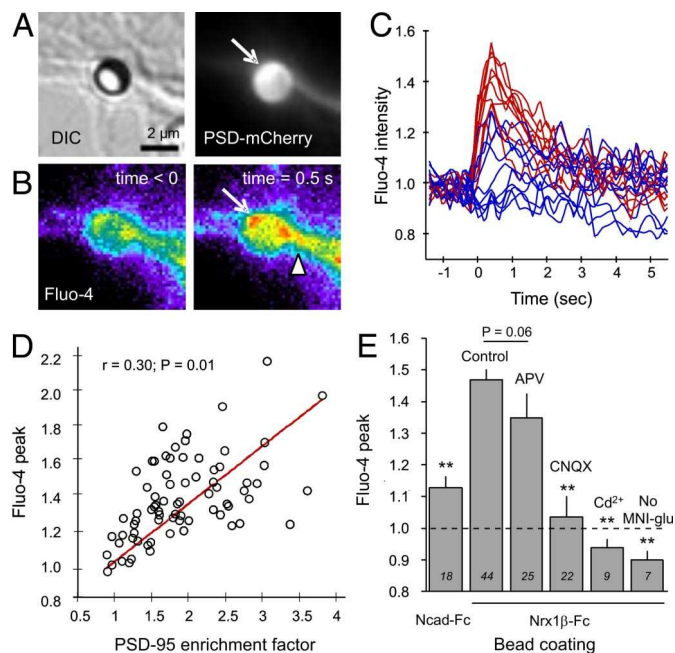


Fig. 2. Glutamate un-caging induces calcium transients at Nr1 β -Fc beads. Neurons co-transfected with Nlg1 and PSD-95-mCherry were incubated overnight with microspheres coated with Nr1 β -Fc. (A) Example of a Nr1 β -Fc bead having recruited PSD-95-mCherry. (B) Corresponding Fluo-4 signal increase upon photo-release of glutamate at time 0. (C) Representative examples of the normalized Fluo-4 fluorescence level over time for 20 beads. Traces in red correspond to beads showing significant PSD-95 recruitment, and those in blue correspond to beads with minimal PSD-95 recruitment. (D) Relationship between PSD-95 recruitment level and the peak in Fluo-4 signal elicited upon glutamate un-caging. (E) Effect of various treatments on the calcium response, presented as mean $\pm$ SEM, where the number of beads tested is indicated in italics. The dashed line represents no change in Fluo-4 level, and responses below this baseline indicate Fluo-4 photo-bleaching. Data were analyzed by one-way ANOVA and compared by Dunnett test to the control Nr1 β -Fc bead condition (** $P < 0.01$).

magnesium to favor the opening of NMDAR channels. Upon un-caging of glutamate in the vicinity of microspheres, we recorded significant Fluo-4 fluorescence increase at microspheres that had recruited PSD-mCherry (Fig. 2A and B). Calcium signals originated from the bead contact, sometimes precisely at locations showing PSD-95 accumulation, then rapidly diffused into the dendrite (Fig. 2B). There was no such increase when 4-methoxy-7-nitroindolyl-caged l-glutamate was omitted from the extracellular medium (Fig. 2E), indicating a specific response to glutamate release and not photo-damage. On average, the Fluo-4 level increased by 45% in 0.5 sec, then decreased to the baseline level with a characteristic decay time of 2 sec (Fig. 2C and E). In contrast, beads showing weak or no PSD-95-mCherry recruitment induced only small calcium transients (Fig. 2C and D). Overall, the glutamate-induced calcium increase correlated well with the level of PSD-95 enrichment at bead contacts (Fig. 2D), suggesting that functional glutamate receptors were recruited via PSD-95 molecules clustered at neurexin/neuroligin contacts. Control beads coated with N-cadherin-Fc, or neurite areas without beads, elicited only minor calcium responses (Fig. 2E), probably because of the presence of sparse endogenous synapses.

To identify which glutamate receptor subtypes were recruited at Nr1 β -induced contacts, we used a pharmacological approach. Surprisingly, treatment with the NMDAR antagonist 2-amino-5-phosphovaleric acid (APV) caused only a 20% reduction in the calcium response (Fig. 2E). This indicated that NMDARs were

present at $\text{Nr}1\beta$ -Fc microsphere contacts, but were not the main mediator of calcium entry. In contrast, treatment with the AMPAR antagonist CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) inhibited the calcium response by 90% (Fig. 2E), suggesting the presence of functional AMPARs at $\text{Nr}1\beta$ -Fc beads. The majority of AMPARs in hippocampal neurons contain the GluR2-subunit, which is weakly permeable to calcium (30). Thus, we hypothesized that AMPARs caused membrane depolarization which, in turn, led to activation of voltage-gated calcium channels located nearby in the dendrite (31). Indeed, treatment with cadmium, a broad-spectrum blocker of calcium-permeable channels including NMDARs (32), completely abolished Fluo-4 transients (Fig. 2E).

Patch-Clamp Currents Evoked by Iontophoretic Glutamate Application at $\text{Nr}1\beta$ -Fc Beads Reveal Functional AMPARs and NMDARs. To directly identify the presence of functional NMDARs and AMPARs at neuroligin/neurexin contacts and characterize their kinetics of recruitment compared with native synapses, we performed whole-cell patch-clamp recordings together with local glutamate application at $\text{Nr}1\beta$ -Fc beads by using iontophoresis (Fig. 3A). Cells were transfected with PSD-95-GFP to visualize postsynaptic differentiation (Fig. 3B). Beads displaying PSD-95-GFP accumulation usually exhibited the strongest currents (Fig. 3C). On average, $\text{Nr}1\beta$ -Fc beads incubated for 24 h had current amplitudes of 256 ± 40 pA ($n = 25$ beads), more than twofold that of endogenous PSD-95 clusters (120 ± 18 pA, $n = 22$) or beads incubated for only 2 to 4 h (105 ± 24 pA, $n = 11$). Control neurite regions with homogeneous PSD-95 distribution, as well as N-cadherin-Fc-coated beads, produced much smaller currents, i.e., 19 ± 7 pA ($n = 6$) and 13 ± 4 pA ($n = 13$), respectively. The increase in current amplitude from 2–4 h to 24 h paralleled the time course of PSD-95 accumulation (Fig. 1F), further indicating that the presence of PSD-95 and functional glutamate receptors were associated.

The shape of the currents at $\text{Nr}1\beta$ -Fc beads indicated both a fast AMPAR component and a slow NMDAR component. Indeed, the slow phase disappeared in the presence of the NMDAR antagonist APV, and the remaining fast response was blocked by the AMPAR antagonist CNQX (Fig. 3D). The fact that the AMPAR and NMDAR components could easily be distinguished on a time scale basis allowed the systematic computation of the relative AMPAR charge by using bi-exponential fitting of the current/time curves obtained in the absence of pharmacological treatment. AMPARs mediated 18% of the total charge transfer 2 to 4 h after initial bead contact, and after 24 h this proportion reached 30% (Fig. 3F), approximately that of established synapses (Fig. 3E). It is unlikely that the progressive increase of AMPAR charge at $\text{Nr}1\beta$ -Fc beads can be explained by a parallel replacement of NR1/NR2B by NR1/NR2A heteromers with faster desensitization kinetics, which could lead to an overestimation of the AMPAR component. Indeed, the switch in NMDAR subunit composition linked to synapse maturation occurs on a longer time course, typically from 6 to 15 DIV (33). Furthermore, the slower rate constant representing NMDARs did not differ significantly between the 2–4 h and 24 h time points, i.e., 166 ± 32 ms ($n = 8$) versus 197 ± 29 ms ($n = 12$), respectively.

As it was previously suggested that the synapse promoting effect of Ngl1 was dependent on NMDAR activity (22), we treated neurons with TTX to suppress action potential driven network activity and APV to block NMDAR function during the 24-h bead contact. In these conditions, the recruitment of PSD-95 (Fig. 1F) as well as the fast AMPAR current component were still present (Fig. 3F), demonstrating that the accumulation of functional postsynaptic AMPARs does not require sustained neuronal activity. TTX/APV treatment instead caused an increase in AMPAR charge both at $\text{Nr}1\beta$ beads (Fig. 3F) and synapses labeled by PSD-95 clusters (Fig. 3E), as well as a

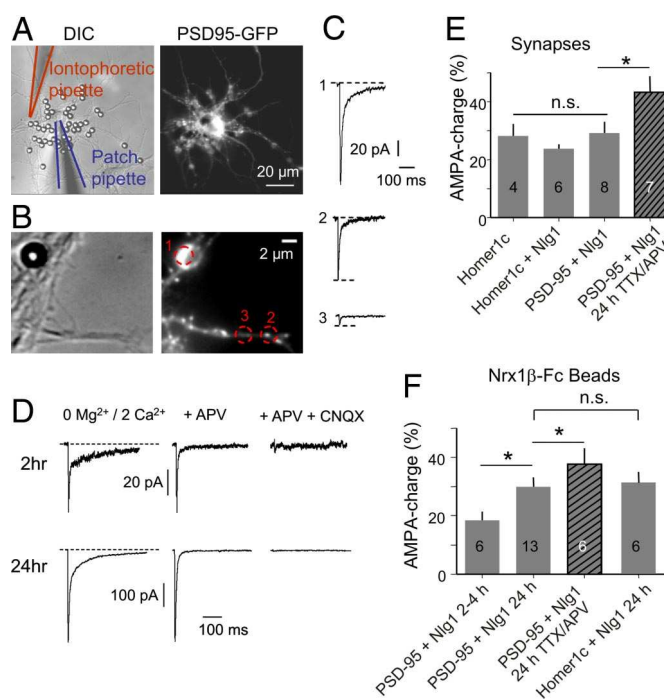


Fig. 3. Characterization of glutamate receptor composition at $\text{Nr}1\beta$ -Fc beads by glutamate iontophoresis and patch-clamp experiment. Neurons co-transfected with Nlg1 and PSD-95-GFP (or Homer1c-GFP) were left in contact with $\text{Nr}1\beta$ -Fc-coated microspheres for 2–4 h or 24 h, then subjected to whole-cell electrophysiology in the presence of TTX to prevent action potentials and 0 mM Mg to remove the NMDAR block. In some experiments, cells were treated with TTX and APV throughout the bead incubation (24 h). (A) Digital image correlation showing patch-clamp and iontophoresis pipettes, with the corresponding PSD-95-GFP fluorescence. Note that many beads bind to the transfected cell. (B) Magnified view of accumulation of PSD-95-GFP surrounding a $\text{Nr}1\beta$ -Fc bead and nearby synaptic clusters. (C) Examples of currents elicited upon glutamate application at $\text{Nr}1\beta$ -Fc beads (trace 1), endogenous PSD-95-GFP clusters (trace 2), or neurite region without PSD-95 accumulation (trace 3), with the membrane potential being clamped at -60 mV. (D) Effect of NMDAR and AMPAR antagonists (CNQX and APV, respectively) on the electrophysiological response of $\beta\text{Nr}1\beta$ -Fc bead contacts at two contact durations. (E and F) By fitting the curves using a bi-exponential function with two separate time constants, the relative charge carried by AMPARs was computed for various conditions. (E) Synapses identified by PSD-95-GFP or Homer1c-GFP positive puncta. (F) $\text{Nr}1\beta$ -Fc beads displaying recruitment of PSD-95-GFP or Homer1c-GFP. Data were analyzed by one-way ANOVA and compared two-by-two by Tukey test (*, $P < 0.05$; ns, not significant).

stronger immunostaining of endogenous AMPAR at PSD-95 clusters [supporting information (SI) Fig. S1]. These events are most likely linked to an homeostatic increase in AMPAR surface expression (34, 35).

As PSD-95 over-expression is known to drive GluR1 to nascent synapses and increase AMPAR synaptic currents (23, 36), whereas PSD-95 KO decreases AMPAR synaptic transmission by increasing the number of silent synapses (37), we performed control experiments using Homer1c, a non-perturbing postsynaptic marker (38). The AMPAR charge measured at synaptic clusters did not differ significantly between neurons co-transfected with Nlg1 and either PSD-95-GFP or Homer1c-GFP (Fig. 3E). Moreover, Homer1c was recruited to $\text{Nr}1\beta$ -Fc beads, albeit to a lesser degree than PSD-95, and those beads still exhibited significant AMPAR currents (Fig. 3F). This shows that, in our conditions, AMPARs can be recruited at $\text{Nr}1\beta$ -induced contacts under endogenous PSD-95 levels. AMPAR recruitment was also not an artifact of Nlg1 over-expression, as Nlg1 transfection per se does not increase

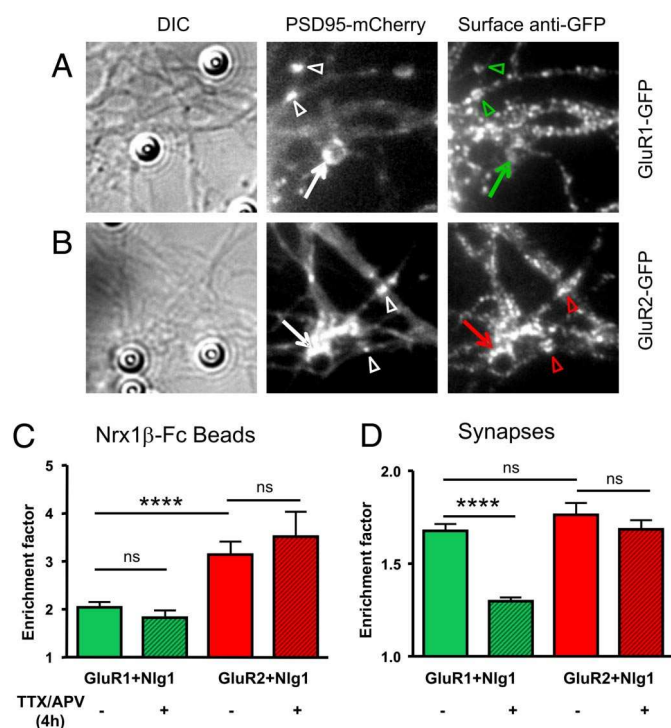


Fig. 4. Recruitment of recombinant AMPAR subunits at Nr1β-Fc beads and synapses. Neurons were transfected with Nlg1 and PSD-95-mCherry plus either GluR1-GFP or GluR2-GFP, incubated for 4 h with Nr1β-Fc beads with or without TTX/APV, then processed for live anti-GFP staining. Examples of recombinant GluR1 (A) or GluR2 (B) stainings at Nr1β-Fc beads (arrows) and nearby endogenous synapses, as identified by PSD-95-mCherry clusters (arrowheads). Quantification of the enrichment factor, i.e., the fluorescence signal on a bead (C) or synapse (D) divided by the neurite level, for all conditions. The number of beads or clusters quantified is given in each column. Data were analyzed by one-way ANOVA and compared by Tukey test (***, $P < 0.0002$).

AMPA receptor abundance at synapses, as assessed from the amplitude of miniature AMPA currents (15). Accordingly, we found that the AMPAR charge at synapses labeled with Homer 1c-GFP was not changed upon additional expression of Nlg1 (Fig. 3E). The absence of rectification at positive membrane potentials in the current/voltage curves indicates that AMPARs present at Nr1β-Fc beads were mostly composed of GluR2-containing heteromers (Fig. S2). Finally, we performed live AMPAR surface staining and detected strong labeling at Nr1β-Fc beads, but not at N-cadherin-Fc-coated beads (Fig. S3), confirming the specific presence of AMPARs at Nr1β/Nlg1 contacts by immunohistochemistry.

Differential Recruitment of GluR1 and GluR2 AMPAR Subunits at Nr1β-Fc Beads. To examine in more detail the subunit specificity of AMPAR recruitment at Nr1β/Nlg1 contacts, we co-transfected neurons with Nlg1 together with recombinant GFP-tagged GluR1 or GluR2 subunits. The recruitment of membrane-associated AMPARs at Nr1β-Fc beads bound for 4 h was detected by live surface staining with anti-GFP antibodies (Fig. 4A and B). In half the experiments, PSD-mCherry was co-transfected, whereas in the other half, endogenous PSD-95 was immunostained. The enrichment level of endogenous PSD-95 (2.6 ± 0.1 , $n = 106$) was similar to that of PSD-mCherry (2.6 ± 0.2 , $n = 68$), and there was little effect of exogenous PSD-mCherry expression on the recruitment of either GluR1 or GluR2 (not shown), so we pooled the data from both conditions (Fig. 4). The striking result was that GluR2 was strongly recruited at Nr1β-Fc beads (Fig. 4B and C), whereas GluR1 was

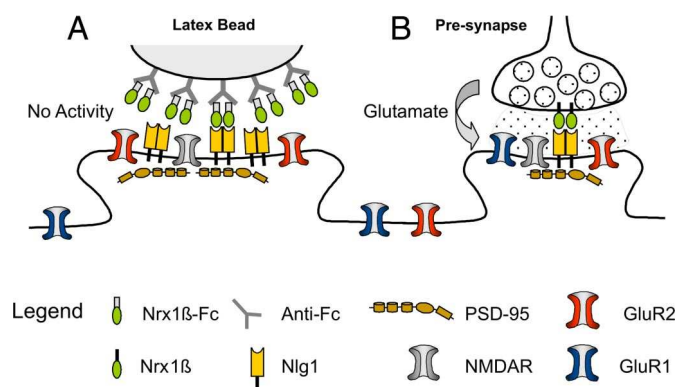


Fig. 5. Comparison of postsynapses triggered by Nr1β to endogenous synapses. (A) Nr1β-Fc beads not exposed to chronic glutamate release induce the clustering of PSD-95, NMDAR, and GluR2-containing AMPAR, but exclude GluR1-lacking AMPAR receptors. (B) In contrast, synapses recruit GluR1-containing AMPAR in an activity-dependent manner.

almost absent (Fig. 4A and C). The recruitment levels were not affected by a 4-h treatment with APV/TTX during bead incubation (Fig. 4C). By comparison, GluR1 and GluR2 were enriched to similar levels at endogenous synapses identified by PSD-mCherry fluorescence (Fig. 4A, B and D). The TTX/APV treatment reduced the synaptic GluR1 level, leaving GluR2 staining intact (Fig. 4D). Thus, GluR1 is recruited at synaptic contacts in an activity-dependent manner, and absent from Nr1β-induced postsynapses, which are not linked to presynaptic activity; whereas GluR2 is recruited both at Nr1β/Nlg1 contacts and nascent synapses in a rather constitutive fashion (Fig. 5).

Discussion

Both NMDA and AMPA Receptors Are Recruited at Neurexin/Neurotrophin Contacts. We showed here, by using a minimal constituent system, that mobilizing Nlg1 molecules by Nr1β binding drives functional postsynapse assembly, characterized by calcium responses and the rapid recruitment of NMDARs and AMPARs, closely following the appearance of PSD-95. Note that this is basically the reverse of previous experiments that used HEK cells co-transfected with Nlg1 and NMDAR (18) or AMPAR (19) subunits. There, the patch-clamp currents recorded in HEK cells revealed the presence of glutamate release at presynaptic terminals formed by axons of co-cultured neurons onto the heterologous cells. Conversely, we demonstrate here the spontaneous assembly of functional glutamate receptors at Nr1β-induced postsynapses in dendrites, in the absence of presynapses. Advantages of the microsphere assay are that we could isolate selective effects of the neurexin/neurotrophin interaction independently of other synaptogenic proteins such as SynCAM (19), and precisely control the initial encounter time. One drawback was that we had to transfect Nlg1 to ensure a specific Nr1β/Nlg1 interaction, given the limited effects of Nr1β-Fc beads on un-transfected cells. This may originate from the bead coating protocol, which yielded a fairly low density of immobile Nr1β ligands (approximately 500 dimers/ μm^2) (39). As a result, the local number of endogenous interacting proteins might be too small to trigger postsynapse differentiation, in contrast with native synapses in which Nr1β/Nlg1 bonds might reach higher concentrations because molecules can slide laterally in the plasma membrane and cluster more efficiently. For example, presynaptic differentiation was obtained only with lipid-coated microspheres bearing freely diffusing GPI-anchored Nlg1 (21). Nevertheless, as pointed out earlier, Nlg1 over-expression does not seem to affect the postsynaptic targeting of AMPARs.

may contribute to the stabilization and plastic properties of these contacts, and therefore play a crucial role right at the beginning of the establishment of a new synapse.

Methods

Briefly, primary rat hippocampal neurons were transfected at 4 or 5 DIV with various combinations of the following plasmids: Nlg1-HA, Nlg1-mCherry, PSD-95-GFP, PSD-95 mCherry, Homer1c-GFP, GluR1-GFP, and GluR2-GFP. Neurons at 7 or 8 DIV were incubated with microspheres coated with Nr1 β -Fc or N-cadherin-Fc as a control, for times ranging from 2 h to 24 h. Three types of experiments were carried out: (i) immuno-cytochemistry to detect enrichment levels of Nlg1, PSD-95, or GluRs at bead contacts or synapses; (ii) glutamate uncaging and calcium imaging using a bi-photon confocal microscope; and

(iii) glutamate iontophoresis and patch-clamp recordings. All protocols are described thoroughly in *SI Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank C. Breillat, D. Bouchet, and A. Frouin for molecular biology and neuronal cultures; P. Gonzales for coverslip preparation; X. Fournet for technical assistance; C. Poujol and P. Legros (Plateforme d'Imagerie Cellulaire de l'Institut des Neurosciences, Bordeaux, France) for image analysis and bi-photon imaging; M. Sainlos for the gift of PSD-mCherry; P. Pinheiro for help with shutter synchronization; C. Blanchet, N. Rebola, A. Barberis, P. Opazo, Z. Szabo, and R. Huguier for helpful discussions; E. Gundelfinger for support during complementary experiments; and L. Groc for critical reading of the manuscript. We acknowledge financial support from the French Ministry of Research, CNRS, Agence Nationale pour la Recherche (grant "Neurologation"), Conseil Régional d'Aquitaine, Ministère de la Recherche, Fondation pour la Recherche Médicale, Association Française contre les Myopathies, and European Community grant CT-2005-005320 (GRIPPANT).

- Missler M, Sudhof TC (1998) Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet* 14:20–26.
- Craig AM, Kang Y (2007) Neurexin-neurologin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 17:43–52.
- Levinson JN, El-Husseini A (2007) A crystal-clear interaction: relating neurologin/neurexin complex structure to function at the synapse. *Neuron* 56:937–939.
- Missler M, Fernandez-Chacon R, Sudhof TC (1998) The making of neurexins. *J Neurochem* 71:1339–1347.
- Ichtchenko K, et al. (1995) Neurologin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81:435–443.
- Irie M, et al. (1997) Binding of neurologins to PSD-95. *Science* 277:1511–1515.
- Jamain S, et al. (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neurologins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34:27–29.
- Laumonnier F, et al. (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neurologin family. *Am J Hum Genet* 74:552–557.
- Tabuchi K, et al. (2007) A neurologin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318:71–76.
- Varoqueaux F, et al. (2006) Neurologins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51:741–754.
- Chubykin AA, et al. (2007) Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neurologin-1 versus neurologin-2. *Neuron* 54:919–931.
- Missler M, et al. (2003) Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423:939–948.
- Kattenstroth G, et al. (2004) Postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function requires alpha-neurexins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2607–2612.
- Craig AM, Graf ER, Linhoff MW (2006) How to build a central synapse: clues from cell culture. *Trends Neurosci* 29:8–20.
- Levinson JN, et al. (2005) Neurologins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neurologin-induced synaptic specificity. *J Biol Chem* 280:17312–17319.
- Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neurologins. *Science* 307:1324–1328.
- Scheiffele P, et al. (2000) Neurologin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657–669.
- Fu Z, Washbourne P, Ortinski P, Vicini S (2003) Functional excitatory synapses in HEK293 cells expressing neurologin and glutamate receptors. *J Neurophysiol* 90:3950–3957.
- Sara Y, et al. (2005) Selective capability of SynCAM and neurologin for functional synapse assembly. *J Neurosci* 25:260–270.
- Graf ER, et al. (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neurologins. *Cell* 119:1013–1026.
- Dean C, et al. (2003) Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 6:708–716.
- Nam CI, Chen L (2005) Postsynaptic assembly induced by neurexin-neurologin interaction and neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6137–6142.
- Schnell E, et al. (2002) Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13902–13907.
- Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The interaction between stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53:719–734.
- Comoletti D, et al. (2003) Characterization of the interaction of a recombinant soluble neurologin-1 with neurexin-1beta. *J Biol Chem* 278:50497–50505.
- Varoqueaux F, Jamain S, Brose N (2004) Neurologin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol* 83:449–456.
- Cottrell JR, Dube GR, Egles C, Liu G (2000) Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 84:1573–1587.
- Matsuzaki M, et al. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4:1086–1092.
- Sobczyk A, Scheuss V, Svoboda K (2005) NMDA receptor subunit-dependent [Ca²⁺] signaling in individual hippocampal dendritic spines. *J Neurosci* 25:6037–6046.
- Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M (2006) Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 16:288–297.
- Magee JC, Johnston D (1995) Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science* 268:301–304.
- Mayer ML, Vyklícký L, Jr., Westbrook GL (1989) Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurones. *J Physiol* 415:329–350.
- Groc L, et al. (2006) NMDA receptor surface mobility depends on NR2A–2B subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18769–18774.
- Sutton MA, et al. (2006) Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell* 125:785–799.
- Watt AJ, et al. (2000) Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses. *Neuron* 26:659–670.
- El-Husseini AE, et al. (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290:1364–1368.
- Beique JC, et al. (2006) Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19535–19540.
- Usui S, et al. (2003) Synaptic targeting of PSD-Zip45 (Homer 1c) and its involvement in the synaptic accumulation of F-actin. *J Biol Chem* 278:10619–10628.
- Thoumine O, Lambert M, Mege RM, Choquet D (2006) Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Mol Biol Cell* 17:862–875.
- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* 27:57–69.
- Song JY, Ichtchenko K, Sudhof TC, Brose N (1999) Neurologin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1100–1105.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157–2163.
- Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R (2001) Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105:331–343.
- Ehlers MD, et al. (2007) Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity. *Neuron* 54:447–460.
- Fischer W, et al. (2002) AMPA-induced Ca²⁺ influx in cultured rat cortical nonpyramidal neurones: pharmacological characterization using fura-2 microfluorimetry. *Eur J Pharmacol* 438:53–62.
- Hall BJ, Ghosh A (2008) Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses. *Trends Neurosci* 31:82–89.
- Futai K, et al. (2007) Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neurologin. *Nat Neurosci* 10:186–195.
- Chen L, et al. (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408:936–943.
- Barry MF, Ziff EB (2002) Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol* 12:279–286.
- Mateos JM, et al. (2007) Synaptic modifications at the CA3-CA1 synapse after chronic AMPA receptor blockade in rat hippocampal slices. *J Physiol* 581:129–138.

Supporting Information

Heine et al. 10.1073/pnas.0804007106

SI Methods

Molecular Constructs and Reagents. To make PSD-95-GFP and -mCherry constructs, the mCherry gene obtained from R. Tsien (University of California, San Diego, CA) was amplified by PCR with primers containing AgeI/NheI sites. It was then inserted at position +253 aa in the PSD-95 pcDNA from S. Okabe (Tokyo University, Tokyo, Japan) (1), which was also modified to contain AgeI/NheI sites at the respective positions. To make the PSD-95-GFP construct, mCherry was replaced at these positions by the GFP sequence. Homer-1c-GFP was also a gift from S. Okabe. GluR1-GFP and GluR2-GFP constructs were described previously (2).

The neuroligin constructs Nlg1 and Nlg1-SWAP in which the extracellular domain was replaced by acetylcholine esterase were gifts from P. Scheiffele (Columbia University, New York, NY) (3). To make Nlg1-mCherry, Nlg1 was sub-cloned into pcDNA between HindIII and NotI sites, and the mCherry cassette was inserted at position -20 aa from the stop codon, following the same strategy as for PSD-95-mCherry.

The pcDNA neomycin β Neurexin184-humanFc (Nrx1 β -Fc) plasmid, also received from P. Scheiffele (4), was sub-cloned between sites HindIII/XhoI in pcDNAhygro(+) vector to select a stable hygromycin-resistant HEK cell line producing Nrx1 β -Fc. Recombinant Nrx1 β -Fc protein was expressed in HEK cells and purified from conditioned medium as described (5). N-cadherin fused to human Fc (Ncad-Fc) described earlier (6) was a gift of M. Lambert and R.M. Mège (INSERM, Paris, France). Globulin-free BSA and other chemicals were purchased from Sigma. Pharmacological compounds (CNQX, APV, TTX, and bicuculline) were from Tocris.

Cell Culture and Transfection. Dissociated hippocampal neurons from E18 rat embryos were plated on 18-mm polylysine-coated glass coverslips at a density of 10^4 cells/cm² in MEM containing 10% horse serum (Gibco) for 3 h, then cultured in Neurobasal medium supplemented with B27 on a layer of glial cells (7). Neurons were transfected at 4 or 5 DIV using Effecten (Qiagen) and processed 2 to 3 days later.

Microsphere Coating. Fifty microliters of 4- μ m tosyl paramagnetic microspheres (Dynal) or 10 μ L of 2- μ m latex (Interfacial Dynamics) were incubated overnight at 4 °C with 20 μ g goat anti-human Fc antibody (Jackson ImmunoResearch), followed by 3 h incubation with 5 μ g purified Nrx1 β -Fc, N-cadherin-Fc, or human Fc (Jackson ImmunoResearch). This procedure led to an approximate coating density of 500 molecules/ μ m² (8). Each coverslip carrying neurons was incubated with 5 μ L of bead solution mixed to 1 mL culture medium containing 1% BSA for varying time durations.

Immunocytochemistry. To quantify PSD-95 recruitment, cells co-transfected with Nlg1 and PSD-95-GFP and carrying Nrx1 β -Fc or N-cadherin-Fc beads were fixed for 10 min in warm 4% paraformaldehyde/4% sucrose in PBS solution, and remaining active sites were saturated with 50 mM NH₄Cl in PBS solution for 15 min. Cells were permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS solution for 5 min, and non-specific binding sites were blocked with 1% BSA in PBS solution for 30 min. For the time course of PSD-95 accumulation, cells were incubated in PBS-BSA with 1:1,000 rabbit anti-GFP (Invitrogen) for 1 h, rinsed and incubated with 1:1,000 Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit antibody (2 mg/mL; Molecular Probes) for 30 min, and

mounted in Vectashield (Vector Laboratories). For visualization of presynapses, neurons co-transfected with Nlg1 and PSD-95-mCherry were treated as described with 1:400 primary rabbit anti-synaptotagmin antibody (a gift of C. Dotti, Leuven University, Leuven, Belgium). For assessment of endogenous AMPAR recruitment, neurons co-transfected with Nlg1 and PSD-95-mCherry were incubated at 37 °C for 20 min with 1:100 polyclonal rabbit anti-GluR1 antibody (a gift of R. Huganir, Johns Hopkins University, Baltimore, MD), then rinsed, fixed, and stained without permeabilization with 1:500 Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit antibody. For the live staining of recombinant AMPAR subunits GluR1-GFP and GluR2-GFP, neurons were incubated with 1:400 monoclonal anti-GFP (Roche) for 10 min at 37 °C, then fixed, permeabilized, and further stained with 1:400 guinea pig anti-PSD-95 antibody (a gift of M. Sheng, MIT, Boston, MA) followed by a mixture of 1:1,000 Alexa 488-conjugated anti-mouse and 1:1,000 Alexa 568-conjugated anti-guinea pig antibodies (Invitrogen).

Image Analysis. Immunostainings were visualized on an epifluorescence microscope (IX 70; Olympus) equipped with a $\times 100/1.4$ NA objective and appropriate filter sets (Chroma). Images were acquired with a CCD camera (HQ CoolSnap; Roper Scientific). Using the software Metamorph (Universal Imaging), we quantified an enrichment factor, defined as the ratio of fluorescence level at the bead surface versus that on a nearby control region on the same neurite, for an average of three beads per cell, showing the highest accumulation. To quantify the enrichment of recombinant AMPAR subunits at endogenous synapses, the PSD-mCherry images were treated by a segmentation program written within Metamorph (9), allowing precise detection of clusters. The corresponding contours were transferred to the GFP image, and the GluR1 or GluR2 intensity was measured in these regions and normalized by that on a control area.

Glutamate Un-Caging. Cells transfected with PSD-95-mCherry and carrying Nrx1 β -Fc latex beads were loaded with 5 μ M Fluo-4-AM (Molecular Probes) for 15 min in culture medium, then mounted in HBS containing 2 mM calcium and 0 mM magnesium (10) and supplemented with 3 mM 4-methoxy-7-nitroindolyl-caged l-glutamate (Tocris), 10 μ M glycine as a co-agonist of NMDARs, and 1 μ M TTX to prevent action potentials. In control experiments, 4-methoxy-7-nitroindolyl-caged l-glutamate was omitted. The observation chamber was placed on a confocal scanning laser microscope (TCS SP2; Leica) equipped with a pulsed bi-photon laser (Mira 900; Coherent) tuned to 750 nm and set to 100 mW by an electro-optic modulator (Linco Photonics). The optimal laser power was adjusted on a control sample made of DMNP fluorescein (Sigma) trapped in micro-islets formed in polymerized Sylgard (11), so as to yield rapid and reproducible increases in fluorescence with minimal photo-damage. A zoomed area of 6×6 μ m around a bead was scanned at 800 Hz by the 488-nm Argon laser line and the fluorescence between 500 and 530 nm was collected by a photomultiplier, using a $\times 60/1.3$ objective and a pinhole open to three times the Airy disk (180 μ m), at a frequency of 5 Hz. During a 20-sec fluorescence recording, one pulse of bi-photon light corresponding to one scan duration (200 ms) was given using a shutter (Uniblitz). The PSD-mCherry fluorescence (laser excitation, 542 nm; emission, 560–650 nm) and transmitted light intensity were also recorded. Conveniently, the bi-

photon pulse caused sudden photo-bleaching of mCherry and appeared as a stimulation artifact in the transmission image. For pharmacological treatments, 100 μ M D-AP5 (Advent), 20 μ M CNQX (Tocris), or 200 μ M cadmium chloride (Sigma) were added to the extracellular mounting solution.

Electrophysiology. The extracellular solution contained (in millimolar concentrations): 145 NaCl, 2.5 KCl, 0 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 Hepes, and 10 D-Glucose, pH 7.4, supplemented with 10 μ M bicuculline (Tocris) to block GABA-A receptors and 1 μ M TTX. When indicated, 10 μ M CNQX or 10 μ M APV were added. Borosilicate cylinders (Clark Electromedical) were pulled with a micropipette puller (Sutter Instruments) to produce patch electrodes with resistances of 3 to 5 M Ω . The intracellular solution contained (in millimolar concentrations): 130 CH₃CSO₃, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 4 NaATP, 10 EGTA, 10 Hepes, and 0.4 GTP, pH 7.25. Micropipette positioning was achieved through three-

axis micromanipulators (Sutter Instruments) under an inverted epifluorescence microscope equipped with a $\times 60/1.35$ objective (IX70; Olympus). Recordings were performed with an EPC 10 double patch-clamp amplifier (HEKA Electronics). Data were acquired and stored using Pulse-Pulse fit software (version 8.62; HEKA Electronics) and analyzed with Igor (Wavemetrics) and GraphPad Prism software. Local activation of receptors was performed by glutamate iontophoresis (2), using pipettes with a resistance of 40 to 60 M Ω filled with 150 mM sodium glutamate, pH 7.4, and connected to an amplifier from NPI Electronics. A small retaining current was needed to keep glutamate inside the pipette (usually 10–50 nA). Current pulses of 200 to 300 nA and 1 ms duration were applied to evoke glutamate receptor-mediated currents. At least 10 recorded current traces were averaged. The averaged current curves were fitted by bi-exponential functions using the Igor software (Wavemetrics), from which the relative charge carried by the fast AMPAR component was computed.

1. Okabe S, et al. (1999) Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nat Neurosci* 2:804–811.
2. Heine M, et al. (2008) Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320:201–205.
3. Scheiffele P, et al. (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657–669.
4. Dean C, et al. (2003) Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 6:708–716.
5. Lambert M, Padilla F, Mege RM (2000) Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both outside-in and inside-out signals. *J Cell Sci* 113:2207–2219.
6. Saglietti L, et al. (2007) Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron* 54:461–477.
7. Goslin K, Asmussen H, Banker G (1991) Rat hippocampal neurons in low-density culture. *Culturing Nerve Cells*, eds Banker G, Goslin K (MIT Press, Cambridge, MA), pp 339–370.
8. Thoumine O, Lambert M, Mege RM, Choquet D (2006) Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Mol Biol Cell* 17:862–875.
9. Groc L, et al. (2007) Surface trafficking of neurotransmitter receptor: comparison between single-molecule/quantum dot strategies. *J Neurosci* 27:12433–12437.
10. Matsuzaki M, et al. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4:1086–1092.
11. Kiskin NI, et al. (2002) The efficiency of two-photon photolysis of a “caged” fluorophore, o-1-(2-nitrophenyl)ethylpyranine, in relation to photodamage of synaptic terminals. *Eur Biophys J* 30:588–604.

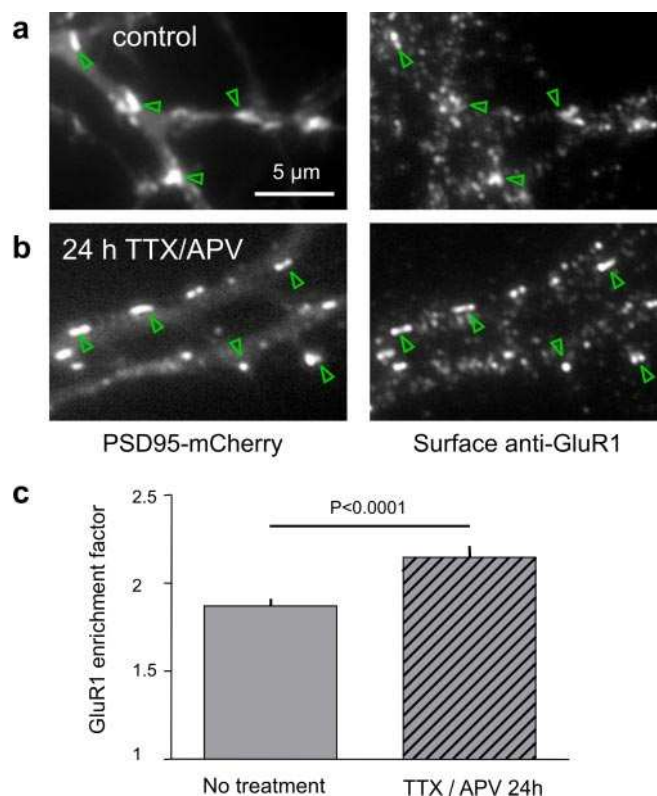


Fig. S1. TTX/APV treatment increases AMPAR recruitment at synapses. Neurons co-transfected with Nlg1 and PSD-95-mCherry were incubated without (a) or with (b) TTX/APV for 24 h and processed for GluR1 surface staining. (c) The enrichment level of GluR1 at PSD-mCherry-positive clusters (arrowheads) was quantified as described in *Materials and Methods*.

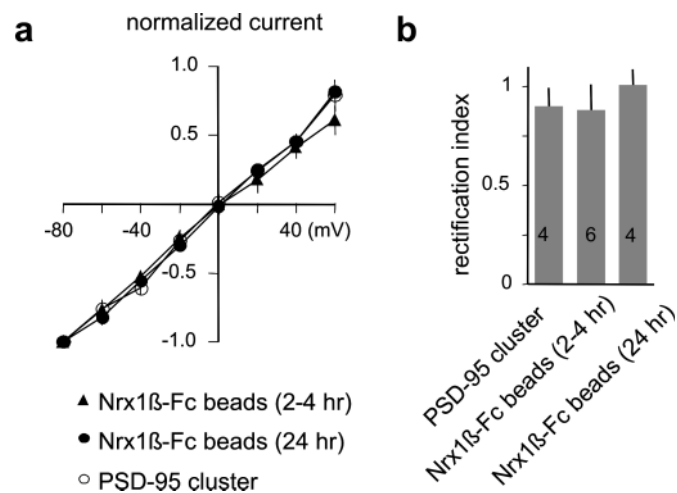
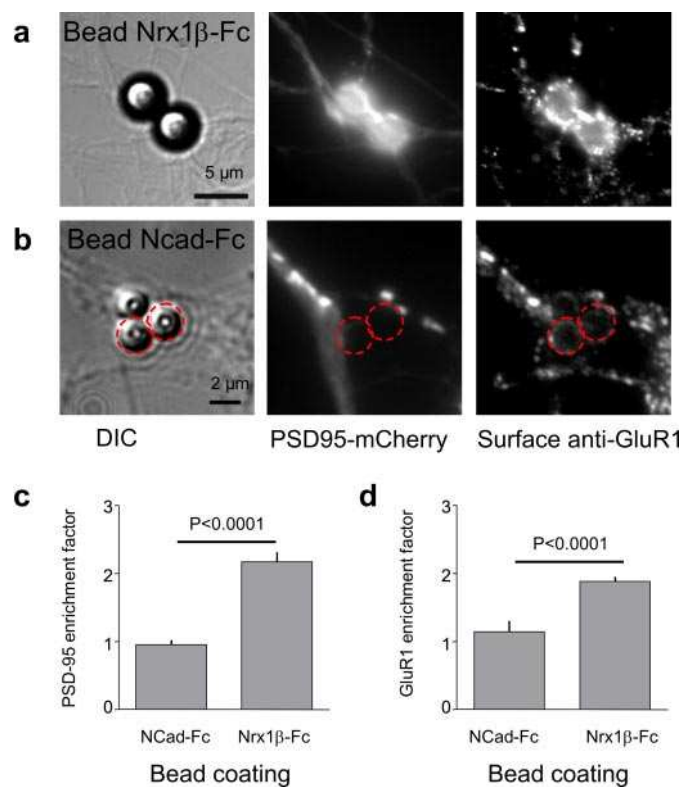


Fig. 52. Electrophysiological properties of the currents recorded at Nrx1 β -Fc beads and synapses. (a) Average current/time curve for 2–4 h and 24 h Nrx1 β -Fc bead contacts and endogenous PSD-95-GFP clusters in cells transfected with Nlg1 and PSD-95-GFP. (b) Rectification index calculated as the slope of the current/voltage curves.



II. Article 2: Ligand-activation of neuroligin-1 by neurexin-1 β triggers PSD-95 recruitment through a phosphotyrosine switch

Grégory Giannone, Magali Mondin, Edouard Saint-Michel, Béatrice Tessier, Daniel Choquet et Olivier Thoumine (Soumis)

A. Problématique

Les interactions Nr x 1 β /Nlg1 induisent une différenciation des post-synapses glutamatergiques, par le recrutement de PSD-95 et des rAMPA et NMDA (Graf et al., 2004; Heine et al., 2008a; Barrow et al., 2009). L'utilisation de modèles biomimétiques tend à montrer que l'agrégation de Nr x 1 β et de Nlg1 est suffisante pour induire la différenciation post-synaptique. En effet, l'agrégation de Nr x 1 β et de Nlg1 par des anticorps induit respectivement le recrutement de vésicules pré-synaptiques et le recrutement de PSD-95 et des rNMDA (Dean et al., 2003; Graf et al., 2004; Barrow et al., 2009). Cependant, d'autres études proposent l'intervention de mécanismes de signalisation plus complexes dans la fonction des adhésions Nr x 1 β /Nlg1. Par exemple, il a été montré que l'interaction entre Nlg1 et PSD-95 en post-synapse régule la probabilité de libération de neurotransmetteur et que cet effet serait relayé par Nr x 1 β (Futai et al., 2007). De plus, l'activité des rNMDA module la capacité des complexes Nr x 1 β /Nlg1 à induire la formation de synapses (Chubykin et al., 2007). Donc au-delà de l'effet d'agrégation, la liaison de Nr x 1 β à Nlg1 induit des mécanismes de signalisation permettant de réguler la fonction de Nlg1. Afin d'identifier ces mécanismes de signalisation, nous nous sommes inspirés de l'exemple des intégrines, dans lequel la liaison du ligand extracellulaire (la fibronectine) induit des changements de conformation, des mécanismes de signalisation de type tyrosine phosphorylation et le recrutement d'adaptateurs permettant l'interaction avec le cytosquelette d'actine (Giannone and Sheetz, 2006). Nous avons donc testé l'hypothèse qu'en plus d'un effet d'agrégation la liaison de la Nr x 1 β induise une activation de la fonction de Nlg1. Pour cela, nous avons systématiquement comparé les effets d'agrégation de Nlg1 avec ceux induits par la liaison de Nr x 1 β , sur la liaison entre Nlg1 et PSD-95.

B. Résultats majeurs

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de formation d'hémi post-synapses, sur des neurones jeunes (7, 8 jours *in vitro*), exprimant Nlg1 et PSD-95:GFP. Pour induire la formation de ces post-synapses, nous avons utilisé soit de la Nr x 1 β purifiée, soit un anticorps anti-HA dirigé contre l'épitope HA situé au niveau du domaine extracellulaire de la construction Nlg1, tous deux agrégés par des anticorps secondaires (Graf et al., 2004; Barrow et al., 2009; Pouloupoulos et al., 2009). Nous avons comparé dans ces deux conditions le recrutement de PSD-95:GFP par différentes techniques d'imagerie sur cellules vivantes. Tout d'abord, en enregistrant en vidéo-microscopie le signal PSD-95:GFP après incubation avec les agrégats de Nr x 1 β , nous avons observé que le recrutement de PSD-95 aux adhésions Nr x 1 β /Nlg1, est un phénomène très rapide qui apparaît dès 10 minutes de formation des contacts. En comparant systématiquement les effets de l'agrégation de Nlg1 par la Nr x 1 β et par l'anti-HA dans des expériences de vidéo-microscopie, de FRAP et de suivi de particules uniques, nous avons mis en évidence que la liaison de Nr x 1 β à Nlg1 induit un recrutement de PSD-95 plus important, plus rapide et plus stable, que celui observé après agrégation avec l'anti-HA non activant. Enfin, nous avons utilisé des mutants ponctuels de Nlg1, sur lesquels la tyrosine en position 782 est changée en alanine pour mimer une déphosphorylation constitutive, ou en aspartate, pour mimer une phosphorylation. Dans toutes les expériences de recrutement de PSD-95 que nous avons effectué avec ces mutants (vidéo-microscopie, FRAP, suivi de particules), seul le mutant Nlg1 Y782A présente les mêmes capacités à recruter PSD-95. Ces expériences ont permis de mettre en évidence que la déphosphorylation de Nlg1 induite par la liaison de Nr x 1 β est nécessaire au recrutement de PSD-95 aux contacts Nr x 1 β /Nlg1. Ces résultats suggèrent donc qu'au-delà de leurs propriétés adhésives, des mécanismes de signalisation et de transduction sont associés aux complexes Nr x /Nlg.

Ligand-activation of neuroligin-1 by neurexin-1 β triggers PSD-95 recruitment through a phosphotyrosine switch

Grégory Giannone, Magali Mondin, Edouard Saint-Michel, Béatrice Tessier, Daniel Choquet^{*}, Olivier Thoumine^{*}

(^{*}) equal contributors

Physiologie Cellulaire de la Synapse
UMR 5091 CNRS
Université Bordeaux 2
33077 Bordeaux Cedex
e-mail: othoumin@u-bordeaux2.fr; dchoquet@u-bordeaux2.fr;

Running title: Ligand- activation of neuroligin-1

Key words: neuroligin 1, neurexin 1 β , adhesion, post-synapse, PSD-95, quantum dot, single particle tracking, FRAP, cross-linking assay.

4 Highlights:

- Recruitment of PSD-95 by neuroligin-1 requires both receptor clustering and binding of neurexin-1 β
- Neurexin-1 β binding to neuroligin-1 reduces PSD-95 turnover rate
- Surface-diffusing neuroligin-1 gets immobilized by PSD-95 upon neurexin-1 β binding
- Dephosphorylation of Y782 in neuroligin-1 up-regulates binding to PSD-95 and down-regulates binding to gephyrin

Abbreviations:

Nlg1	neuroligin 1
Nrx1 β	neurexin 1 β
PSD	post synaptic density
GFP	green fluorescent protein
Qdot	quantum dot
HA	hemagglutinin
D	diffusion coefficient
DTT	dithiothreitol
Fc	antibody fragment crystallizable region

Summary

Adhesion between β -neurexin-1 and neuroligin-1 induces excitatory post-synaptic differentiation through recruitment of PSD-95, but little is known on the intracellular signaling mechanisms. To dissociate the effects of ligand binding from those of receptor multimerization, we compared conditions where neuroligin-1 transfected in primary neurons was bound to β -neurexin-1 ligands or to non-activating anti-HA antibodies. Using time lapse fluorescence recording, FRAP and single nanoparticle tracking, we reveal a mechanism by which the extra-cellular binding of β -neurexin-1 ligands, in addition to aggregation effects, induces a selective and rapid interaction between neuroligin-1 and PSD-95. By point mutating a unique tyrosine in the intracellular tail of neuroligin-1 (Y782), we show that ligand- dependent recruitment of PSD-95 by Nlg1 requires dephosphorylation of this residue. The recruitment of gephyrin by Nlg1 phospho-mutants was opposite to that observed for PSD-95, suggesting a competitive binding. We propose that a switch in the phosphotyrosine level of neuroligins controls the balance between excitatory and inhibitory scaffold assembly during synapse formation.

Introduction

Synaptogenesis is a multi-step process at axon-dendrite contact sites, initiated by adhesion proteins and followed by the recruitment of scaffold proteins and functional receptors (Friedman et al., 2000; Gerrow et al., 2006; Zito et al., 2009). Given the relatively short lifetime of filopodial protrusions (10 min) {Ziv, 1996 #145}, the initial adhesive interaction is limited in time, implying that the decision to trigger synapse formation needs to be fast. The scaffold protein PSD-95 being one of the earliest detectable proteins at the post-synapse and playing a key role in excitatory synapse maturation {Kim, 2004 #143; Rao, 1998 #144}, it is essential to identify the mechanisms which control the rapid recruitment of PSD-95 at novel neuronal contacts.

The adhesion molecules neurexins (Nrxs) and neuroligins (Nlgs) are key players in synapse initiation and maturation, and the precise combination of Nrx and Nlg isoforms and/or splice variants dictate synapse specificity (Craig and Kang, 2007; Sudhof, 2008). Over-expressing Nlg1 in neurons promotes synapse formation (Levinson et al., 2005)(Ko et al., 2009) whereas silencing of Nlgs does the opposite (Chih et al., 2005). In co-culture assays, HEK cells expressing Nlg1 or Nrx1 β induce pre- and post-synapses in contacting neurites, respectively (Dean et al., 2003; Scheiffele et al., 2000)(Graf et al., 2004; Nam and Chen, 2005). Microspheres coated with Nlg1, Nrx1 β , or even antibodies to Nlg1 or Nrx1, can reproduce these effects (Dean et al., 2003)(Graf et al., 2004; Heine et al., 2008)(Barrow et al., 2009), suggesting that synaptic differentiation only relies on Nrx1 or Nlg1 aggregation. Given that PSD-95 can directly bind the C-terminus of Nlg1 (Irie et al., 1997), the robust recruitment of PSD-95 at Nrx1/Nlg1 contacts (Graf et al., 2004; Heine et al., 2008) could simply involve an increase in the local concentration of Nlg1.

However, other studies support that the full range of Nrx1 β /Nlg1 functions involves more complex mechanisms. Indeed, synaptic activity is required for both the recruitment of AMPA receptors at Nrx1 β /Nlg1 contacts (Nam and Chen, 2005), and the formation of pre-synapses on neuroligin-1 expressing cells (Chubykin et al.,

2007). In addition, the interaction between post-synaptic Nlg1 and PSD-95 induces a retrograde modulation of pre-synaptic release (Futai et al., 2007). These examples support that Nr $x1\beta$ binding to Nlg1, besides triggering Nlg1 clustering, could induce signaling cascades. The best known example of such ligand-activated adhesion molecules are integrins, where a synergy exists between receptor clustering and ligand occupancy (Miyamoto et al., 1995a), the later triggering conformational changes, phosphotyrosine signaling, and recruitment of actin-associated scaffolds (Giannone and Sheetz, 2006). We thus tested the hypothesis that Nr $x1\beta$ binding to Nlg1, in addition to aggregation effects, could induce such an activation of Nlg1 function.

Results

Aggregating Nlg1 by Nr α 1 β induces the rapid formation of new PSD-95 clusters

We triggered the formation of Nlg1 aggregates at the neuronal surface, by incubating 6-7 DIV primary rat hippocampal neurons with purified Nr α 1 β -Fc ligands cross-linked by Cy5-conjugated secondary antibodies (Barrow et al., 2009; Pouloupoulos et al., 2009), and observed the redistribution of Nlg1 and PSD-95 by time lapse fluorescence microscopy. Transfection of Nlg1 ensured that adhesion occurred specifically between Nr α 1 β -Fc ligands and Nlg1, and not with other endogenous Nr α receptors such as Nlgs2/3 or LRRTM2s (de Wit et al., 2009; Graf et al., 2004; Pouloupoulos et al., 2009). Treatment with cross-linked Nr α 1 β resulted in a rapid coalescence of Nlg1:GFP and PSD-95:GFP from diffuse pools into micron-scale aggregates, matching the size of synapses, and co-localizing with Cy5-labeled Nr α 1 β (Figures 1A, S1A, and Supplemental movie 1). The number of PSD-95 clusters doubled within 10-30 min (Figure 1C). This time course is somewhat faster than previously reported (Barrow et al., 2009; Bresler et al., 2001; Friedman et al., 2000; Levinson et al., 2010; Okabe et al., 2001), those differences being possibly linked to the respective expression levels of Nlg1 versus PSD-95. In our conditions, endogenous PSD-95 was also fully recruited at Nr α 1 β clusters within 1 hr (Figure S3D), showing that over-expressing PSD-95 is not biasing the recruitment dynamics. Whereas the Nr α 1 β -Fc construct was shown to inhibit synaptogenesis when used chronically as a competitor of endogenous Nr α /Nlg interactions (Levinson et al., 2005; Scheiffele et al., 2000), here Nr α 1 β -Fc ligands were added acutely and had to be cross-linked by antibodies, to mimic adhesion events that led to the assembly of PSD-95 scaffolds outside pre-existing synaptic PSD-95 (Figure S2A,B).

To check if PSD-95 was recruited through a specific association with Nlg1, we co-transfected neurons with PSD-95:GFP and an Nlg1 construct deleted of its first cytoplasmic 50 aa (Nlg1- Δ Cter) containing the PDZ binding motif interacting with PSD-95 (Scheiffele et al., 2000). Despite the efficient formation of Nr α 1 β /Nlg1- Δ Cter contacts, Nr α 1 β binding to Nlg1- Δ Cter was defective in recruiting PSD-95:GFP (Figures 1D,E and S3C). The same result was found by co-transfecting Nlg1 and

PSD-95:GFP bearing an H/V point mutation in each of the three PDZ domains (Schnell et al., 2002), in order to abolish binding to Nlg1 (Figure 1D,E). Thus, the recruitment of PSD-95 by Nlg1 aggregates was specific of the PDZ domain-dependent interaction between Nlg1 and PSD-95.

Synergy between receptor aggregation and occupancy for the recruitment of PSD-95 by cross-linked Nlg1

To characterize if Nr $x1\beta$ binding could stimulate Nlg1 function in addition to increasing its local concentration, we induced Nlg1 aggregation using a 'non activating' anti-HA antibody directed against an N-terminal HA tag. This treatment induced a fast and efficient formation of new Nlg1:GFP clusters similar to cross-linked Nr $x1\beta$, with comparable surface density, size, and Nlg1 content (Figure S1). However, almost no new PSD-95:GFP clusters were formed during time-lapse recordings (Figure 1B,C and supplemental movie 2). The number of PSD-95 clusters after 30 min induction of Nlg1 aggregation, normalized by the number of pre-existing synaptic clusters, was significantly higher for Nr $x1\beta$ ligands (2.9 ± 0.4 , $n = 16$ cells) than for anti-HA antibodies (1.4 ± 0.1 , $n = 19$ cells; $P < 0.0005$ by unpaired t-test). To quantitatively compare PSD-95 recruitment at Nr $x1\beta$ /Nlg1 and anti-HA/Nlg1 contacts, we calculated the mean PSD-95:GFP enrichment factor, normalized by the Cy5 signal (Figure S3), which reflects the local Nlg1 concentration (Figure S1). This ratio was significantly higher for cross-linked Nr $x1\beta$ than for anti-HA (Figure 1D,E). This difference between Nr $x1\beta$ ligands and anti-HA antibodies in recruiting PSD-95 was not due to the presence of endogenous Nlg1, because this effect was still observed in primary hippocampal cultures from Nlg1 KO mice (Figure S4). Therefore, although cross-linked anti-HA is as potent as Nr $x1\beta$ to induce the formation of new Nlg1 aggregates, the associated clustering of PSD-95 is decreased and occurs at a slower rate.

In addition, we measured the recruitment of PSD-95:GFP at Nlg1 aggregates induced by cross-linked anti-HA antibodies, when soluble Nr $x1\beta$ -Fc was added to trigger ligand binding (Figure 1D,E). The mean PSD-95:GFP/Cy5 ratio was then similar to Nr $x1\beta$ /Nlg1 contacts (0.88 ± 0.02). Purified Nr $x1\beta$ -Fc contained multimeric

forms, which were reduced to monomers by DTT treatment (Figure S5). The mean PSD-95:GFP/Cy5 ratio upon addition of monomeric Nr x 1Fc was also significantly increased compared to cross-linked anti-HA alone (0.79 ± 0.02) (Figure 1D,E), ruling out a multimerization effect. Together, these results support that Nr x 1 β binding is not just aggregating Nlg1, but triggers an additional process which stimulates Nlg1/PSD-95 interaction.

Differential PSD-95 dynamics at Nlg1 clusters made of ligand-occupied or unoccupied receptors

To further characterize this potential activation of Nlg1 by Nr x 1 β , we measured the stability of the linkage between Nlg1 and PSD-95 at Nlg1 clusters using FRAP (Figure S6A,B). Neurons were transfected with Nlg1:GFP or co-transfected with Nlg1 and PSD-95:GFP, and Nlg1 clusters were induced by cross-linked Nr x 1 β or anti-HA for 1 hour. In all conditions, fluorescence recovery was composed of two phases (Figure S6C,D), a rapid one involving a small population of Nlg1:GFP or PSD-95:GFP free to diffuse, and a slower regime characterizing a larger fraction of molecules likely trapped at Nr x 1Fc aggregates, and continuously exchanging (Thoumine et al., 2006). The recovery rate for Nlg1:GFP was similarly low for Nr x 1 β and anti-HA induced clusters (Table 1), consistent with a robust nM affinity between Nr x 1 and Nlg1, comparable to that of an antibody (Leone et al., 2010; Saint-Michel et al., 2009). This revealed a similar intrinsic stability of both types of adhesive clusters, allowing comparison of PSD-95 dynamics. The exchange rate for the slow fraction was significantly lower at Nr x 1 β /Nlg1 contacts than at anti-HA/Nlg1 contacts (Table 1), showing that the interaction between Nlg1 and PSD-95 is lasting longer when Nlg1 is bound to Nr x 1 β than to non-activating antibodies.

Effect of receptor occupancy on the lateral mobility of individual Nlg1 molecules

To gain further insight into the effects of ligand binding on the dynamics of the Nlg1/PSD-95 association, we monitored the lateral mobility of individual Nlg1 at the neuronal surface using Quantum dots (Qdots) coated with either Nr x 1 β -Fc or anti-HA. We used older neurons (10-12 DIV) to examine Nlg1 membrane diffusion at synaptic sites. To label post-synapses, neurons were transfected with Homer1C-

GFP, which does not modify synaptic maturation (Okabe et al., 2001) but still co-localized with PSD-95 (Figure S2C). Both types of Qdots were very dynamic, oscillating between phases of free diffusion and confinement (Figure 2A,B). The distribution of instantaneous diffusion coefficients (Figure 2D) was fitted by two Gaussian curves (Figure S7E), yielding the relative proportions of diffusive versus confined events (Figure 2E). Strikingly, the proportion of confined events was twice higher for Qdots conjugated to Nr x 1 β -Fc (20%) than for anti-HA coated Qdots (11%), associated with a shift of the distribution of diffusion coefficients towards lower values (Figure 2D,E). The percentage of confined trajectories was increased at the PSD (Figure S7A,B) suggesting that Nlg1 confinement is triggered through an association with synaptic components. Accordingly, the mean squared displacement (MSD) at the PSD, which reflects the area covered by Nlg1 diffusion as a function of time interval, showed a negative curvature, consistent with confinement of Nlg1 at synapses (Figure 2F). This curvature was more pronounced for Qdots conjugated to Nr x 1 β -Fc than to anti-HA (Figure 2F), suggesting a more efficient association with synaptic components. Quantification of the confinement probability for both conditions also demonstrated that ligand-occupied Nlg1 was more often confined than unoccupied Nlg1 (Figure S7F).

The increased confinement of Nlg1 induced by Nr x 1 β binding relies on an interaction with PSD-95

To determine if the confinement of Nlg1 was due to interactions with intracellular scaffolds or with endogenous pre-synaptic Nr x s, we used the Nlg1- Δ Cter mutant unable to interact with PSD-95, and the Nlg1-SWAP mutant unable to bind Nr x 1 β (Scheiffele et al., 2000). The distribution of diffusion coefficients of anti-HA coated Qdots bound to Nlg1-SWAP was identical to that of Nlg1WT (Figures 2D-F and S7C) ($D_{\text{conf}} = 12\%$), suggesting that Nlg1 confinement is not due to an interaction with pre-synaptic Nr x s. In contrast, Nlg1- Δ Cter displayed almost no confined events inside or outside synapses ($D_{\text{conf}} = 6\%$) (Figures 2C and S7D). The distribution of diffusion coefficients was shifted towards higher values, and the MSD at the post-synapse was almost linear with respect to time, consistent with random diffusion (Figure 2D-F). When probed with Nr x 1 β -coated Qdots, Nlg1- Δ Cter also displayed less confined

events (7%), suggesting that the increased confinement observed with Nr α 1 β -occupied Nlg1 was dependent on an association with PSD-95 (Figure 2D). Furthermore, in neurons transfected with shRNA against PSD-95, which down regulated endogenous PSD-95 expression level by 70%, the confinement of Nr α 1 β -coated Qdots was significantly decreased (13%) compared to neurons transfected with Homer 1C (20%) (Figure S8A,B). In contrast, when endogenous PSD-95 was replaced by over-expressed PSD-95:GFP, the Nlg1 confinement level was increased to 28% (Figure S8A,B). Together, these results strongly support the hypothesis that binding of Nr α 1 β to Nlg1 triggers a direct association between Nlg1 and PSD-95.

Nr α 1 β binding rapidly immobilizes Nlg1

To show that ligand binding promotes a dynamic Nlg1 binding to PSD-95, we analyzed the dynamics of anti-HA-coated Qdots bound to Nlg1 upon addition of soluble Nr α 1 β -Fc (Figure 3A,B). This treatment produced a striking immobilization of anti-HA-coated Qdots within 10 min (Figure 3C,D), shifting diffusion coefficients towards lower values (Figure 3E). Both multimeric and monomeric Nr α 1 β -Fc induced a significant 2.5-3.1 fold increase in the number of confined events, respectively (Figure 3G). As controls, addition of soluble Nr α 1 β -Fc multimers on anti-HA-coated Qdots bound to Nlg1-SWAP or Nlg1- Δ Cter, induced only a 1.2-1.4 fold increase, respectively, in the number of confined events (Figure 3F,G), indicating that the effect of soluble Nr α 1 β -Fc is dependent on a direct binding to Nlg1, and that Nlg1 confinement is mostly due to an interaction with PSD-95. These results support that occupancy of the Nr α 1 β binding site on Nlg1 regulates favors the anchoring of Nlg1 to PSD-95.

The phosphorylation state of a unique tyrosine residue in the intracellular tail of Nlg1 regulates ligand-induced binding to PSD-95

By analogy with other adhesion systems, e.g. integrins (Giannone and Sheetz, 2006) and immunoglobulin cell adhesion molecules (Maness and Schachner, 2007), we hypothesized that ligand-activation of Nlg1 by Nr α 1 β may trigger phosphotyrosine signal transduction. We thus mutated the single tyrosine residue in the Nlg1

intracellular domain (Y782) into either alanine (to mimick constitutive dephosphorylation), or aspartic acid (to mimick constitutive phosphorylation). We characterized the ability of these mutants to bind PSD-95 in both Nr $x1\beta$ clusters and Qdot mobility assays. The confinement Nr $x1\beta$ -Fc coated Qdots in neurons transfected with Nlg1 Y782D was significantly lower than that in neurons transfected with Nlg1WT or the Nlg1 Y782A mutant (Figure S8C,D). Accordingly, the PSD-95 enrichment level at Nr $x1\beta$ clusters was similarly high in neurons transfected with Nlg1 WT or the Y782A mutant, but reduced in neurons transfected with Y782D (Figure 4A,B). This indicates that dephosphorylation of Y782 is required for Nlg1 binding to PSD-95. To test whether the Nlg1 phosphorylation state was directly related to Nr $x1\beta$ binding, we by-passed Nr x dependent signaling using the Nlg1 Y782A mutant while inducing Nlg1 aggregation with anti-HA antibodies. This induced higher recruitment of PSD-95, compared to either Y782D or Nlg1WT similarly cross-linked with anti-HA (Figure 4B and S9A).

To characterize the role of the phosphorylation state of Nlg1 on synapse formation, we quantified the number of pre- and post-synaptic puncta in neurons transfected with Nlg1 phospho-mutants. Both Nlg1 Y782A and Y782D mutants doubled the number of pre-synapses apposed to transfected neurons compared to untransfected counterparts (Figure 4C,D), a classical effect induced by Nlg1WT over-expression (Chih et al., 2005; Levinson et al., 2005)(Ko et al., 2009). However, only for Nlg1WT and the Y782A mutant was this associated with a simultaneous doubling of the density of post-synaptic PSD-95 puncta (Figure 4C,D). On the contrary, neurons transfected with the Y782D mutant did not increase the PSD-95 cluster density with respect to non-transfected counterparts (Figure 4C,D). Together, these data suggest that in the absence of Nr $x1\beta$ binding, Nlg1 is phosphorylated and binds less efficiently PSD-95, whereas upon Nr $x1\beta$ binding, Nlg1 is dephosphorylated leading to increased recruitment and stabilization of PSD-95.

Phosphorylation of Y782 correlates with Nlg1 binding to gephyrin

Interestingly, this tyrosine residue belongs to a consensus region conserved among all neuroligins, and the phosphorylated form of Nlg2 (at position 770) binds gephyrin,

a major scaffold molecule at inhibitory synapses (Poulopoulos et al., 2009). Therefore, we tested the ability of Nlg1 to also bind gephyrin, depending on the phosphorylation state of Y782. The effects found with gephyrin mirrored what was observed with PSD-95. The enrichment level of gephyrin at Nr α 1 β clusters was lower for Nlg1 Y782A than for Nlg1 Y782D and WT (Figure S9B,C). Moreover, the number of post-synaptic gephyrin puncta was decreased with Nlg1 Y782A, while Nlg1 Y782D had no effect compared to Nlg1 WT (Figure S9D-F). Overall, these data suggest a competitive mechanism by which unoccupied tyrosine-phosphorylated Nlg1 binds more to gephyrin, preventing PSD-95 accessibility, whereas ligand-occupied dephosphorylated Nlg1 interacts less with gephyrin, and is accessible to PSD-95 binding (Figure 4E).

Discussion

Using a combination of live imaging assays, this report shows that Nr α 1 β adhesion to Nlg1 promotes a fast and direct interaction between Nlg1 and PSD-95, not only through receptor clustering, but also involving a specific ligand binding effect linked to phosphotyrosine signaling. Thus, Nlg1 can be considered, like integrins (Giannone and Sheetz, 2006; Miyamoto et al., 1995b), as a ligand-activated adhesion molecule.

Receptor multimerization versus ligand binding

The aggregation of Nlg1 by anti-HA antibodies showed already significant recruitment of PSD-95, consistent with that observed at microspheres coated with anti-GFP antibodies (Graf et al., 2004). Furthermore, anti-HA conjugated Qdots bound to Nlg1 WT or Nlg1 SWAP occasionally stuck to synapses, indicating a basal level of interaction between Nlg1 and PSD-95, even in the absence of ligand binding. This may be due to the multivalency of PSD-95 which bears three analogous PDZ domains. Although Nlg1 is thought to bind preferentially PDZ domain 3 (Irie et al., 1997), we had here to mutate all three PDZ domains to prevent recruitment of PSD-95 at Nr α 1/Nlg1 clusters, indicating some level of redundancy. In addition, PSD-95 is

able to dimerize through N-terminal cysteines (Schluter et al., 2006), providing the possibility of forming multimerized complexes with cross-linked Nlgs.

Yet, our results demonstrate that, in addition to aggregation effects, Nr $x1\beta$ binding to Nlg1 induced: i) a faster assembly of PSD-95 clusters and stronger recruitment in cross-linking assays; ii) a more stable Nlg1/PSD-95 interaction in FRAP experiments; and iii) an increased probability of association between Nlg1 and PSD-95 in nano-particle tracking. The affinity of Nlg1 with its ligand is not correlated with the efficiency of trans-membrane activation, since anti-HA antibodies, which bind even more strongly to Nlg1 than Nr $x1\beta$ (Saint-Michel et al., 2009), were less efficient in triggering PSD-95 recruitment. Remarkably, the addition of soluble Nr $x1\beta$ to Nlg1 bound to anti-HA antibodies resulted in an increased association with PSD-95 in both the cluster and Qdot mobility assays, providing direct evidence that ligand binding was changing the association state between Nlg1 and PSD-95.

Outside-in phosphotyrosine signaling

Using Nlg1 point mutants, we showed that the de-phosphorylated form of Nlg1 bound more strongly to PSD-95, and less to gephyrin. Interestingly, both Nlg1 and Nlg-2 are capable of binding to either PSD-95 or gephyrin (Graf et al., 2004; Irie et al., 1997; Pouloupoulos et al., 2009). For Nlg-2, the de-phosphorylated form does not bind gephyrin (Pouloupoulos et al., 2009), and an Nlg2 truncation mutant Δ (716 -782) lacking this essential tyrosine at position 770 is delocalized from VGAT/gephyrin co-clusters (Levinson et al., 2010). This suggests a competitive mechanism between gephyrin and PSD-95 for the binding to the intracellular tail of neuroligins, regulated by ligand binding and phosphorylation level.

We do not know at this point which kinases or phosphatases are involved in this process. A recent report indicates that Nr x /Nlg adhesions interact with a phosphotyrosine phosphatase receptor (PTPRT) whose level correlates with glutamatergic synapse development, and whose activity is regulated by the Fyn tyrosine kinase (Lim et al., 2009). An interesting possibility would thus be that Nr $x1\beta$ binding to Nlg1 selectively recruits a molecular assembly including PTPRT and Fyn, leading to regulation of the phosphorylation level of Y782. However, it is still unclear

whether Nlgs can be directly phosphorylated by Fyn and/or dephosphorylated by PTPRT (Lim et al., 2009). As reported for integrins (Giannone and Sheetz, 2006), it is likely that a complex interplay between kinase and phosphatase activities is involved.

Such a ligand-induced tyrosine phosphorylation “switch” could represent a very sensitive mechanism by which early neuronal contacts relying on Nr_x/Nlg adhesion may quickly choose between excitatory or inhibitory scaffolds. A balance between local tyrosine phosphorylation or dephosphorylation of Nlgs would then be a driving force to instruct synapse specification. The existence of multiple isoforms and splice variants for Nlgs and Nr_xs, giving rise to a variety of structural interfaces (Arac et al., 2007; Chen et al., 2008) and affinities (Boucard et al., 2005; Chih et al., 2006; Leone et al., 2010), could correlate with such phosphotyrosine signaling patterns unique to each Nr_x/Nlg combination, contributing to establish synapse specificity.

Experimental Procedures

Molecular constructs and reagents

The neuroligin constructs Nlg1, Nlg1-SWAP (in which the extracellular domain was replaced by acetylcholine esterase), Nlg1- Δ Cter (in which the first cytoplasmic 50 aa containing the sequence interacting with PSD-95 were deleted) were gifts from P. Scheiffele (Columbia University, New York). All Nlg1 constructs contained an N-terminal HA tag. To make HA-Nlg1:GFP, HA-Nlg1 was first removed from the pNice vector (Nlg1 construct) and subcloned into the pcDNA vector using the HindIII/NotI restriction sites. Then, the sequence coding for EGFP was added in the C-terminal part, at position -21 aa, by using the AgeI/NheI restriction sites. Nlg1 phospho-mutants Y782A and Y782D were generated from the Nlg1WT construct, by site-directed mutagenesis using the QuickChange II XL Kit (Stratagene), followed by PCR with appropriate primers. Each clone was verified by automated sequencing.

The PSD-95:GFP and PSD-95-mCherry were constructed by inserting the fluorescent proteins at position + 253 aa in the PSD-95 pcDNA from S. Okabe (Tokyo University, Japan) as described earlier (Heine et al., 2008). The PSD-95-PDZ123-GFP was mutated in PDZ domains (Quikchange IIXL kit, Stratagene). 3 Couples of oligonucleotides containing the desired mutations, H130V, H225V and H372V respectively for the PDZ1, PDZ 2 and PDZ 3 were used. An shRNA vector against PSD-95 (shPSD-95) and a control plasmid in which endogenous PSD-95 was knocked-down and replaced by PSD-95:GFP (repl-PSD-95) were gifts from O. Schlüter (Stanford University, Palo Alto, CA). The Gephyrin:Venus plasmid was a gift from A. Triller (Ecole normale supérieure, Paris, France).

The pcDNA neomycin β Neurexin δ 4-humanFc (abbreviated Nr x 1 β -Fc) plasmid received from P. Scheiffele was subcloned between sites HindIII/XhoI in pcDNAhygro(+) vector in order to select a stable hygromycin-resistant HEK cell line producing Nr x 1 β -Fc. Recombinant Nr x 1 β -Fc protein was expressed in HEK cells and purified from conditioned medium as described (Breillat et al., 2007), at a concentration of 0.8-1.3 mg/ml. We checked sample purity by SDS-PAGE followed by Coomassie staining, and identity of the Nr x 1 β -Fc protein by immunoblots using a primary mouse anti-Fc antibody. The preparation run in a non-reducing gel contained both monomeric and multimeric forms. To induce a loss of Nr x 1 β -Fc dimerization, we

treated purified Nr $x1\beta$ -Fc with DTT (1 %) for 30 min at 4°C to reduce disulfide bonds present in Fc, then removed DTT by centrifuging at 14000 rpm for 2 h using a Centricon® filtering units (Millipore). To check if monomeric Nr $x1\beta$ -Fc could re-dimerize over time, we let the purified protein solution for 4 hr or 24 hr in culture medium at 4°C, to avoid protein degradation, and ran the samples on the same gel (Figure S5). There are also 3 cysteines in the Nr $x1\beta$ extracellular domain susceptible to form di-sulfide bonds and to be broken by DTT treatment. Even if this is the case, it does not affect the adhesive function of Nr $x1\beta$, since monomeric Nr $x1\beta$ retained the ability to bind Nlg1 in the Qdot assay.

Globulin-free bovine serum albumin (BSA) and other chemicals were purchased from Sigma. High affinity rat anti-HA (3F10, Roche), mouse anti-HA (12CA5, Roche), anti-rat Fc (Jackson ImmunoResearch), anti-human Fc antibody (Jackson ImmunoResearch), anti-synapsin antibody (Synaptic Systems). Anti-mouse and anti-human Qdot 655 were purchased from Invitrogen. Anti-human and anti-rat antibodies were conjugated with Cy5 using a labelling kit (Amersham Biosciences).

Cell culture and transfection

Dissociated hippocampal neurons from E18 rat embryos were plated on 18 mm polylysine-coated glass coverslips at a density of 10'000 cells/cm² in MEM containing 10% horse serum (Gibco) for 3 hr, then cultured in Neurobasal medium supplemented with B27 on a layer of glial cells (Heine et al., 2008). Neurons were transfected with the relevant plasmids at 4-5 DIV (for functional assay of post synapses formation) or 7-8 DIV (for single particle tracking experiments) using Effecten (Qiagen) and processed 2-3 days later. To obtain neurons with an Nlg1 null background, we bred heterozygotes Nlg1 mice (Varoqueaux et al., 2006) generously given by N. Brose and F. Varoqueaux (Max Planck Institute, Goettingen). Newborn littermate pups were genotyped at P0, allowing selection of WT and KO animals for dissociated hippocampal cultures, performed as above.

Functional assay of post-synapse formation

Purified β Nr $x1$ -Fc (3-5 μ l, 0.8-1.3 mg/ml) or high affinity anti-HA antibody (10 μ l, 0.1 mg/ml) were cross-linked respectively by Cy5-conjugated anti-human Fc (2.5 μ l, 1.3 mg/ml) or anti-rat Fc (2.5 μ l, 1.3 mg/ml) antibodies in 100-200 μ l tyrode solution (in

mM: 120 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 25 HEPES and 30 D-Glucose, pH 7.4) supplemented with 0.2 % BSA. The solution was centrifuged at 14000 rpm for 10 min before addition to neurons for 30 min at 37°C. Neurons were then washed and fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde. For time-lapses and experiments requiring an image of GFP clusters before and 30 min after addition of the cross-linked proteins, we performed the experiments under microscopic observation. For experiments where PSD-95 recruitment is induced by cross-linked anti-HA antibodies plus soluble Nr1 β -Fc, multimeric or monomeric Nr1 β -Fc (5 μ l, 0.8-1.3 mg/ml) were added to the cross linked proteins before incubation with neurons. Images acquisition or time-lapse (every 20 s) were performed on an Olympus IX 70 epifluorescence microscope equipped with a 100x/1.4 NA objective, a mercury lamp, and appropriate filter sets. Images were acquired with a CCD camera (QuantEM 512SC, Photometrics, Roper Scientific).

Immunocytochemistry

Neurons transfected at DIV 5-6 with GFP alone, or co-transfected with GFP + Nlg1 WT or Nlg1 phospho mutants were fixed at DIV 9-10 in warm 4% paraformaldehyde-4% sucrose in PBS for 10 min. Remaining active sites were saturated with 50 mM NH₄Cl in PBS for 15 min. Cells were then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. Non-specific binding was blocked with PBS containing 1% BSA. Pre-synapses were labeled with 1:400 mouse anti-synaptotagmin (gift from C.G. Dotti, K.U.Leuven, Belgium) followed by 1:1000 Alexa647-conjugated goat anti-mouse antibody (2 mg/ml, Molecular Probes). Endogenous PSD-95 was labeled with 1:500 mouse antibody (NeuroMab, clone K28/43) followed by 1:1000 Alexa568-conjugated goat anti-mouse antibody (2 mg/ml, Molecular Probes). Endogenous gephyrin was labeled with 1:500 mouse antibody (Synaptic System, clone 3B11) followed by 1:1000 Alexa568-conjugated goat anti-mouse antibody (2 mg/ml, Molecular Probes). Immunostainings were visualized on a Leica DM R epifluorescence microscope equipped with a 63x/1.32 NA objective and appropriate filter sets. Images were acquired with a CCD camera (HQ CoolSnap, Roper scientific), using the Metamorph software (Universal Imaging Corp.).

Image analysis

The Cy5 images were treated by a segmentation program written within the Metamorph software (Universal Imaging) (Groc et al., 2007), allowing clusters to be detected as single objects. The corresponding contours were transferred to the GFP image or back to the Cy5 image. Then using Metamorph, we quantified enrichment factors (either for the Cy5 or the GFP signal), defined as the ratio of fluorescence level at the cluster versus that on a nearby control region on the same neurite. To determine the number of synaptotagmin, PSD-95 or gephyrin puncta per surface area of neurite, images were treated by the segmentation program, and automatically counted. An intensity threshold was applied to the GFP image to define the neurite contour and calculate its area.

Fluorescence recovery after photobleaching

Nlg1:GFP and PSD-95-GFP clusters were formed as described for the functional assay of post-synapses formation, except that neurons co-transfected with Nlg1 and PSD-95-GFP were incubated for 1 h, allowing more PSD-95 recruitment to occur at cross-linked anti-HA clusters. Only Nlg1:GFP or PSD-95-GFP clusters that were co-localized with Cy5 clusters were photo-bleached. The FRAP experiments were performed on a Leica DMI6000 microscope equipped with a spinning disk confocal system and a multi-spot FRAP set-up (Roper scientific). The PSD-95-GFP fluorescence was bleached using a 488 nm laser (200 mW). 5 images were recorded every 5 s before bleaching, then 15 images every 20 s followed by 20 images every 30 s and finally 15 images every 60 s, which correspond to 30 min of recovery. The fluorescent signals measured at bleached PSD-95-GFP clusters and at nearby unbleached clusters were subtracted from background, the cluster signals were normalized by the signals before bleaching. Finally, to correct for potential photo-bleaching, focus drift, and laser power fluctuations occurring during those fairly long recordings, the mean fluorescent signal of unbleached clusters was used to normalize the fluorescent signals of bleached clusters. The FRAP curves were fitted using the formula below, to extract the fast (m) and slow ($1-m$) fractions, the exchange rate for the faster fraction (k_{fast}) and slower (k_{slow}) fraction (Thoumine et al., 2006):

$$m [1 - \exp(-k_{fast} t)] + (1-m) [1 - \exp(-k_{slow} t)]$$

Single particle tracking experiments using Quantum dots

Purified Nr α 1 β -Fc (5 μ l, 0.2 mg/ml) or anti-HA antibody (1 μ l, 1 mg/ml) were mixed at room temperature for 30 min respectively to 655 nm Qdots coated with anti-human antibodies or Qdots coated with anti-mouse antibodies. Casein was added to the solution 15 min at room temperature, to reduce aspecific binding of Qdots. This solution was diluted 1/1000 in the extracellular mounting solution, and incubated 5 min at room temperature with the neurons that were then washed and mounted. Neurons were co-transfected with Homer1C-GFP and the relevant plasmids (see figure legends). To test the effect of soluble Nr α 1 β -Fc on anti-HA coated Qdots mobility, an acquisition was performed before and 10 min after the addition of multimeric Nr α 1 β -Fc or monomeric Nr α 1 β -Fc (5 μ l, 0.2 mg/ml).

Single particle tracking experiments using Qdots were performed on an Olympus IX 70 epifluorescence microscope equipped with a 100x/1.4 NA objective, a mercury lamp, and appropriate filter sets. Images were acquired with a CCD camera (cascade 512B, Photometrics, Roper scientific) at a frequency of 20 Hz. Qdots images were treated by a segmentation and tracking program written within Metamorph (Groc et al., 2007). The Homer1C-GFP images were treated using the same software to define synaptic and extrasynaptic locations. Trajectories interrupted by Qdot blinking were reconnected using a custom routine written for the Matlab software. The reconnected trajectories were analysed using a custom-made software (Serge et al., 2002). This software was used to determine: (i) The instantaneous diffusion coefficients (D) for Qdot traces in either synaptic or extrasynaptic locations, were calculated from linear fits of the mean squared displacement (MSD) versus time (t), using the equation $MSD(t) = \langle r^2 \rangle(t) = 4Dt$ and performing the fit on the first 8 data points. (ii) The confinement index and the confinement probability, which corresponds to the percentage of time spent in the confined state, using a method described earlier (Saxton, 1995; Serge et al., 2002; Simson et al., 1995). (iii) The MSD as function of the time interval as described in (Serge et al., 2002). The distributions of LOG(D) obtained for thousands Qdot trajectories were fitted by two Gaussian curves, allowing calculation of the fraction of confined events, with an associated error measuring the deviation between the theoretical curve and the experimental distribution. To compare conditions two by two, unpaired Student's t-tests were

performed on the diffusive fractions, using the errors from the fits and the number of bins (30) as the degree of freedom.

Acknowledgements

We acknowledge P. Scheiffele, O. Schluter, S. Okabe, N. Brose, C. Dotti, and A. Triller for the generous gift of reagents and animals.

We thank C. Breillat, A. Frouin, D. Bouchet, P. Gonzales and X. Fournet for technical assistance, M. Sainlos for the gift of PSD-mCherry and helpful discussions, M. Heine and K. Czondor for experimental contribution, all members of the D. Choquet laboratory for helpful discussions, and C. Poujol and P. Legros (Bordeaux Imaging Center) for help in FRAP experiments and image analysis.

The research leading to these results has received funding from the European Union's Seventh Framework Program under grant agreement n° 232942 Nano-Dyn-Syn, Centre National de la Recherche Scientifique, Agence Nationale pour la Recherche (grant Neuroligation), Conseil Régional Aquitaine, and Fondation pour la Recherche Médicale.

References

- Arac, D., Boucard, A. A., Ozkan, E., Strop, P., Newell, E., Sudhof, T. C., and Brunger, A. T. (2007). Structures of neuroligin-1 and the neuroligin-1/neurexin-1 beta complex reveal specific protein-protein and protein-Ca²⁺ interactions. **Neuron** 56, 992-1003.
- Barrow, S. L., Constable, J. R., Clark, E., El-Sabeawy, F., McAllister, A. K., and Washbourne, P. (2009). Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. **Neural Dev** 4, 17.
- Boucard, A. A., Chubykin, A. A., Comoletti, D., Taylor, P., and Sudhof, T. C. (2005). A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. **Neuron** 48, 229-236.
- Breillat, C., Thoumine, O., and Choquet, D. (2007). Characterization of SynCAM surface trafficking using a SynCAM derived ligand with high homophilic binding affinity. **Biochem Biophys Res Commun** 359, 655-659.
- Bresler, T., Ramati, Y., Zamorano, P. L., Zhai, R., Garner, C. C., and Ziv, N. E. (2001). The dynamics of SAP90/PSD-95 recruitment to new synaptic junctions. **Mol Cell Neurosci** 18, 149-167.
- Chen, X., Liu, H., Shim, A. H., Focia, P. J., and He, X. (2008). Structural basis for synaptic adhesion mediated by neuroligin-neurexin interactions. **Nat Struct Mol Biol** 15, 50-56.
- Chih, B., Engelman, H., and Scheiffele, P. (2005). Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. **Science** 307, 1324-1328.
- Chih, B., Gollan, L., and Scheiffele, P. (2006). Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. **Neuron** 51, 171-178.
- Chubykin, A. A., Atasoy, D., Etherton, M. R., Brose, N., Kavalali, E. T., Gibson, J. R., and Sudhof, T. C. (2007). Activity-Dependent Validation of Excitatory versus Inhibitory Synapses by Neuroligin-1 versus Neuroligin-2. **Neuron** 54, 919-931.
- Craig, A. M., and Kang, Y. (2007). Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. **Curr Opin Neurobiol** 17, 43-52.
- de Wit, J., Sylwestrak, E., O'Sullivan, M. L., Otto, S., Tiglio, K., Savas, J. N., Yates, J. R., 3rd, Comoletti, D., Taylor, P., and Ghosh, A. (2009). LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. **Neuron** 64, 799-806.
- Dean, C., Scholl, F. G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., and Scheiffele, P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. **Nat Neurosci** 6, 708-716.
- Friedman, H. V., Bresler, T., Garner, C. C., and Ziv, N. E. (2000). Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. **Neuron** 27, 57-69.
- Futai, K., Kim, M. J., Hashikawa, T., Scheiffele, P., Sheng, M., and Hayashi, Y. (2007). Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neuroligin. **Nat Neurosci** 10, 186-195.
- Giannone, G., and Sheetz, M. P. (2006). Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. **Trends Cell Biol** 16, 213-223.
- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S. X., Linhoff, M. W., and Craig, A. M. (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. **Cell** 119, 1013-1026.
- Groc, L., Lafourcade, M., Heine, M., Renner, M., Racine, V., Sibarita, J. B., Lounis, B., Choquet, D., and Cognet, L. (2007). Surface trafficking of neurotransmitter receptor: comparison between single-molecule/quantum dot strategies. **J Neurosci** 27, 12433-12437.
- Heine, M., Thoumine, O., Mondin, M., Tessier, B., Giannone, G., and Choquet, D. (2008). Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroligin contacts. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105, 20947-20952.
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T. W., and Sudhof, T. C. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. **Science** 277, 1511-1515.

Ko, J., Zhang, C., Arac, D., Boucard, A. A., Brunker, A. T., and Sudhof, T. C. (2009). Neuroligin-1 performs neurexin-dependent and neurexin-independent functions in synapse validation. **Embo J** 28, 3244-3255.

Leone, P., Comoletti, D., Ferracci, G., Conrod, S., Garcia, S. U., Taylor, P., Bourne, Y., and Marchot, P. (2010). Structural insights into the exquisite selectivity of neurexin/neuroligin synaptic interactions. **Embo J** 29, 2461-2471.

Levinson, J. N., Chery, N., Huang, K., Wong, T. P., Gerrow, K., Kang, R., Prange, O., Wang, Y. T., and El-Husseini, A. (2005). Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroligin-induced synaptic specificity. **J Biol Chem** 280, 17312-17319.

Levinson, J. N., Li, R., Kang, R., Moukhles, H., El-Husseini, A., and Bamji, S. X. (2010). Postsynaptic scaffolding molecules modulate the localization of neuroligins. **Neuroscience** 165, 782-793.

Lim, S. H., Kwon, S. K., Lee, M. K., Moon, J., Jeong, D. G., Park, E., Kim, S. J., Park, B. C., Lee, S. C., Ryu, S. E., *et al.* (2009). Synapse formation regulated by protein tyrosine phosphatase receptor T through interaction with cell adhesion molecules and Fyn. **Embo J** 28, 3564-3578.

Maness, P. F., and Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. **Nat Neurosci** 10, 19-26.

Miyamoto, S., Akiyama, S. K., and Yamada, K. M. (1995a). Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. **Science** 267, 883-885.

Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K., and Yamada, K. M. (1995b). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. **J Cell Biol** 131, 791-805.

Nam, C. I., and Chen, L. (2005). Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter. **Proc Natl Acad Sci USA** 102, 6137-6142.

Okabe, S., Urushido, T., Konno, D., Okado, H., and Sobue, K. (2001). Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. **J Neurosci** 21, 9561-9571.

Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Zhang, M., Paarmann, I., Fuchs, C., Harvey, K., *et al.* (2009). Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. **Neuron** 63, 628-642.

Saint-Michel, E., Giannone, G., Choquet, D., and Thoumine, O. (2009). Neurexin/neuroligin interaction kinetics characterized by counting single cell-surface attached quantum dots. **Biophys J** 97, 480-489.

Saxton, M. J. (1995). Single-particle tracking: effects of corrals. **Biophys J** 69, 389-398.

Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., and Serafini, T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. **Cell** 101, 657-669.

Schluter, O. M., Xu, W., and Malenka, R. C. (2006). Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. **Neuron** 51, 99-111.

Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Bredt, D. S., and Nicoll, R. A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. **Proc Natl Acad Sci USA** 99, 13902-13907.

Serge, A., Fourgeaud, L., Hemar, A., and Choquet, D. (2002). Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. **J Neurosci** 22, 3910-3920.

Simson, R., Sheets, E. D., and Jacobson, K. (1995). Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. **Biophys J** 69, 989-993.

Sudhof, T. C. (2008). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. **Nature** 455, 903-911.

Thoumine, O., Lambert, M., Mege, R. M., and Choquet, D. (2006). Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. **Mol Biol Cell** 17, 862-875.

Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Sudhof, T. C., and Brose, N. (2006). Neuroligins determine synapse maturation and function. **Neuron** 51, 741-754.

Figure captions

Figure 1: Live fluorescence imaging of PSD-95 clustering induced by Nlg1 aggregation

Neurons co-transfected with Nlg1 and PSD-95:GFP were incubated with Nr α 1 β ligands (A) or anti-HA antibodies (B), both pre-clustered by Cy5-conjugated antibodies. PSD-95:GFP images are shown just before (up), and 30 min after (middle up) cluster addition, with the corresponding Cy5 images showing micron size clusters (middle bottom). Merge between PSD-95:GFP (green) and Cy5 (red) channels (bottom). Scale bar, 5 μ m (on first image A). (C) Kinetics of formation of new PSD-95:GFP clusters, normalized by the number of pre-existing clusters, in conditions of cross-linked Nr α 1 β (red) or anti-HA (black). Individual time lapses are shown (thin lines) together with the average of 5-8 cells in each condition (thick lines). (D) Cumulative distributions of the ratio between PSD-95:GFP and Cy5 enrichments, which normalizes the level of Nlg1 aggregation. (E) Mean $\pm$ SEM of the ratio between PSD-95:GFP and Cy5 enrichment levels, for each treatment. Statistics are as follows: Nr α 1 β /Nlg1 (94 clusters; 6 cells); anti-HA/Nlg1 (101 clusters; 5 cells); Nr α 1 β /Nlg1- Δ Cter (88 clusters, 4 cells); Nr α 1 β /Nlg1/PDZ123 (78 clusters, 5 cells); anti-HA/Nlg1 plus multimeric Nr α 1 β (40 clusters, 3 cells); anti-HA/Nlg1 plus monomeric Nr α 1 β (90 clusters, 6 cells). Populations were analyzed by 1-way ANOVA and compared by Dunn's post -test (**P<0.001).

Figure 2: Differential mobility of ligand-occupied versus unoccupied Nlg1 molecules revealed by single nano-particle tracking

10-12 DIV neurons were co-transfected with Homer1C-GFP (grey pixels), and either Nlg1 WT (A, C) or Nlg1- Δ Cter (B). Cells were incubated with Qdots coated with anti-HA antibodies (A, B) or Nr α 1 β ligands (C). Qdots attached to a subset of surface diffusing Nlg1 molecules, were tracked at 20 Hz. Representative 2D trajectories are shown by blue traces, and confined episodes in red. Graphs display the corresponding instantaneous diffusion coefficient (blue curve) and the confinement index (red curve) over time, for each trajectory. Note that a decrease in diffusion coefficient is matched by a corresponding increase in confinement index, which measures significant deviation from an ideal Brownian behavior (see methods).

Unoccupied Nlg1 (QDHA) displayed few confined events (A). Unoccupied Nlg1- Δ Cter (QDHA) displayed almost no confined events (B). Occupied Nlg1 (QDNrx1 β) displayed repeated confined events (C). (D) Distributions of the diffusion coefficients on a logarithmic scale, in different conditions. The confined and diffusive events correspond respectively to the leftward and rightward populations fitted by Gaussian curves. Note the bigger kink in the red curve for lower diffusion coefficients (inset), corresponding to an increase in the number of confined events for occupied Nlg1. Note the respective absence of kink in the green curve (inset), corresponding to a huge decrease in the number of confined events for Nlg1- Δ Cter. (E) Percentage of confined events, for all conditions: Nlg1/QDHA (48 neurons, 3408 traces), Nlg1-SWAP/QDHA (39 neurons, 3435 traces), Nlg1- Δ Cter/QDHA (23 neurons, 5282 traces), Nlg1/QDNrx1 β (27 neurons, 2682 traces), Nlg1- Δ Cter/QDNrx1 β (18 neurons, 3092 traces). Populations were analyzed by 1-way ANOVA and compared by Dunn's post -test ($***P < 0.001$). The confined fractions obtained by double Gaussian fitting of the distributions were compared by unpaired Student t-tests ($**P < 0.01$; $****P < 0.0005$). No significant differences were found between Nlg1/QDHA and Nlg1-SWAP/QDHA ($P > 0.40$), and between Nlg1- Δ Cter/QDHA and Nlg1- Δ Cter/QDNrx1 β ($P > 0.25$). The difference between Nlg1WT and Nlg1- Δ Cter for QDHA was barely significant ($P = 0.1$). (F) MSD as function of time at the post-synapse. Nr1 β -bound Nlg1 displayed more confinement than anti-HA bound Nlg1 or Nlg1-SWAP, whereas Nlg1- Δ Cter showed very weak confinement, tending towards random diffusion with both types of Qdot coatings.

Figure 3: Live addition of soluble Nr1 β freezes the lateral motion of Nlg1 molecules

10-12 DIV neurons were co-transfected with Nlg1 and Homer1C-GFP, and incubated with Qdots coated with anti-HA antibodies. Qdot trajectories (red curves) were acquired before (A) or after 10 min incubation with soluble Nr1 β (B). Nlg1 molecules were mostly diffusive before addition of Nr1 β ligands, and became confined thereafter, mostly at Homer1c locations (grey pixels). (C, D) Corresponding instantaneous diffusion coefficients versus time. (E) Distributions of the diffusion coefficients before (black curve) and after (red curve) addition of Nr1 β multimers. Nlg1/QDHA (before multimeric Nr1 β -Fc, $D_{\text{conf}} = 15\%$, 7 neurons, 534 traces; after

multimeric Nr α 1 β -Fc, D_{conf} = 38%, 7 neurons, 498 traces). (F) Same analysis performed on neurons transfected with Nlg1- Δ Cter. Nlg1- Δ Cter/QDHA (before multimeric Nr α 1 β -Fc, D_{conf} = 7%, 8 neurons, 1425 traces; after multimeric Nr α 1 β -Fc, D_{conf} = 10%, 8 neurons, 1329 traces). (G) Ratio of the percentage of confined events, after versus before addition of Nr α 1 β ligands or a vehicle solution. Nlg1/QDHA (before monomeric Nr α 1 β -Fc, D_{conf} = 9%, 6 neurons, 534 traces; after monomeric Nr α 1 β -Fc, D_{conf} = 28%, 6 neurons, 498 traces); Nlg1/QDHA (before vehicle, D_{conf} = 19%, 10 neurons, 642 traces; after vehicle, D_{conf} = 17%, 10 neurons, 651 traces); Nlg1-SWAP/QDHA (before multimeric Nr α 1 β -Fc, D_{conf} = 9%, 5 neurons, 1425 traces; after multimeric Nr α 1 β -Fc, D_{conf} = 11%, 5 neurons, 1329 traces). The confined fractions determined by double Gaussian fitting were compared before and after treatment by Student's t-test (** P <0.0025; **** P <0.001). The vehicle solution had no significant effect on Nlg1 (P > 0.4), while addition of Nr α 1 β -Fc had no significant effect on Nlg1Swap (P > 0.25) or Nlg1- Δ Cter (P > 0.1).

Figure 4: Nlg1 phospho-mutants differentially recruit PSD-95

(A, B) Neurons co-transfected with PSD-95GFP plus Nlg1 WT or Nlg1 phospho mutants (Y782A or Y782D) were incubated with either Nr α 1 β -Fc or anti-HA antibodies, both cross-linked with cy5-labeled secondary antibodies. (A) Representative images for the Nr α 1 β -Fc condition. (B) Cumulative distributions of the PSD-95:GFP enrichment factor at Nr α 1 β -Fc clusters, or anti-HA clusters, respectively, for the three Nlg1 constructs. Populations were analyzed by non-parametric 1-way ANOVA and compared by Dunn's post test (Nr α 1 β clusters: WT vs YA not significant, WT or YA vs YD, P <0.001; HA clusters: WT vs YD not significant, WT or YD vs YA, P <0.001). (C) Neurons transfected with GFP alone, or co-transfected with GFP + Nlg1WT or Nlg1 phospho mutants (Y782A or Y782D) were immuno-stained for endogenous synaptotagmin and PSD-95. (D) Numbers of synaptotagmin or PSD-95 puncta per dendrite area, respectively, in all four conditions. Populations were analyzed by parametric 1-way ANOVA and Bonferroni post-test (** P <0.001). (E) Model summarizing the effects of Nlg1 aggregation versus Nr α 1 β binding on PSD-95 and gephyrin recruitment, depending on the tyrosine phosphorylation state of Nlg1.

Supplemental Figure 1: Nlg1 aggregates induced by β Nrx1-Fc or anti-HA cross-linking

6-7 DIV hippocampal neurons transfected with Nlg1:GFP were treated for 30 min with Nrx1 β (A) or anti-HA (B) cross-linked with Cy5-conjugated secondary antibodies. Nlg1:GFP shows a fairly diffuse membrane distribution at this stage (left panels). After 30 min treatment, both cross-linked Nrx1 β and anti-HA induced a prominent and fast formation of Nlg1:GFP aggregates (middle panels), which co-localized almost perfectly with Cy5-labeled surface clusters (right panels). Scale bar, 5 μ m. (C) Number of Nlg1:GFP clusters induced by cross-linked Nrx1 β or anti-HA for 30 min, normalized by the number of pre-existing Nlg1:GFP clusters ($P > 0.05$ by unpaired t-test). (D) Cumulative distributions of the size of clusters induced by Nrx1 β or anti-HA. The size distribution were similar in both conditions (unpaired t test, $P > 0.05$). (E) The mean enrichment factor of Nlg1:GFP at contact sites compared to the surrounding Nlg1:GFP was higher for cross-linked Nrx1 β (ratio 5.3 $\pm$ 0.3; 48 clusters; 4 cells) than for cross-linked anti-HA (2.8 $\pm$ 0.1, 66 clusters; 5 cells). However, the ratio between Nlg1:GFP and Cy5-labelled secondary antibodies enrichment for either Nrx1 β (0.74 $\pm$ 0.03; 48 clusters; 4 cells) or anti-HA antibodies (0.72 $\pm$ 0.04; 66 clusters; 5 cells), were identical (unpaired t test, $P > 0.05$). Thus, the Cy5 signal was used thereafter to normalize the amount of Nlg1 contained at contact sites in both conditions.

Supplemental Figure 2: Co-localization of pre-existing PSD-95 clusters with Homer-1c and synapsin

(A, B) 6-7 DIV neurons co-transfected with PSD-95:GFP and Nlg1 were immunostained for synapsin (Alexa 568) before (B) or after (C) the aggregation of Nlg1 by Nrx1 β cross-linking. Contrary to pre-existing PSD-95 clusters, newly formed PSD-95 clusters did not co-localize with synapsin (arrows). (C) 10 DIV hippocampal neurons were co-transfected with PSD-95-mcherry and Homer-1C-GFP. Images taken from both channels show a good co-localization of the two proteins. Scale bars, 5 μ m.

Supplemental Figure 3: Quantification of enrichment factors

6-7 DIV hippocampal neurons co-transfected with PSD-95:GFP and Nlg1 (A, B) or Nlg1- Δ Cter (C) were treated for 30 min with Nrx1 β (A,C) or anti-HA (B) cross-linked

with Cy5-conjugated secondary antibodies (schematic diagrams on the left). PSD-95:GFP aggregates (left), Cy5 clusters as raw and segmented images (middle), and mask superimposed to the PSD-95:GFP image (right). Cy5-labeled Nr x 1 β clusters which reflect Nlg1 aggregation, are co-localized with intense PSD-95:GFP clusters, whereas Cy5-labeled anti-HA clusters recruit less PSD-95:GFP. Cy5-labeled Nr x 1 β clusters recruit very faint PSD-95:GFP fluorescence when cells express Nlg1- Δ Cter. Scale bar, 5 μ m. (D) Neurons expressing Nlg1WT were incubated with cross-linked Nr x 1 β for 10 min or 1 hr, then co-immunostained for surface Nlg1 and endogenous PSD-95. The enrichment of endogenous PSD-95 at Cy5 clusters was quantified using the procedure illustrated in (A-C), giving values of 1.20 ± 0.02 ($n = 510$ clusters, 4 cells) at 10 min and 1.60 ± 0.03 ($n = 432$ clusters, 5 cells) at 1 hr ($P < 0.0001$ by unpaired t-test).

Supplemental Figure 4: No influence of endogenous Nlg1 on the differential recruitment of PSD-95 by Nr x 1 β -Fc versus anti-HA clusters

Primary neurons from Nlg1 KO mice were co-transfected with Nlg1-HA and PSD-95:GFP at DIV 5, and incubated at DIV 8 with either Nr x 1 β -Fc (A) or anti-HA (B) cross-linked with Cy5 labeled secondary antibodies. (C) The enrichment of PSD-95:GFP at Nr x 1 β -Fc (black curve) or anti-HA (red curve) clusters was quantified and presented as cumulative distributions. Populations were compared using a non-parametric Mann-Whitney t-test ($P < 0.0001$, 309 anti-HA clusters versus 349 Nr x 1 β clusters, out of 6 and 7 cells, respectively). Live surface labelling of untransfected neurons with soluble Nr x 1 β followed by Cy3-conjugated anti-human was 5-fold lower in cultures from Nlg1 KO mice compared to Nlg1 WT littermates (intensity values 71 ± 6 A.U. $n = 11$ cells vs 492 ± 90 A.U, $n = 21$ cells, $P < 0.0001$ by unpaired t-test), indicating that endogenous Nlg1 was the most abundant counter-receptor for Nr x 1 β in these cells.

Supplemental Figure 5: Reduction of Nr x 1 β -Fc multimers into Nr x 1 β -Fc monomers

Nr x 1 β -Fc was separated by SDS-PAGE under non-reducing conditions. Western blots of purified Nr x 1 β -Fc, revealed using an anti-human Fc antibody, before (left lane) and after Fc reduction (right lane) using DTT. Before reduction, both monomeric

and multimeric forms of Nr α 1 β -Fc were present. After DTT treatment, all the multimeric Nr α 1 β -Fc was reduced to monomeric Nr α 1 β -Fc. To check if monomeric Nr α 1 β -Fc could re-multimerize over time, we let the purified protein solution for 4 hr or 24 hr in culture medium before running the gel. Note that the monomeric form stays predominant. The molecular weight standards are shown on the left.

Supplemental Figure 6: FRAP experiments at Nlg1 aggregates formed with cross-linked Nr α 1 β or anti-HA

(A) 6-7 DIV neurons were co-transfected with Nlg1 and PSD-95:GFP and treated for 1 h with either Nr α 1 β -Fc ligands or anti-HA antibodies cross-linked with Cy5-conjugated secondary antibodies. Example of PSD-95:GFP clusters (left) induced by Cy-5 labeled cross-linked Nr α 1 β -Fc (middle), and merge image (right). (B) Representative FRAP experiment on the same sample shown in (A). The dashed circle corresponds to the region that was bleached. PSD-95:GFP fluorescent signal before bleach (left), just after bleach (middle), and 30 min after (right). Scale bar, 2 μ m. (C) FRAP curves on PSD-95:GFP obtained in conditions of cross-linked Nr α 1 β (red) or anti-HA (black). (D) FRAP curves on Nlg1:GFP obtained in conditions of cross-linked Nr α 1 β or anti-HA. Control fluorescence measurements were also made on Nlg1:GFP or PSD-95:GFP clusters which were not photo-bleached (grey curves), indicating minor fluorescence decay in the same acquisition period. All data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Supplemental Figure 7: Increased confinement of Nlg1 at synapses depends on interaction with PSD-95

Distributions of diffusion coefficients, on a logarithmic scale, for synaptic (red curves), extra-synaptic (blue curves), and total (black curves) trajectories. Both unoccupied Nlg1 (QDHA) (A), unoccupied Nlg1-SWAP (QDHA) (C) and occupied Nlg1 (QDNr α 1 β) (B) displayed more confined events for the synaptic compared to extra-synaptic location. However, no differences were found between synaptic and extra-synaptic locations for unoccupied Nlg1- Δ Cter (QDHA) (D). Those results support that the increased confinement of Nlg1 at synapses depends on an interaction between Nlg1 and PSD-95. (E) Distributions of diffusion coefficients on a logarithmic scale, in different conditions. The distributions were fitted by two Gaussian curves (dotted

lines) corresponding to confined (left) and diffusive (right) events. (F) Cumulative distributions of the confinement probability for all conditions. Ligand-occupied Nlg1 (QDNrx1 β) (red curve) were more often confined than unoccupied Nlg1 (QDHA) (black curve). However, no differences were found between unoccupied Nlg1 and unoccupied Nlg1-SWAP (QDHA) (blue curve). Unoccupied Nlg1- Δ Cter (QDHA) (green curve) were mostly diffusive.

Supplemental Figure 8: Effect of PSD-95 expression level and tyrosine mutations on the surface mobility of Nlg1

(A, B) Primary rat neurons were co-transfected with Nlg1-HA plus either shRNA against PSD-95, or a control plasmid in which endogenous PSD-95 was replaced by PSD-95:GFP. Immuno-staining of endogenous PSD-95 gave fluorescence intensity values of 43 ± 5 arbitrary units for neurons expressing shPSD-95, and 142 ± 18 A.U. for untransfected counterparts ($P < 0.0001$ by paired t-test, $n = 11$ cells), corresponding to a 70% down-regulation (not shown). these two conditions, and compared with control neurons co-transfected with Nlg1WT and Homer1c:GFP. (A) The instantaneous diffusion coefficients in the 3 conditions were plotted as cumulative distributions (2367 Qdot traces for the shPSD-95 condition, 2393 traces for repl-PSD-95, 2682 traces for Homer-GFP out of 6, 7, and 27 neurons, respectively). (B) Percentage of confined events, determined by double Gaussian fitting, for the three conditions. Conditions were compared two by two by unpaired Student's t-test (* $P < 0.05$; *** $P < 0.0025$). (C,D) Neurons were co-transfected with Homer1c:GFP and either Nlg1 WT, Y782A, or Y782D, and the surface diffusion of Nlg1 was measured using Nr $x1\beta$ -coated Qdots. (C) Distributions of diffusion coefficients (1505 Qdot traces for the Nlg1WT, 1284 traces for Y782A, and 1448 traces for Y782D). (D) Percentage of confined events, for the 3 conditions (WT vs Y782A : $P > 0.4$, WT vs Y782D and Y782D vs Y782A: $P = 0.1$).

Supplemental Figure 9: Nlg1 phospho-mutants differentially recruit PSD-95 and gephyrin

(A) Representative images of neurons co-transfected with PSD95-GFP plus Nlg1 WT or Nlg1 phospho-mutants (Y782A or Y782D), and incubated with anti-HA antibodies cross-linked with Cy5-labeled secondary antibodies. (B, C) Neurons co-transfected at

DIV 5 with gephyrin-venus + Nlg1 WT or Nlg1 phospho-mutants (Y782A or Y782D) were incubated at DIV 8 with Nr α 1 β -Fc cross-linked with Cy5-labeled secondary antibodies. (B) Representative images. (C) Cumulative distributions of the gephyrin-venus enrichment factor at Nr α 1 β -Fc clusters for the three Nlg1 constructs. Populations were analyzed by non-parametric 1-way ANOVA and compared by Dunn's post test (Nr α 1 β clusters: WT vs YD not significant, WT or YD vs YA, $P < 0.001$). (D-F) Neurons transfected at DIV 5-6 with GFP alone, or co-transfected with GFP + Nlg1 WT or Nlg1 phospho mutants (Y782A or Y782D) were immunostained at DIV 9-10 for endogenous synaptotagmin and gephyrin. (D) Representative images. (E, F) Numbers of synaptotagmin or gephyrin puncta per dendrite area, in the 4 conditions. Populations were analyzed by parametric 1-way ANOVA and Bonferroni post-test ($***P < 0.001$).

Supplemental Table 1: Fraction and turnover rate of Nlg1:GFP and PSD-95:GFP trapped at Nr α 1 β clusters

Parameters calculated from FRAP experiments are given as mean $\pm$ sem. (*) The slowly exchanging fraction and turnover rate for PSD-95 are significantly different between anti-HA and Nr α conditions (unpaired t test, $P < 0.05$), whereas they are not statistically different for Nlg1:GFP.

Transfection	Condition	Slow fraction	Turnover rate (hr^{-1})	# clusters (# cells)
Nlg1 :GFP	Nr α 1 β	$88 \pm 2 \%$	0.23 ± 0.05	20 (4)
	anti-HA	$85 \pm 2 \%$	0.23 ± 0.09	18 (4)
PSD-95:GFP	Nr α 1 β	$83 \pm 1 \%$	0.47 ± 0.05	47 (6)
	anti-HA	$76 \pm 2 \%^*$	$1.02 \pm 0.12^*$	59 (8)

Supplemental movie 1: Nlg1 aggregates induced by β Nrx1-Fc

Time-lapse fluorescence imaging of a neuron transfected with Nlg1:GFP and treated with Nrx1 β cross-linked with Cy5-conjugated secondary antibodies. At the beginning of the recording, Nlg1:GFP shows a fairly diffuse membrane distribution, cross-linked Nrx1 β induced a prominent and fast formation of Nlg1:GFP aggregates. The movie is lasting 1760 s. Scale bar, 5 μ m.

Supplemental movie 2: Nlg1 aggregation and binding to Nrx1 β ligands induces the fast formation of PSD-95:GFP clusters.

Time-lapse fluorescence imaging of neurons co-transfected with Nlg1 and PSD-95:GFP and incubated with Nrx1 β ligands (left) or anti-HA antibodies (right), both pre-clustered by Cy5-conjugated antibodies. At the beginning of the recordings, PSD-95:GFP is fairly diffuse except in pre-existing PSD-95 clusters. Cross-linked Nrx1 β induced a prominent and fast formation of new PSD-95:GFP clusters (left). However, cross-linked anti-HA do not induce the formation of new PSD-95:GFP clusters (right). The movies are lasting 1700 s. Scale bar, 5 μ m.

Figure 1

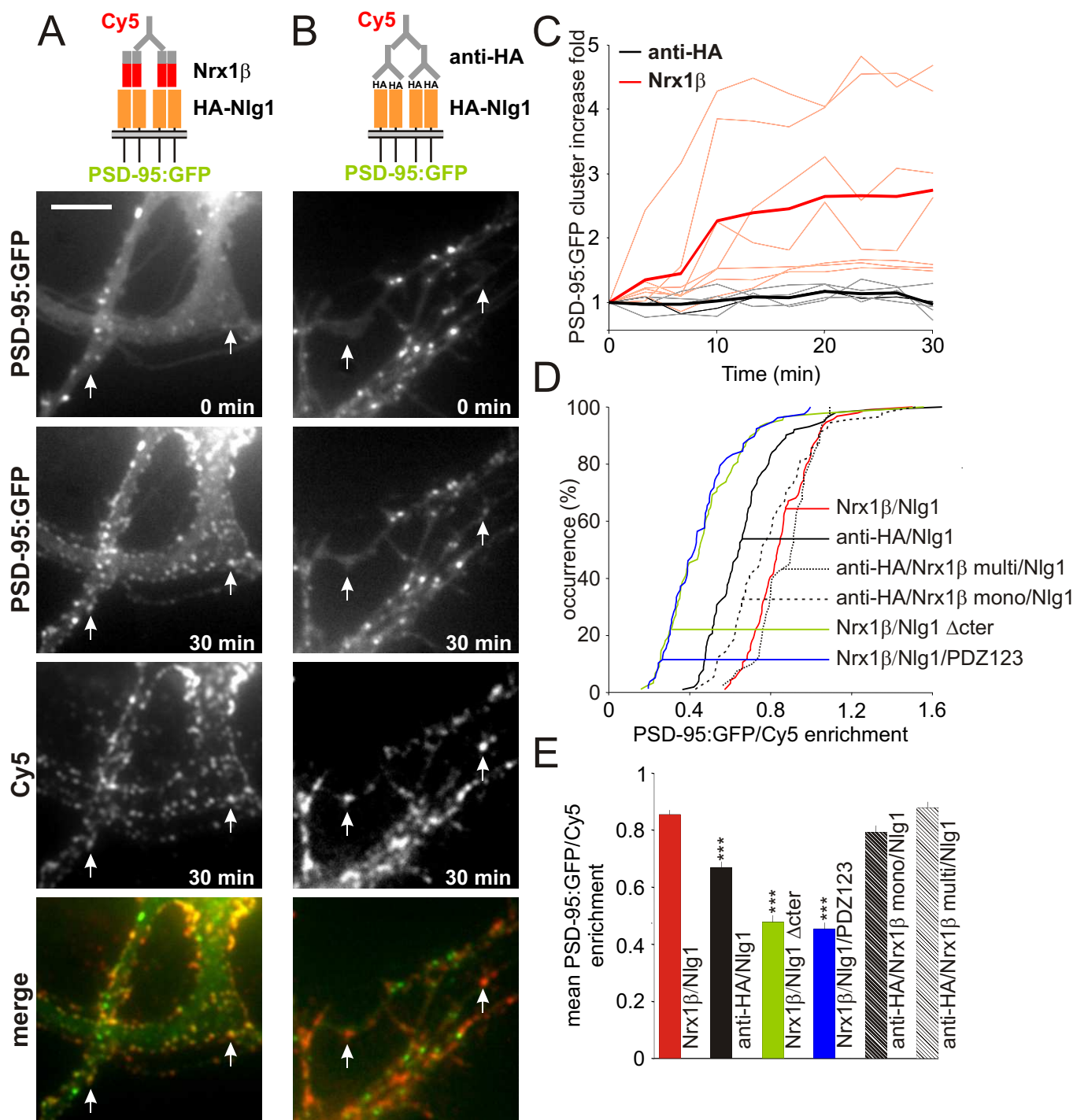


Figure 2

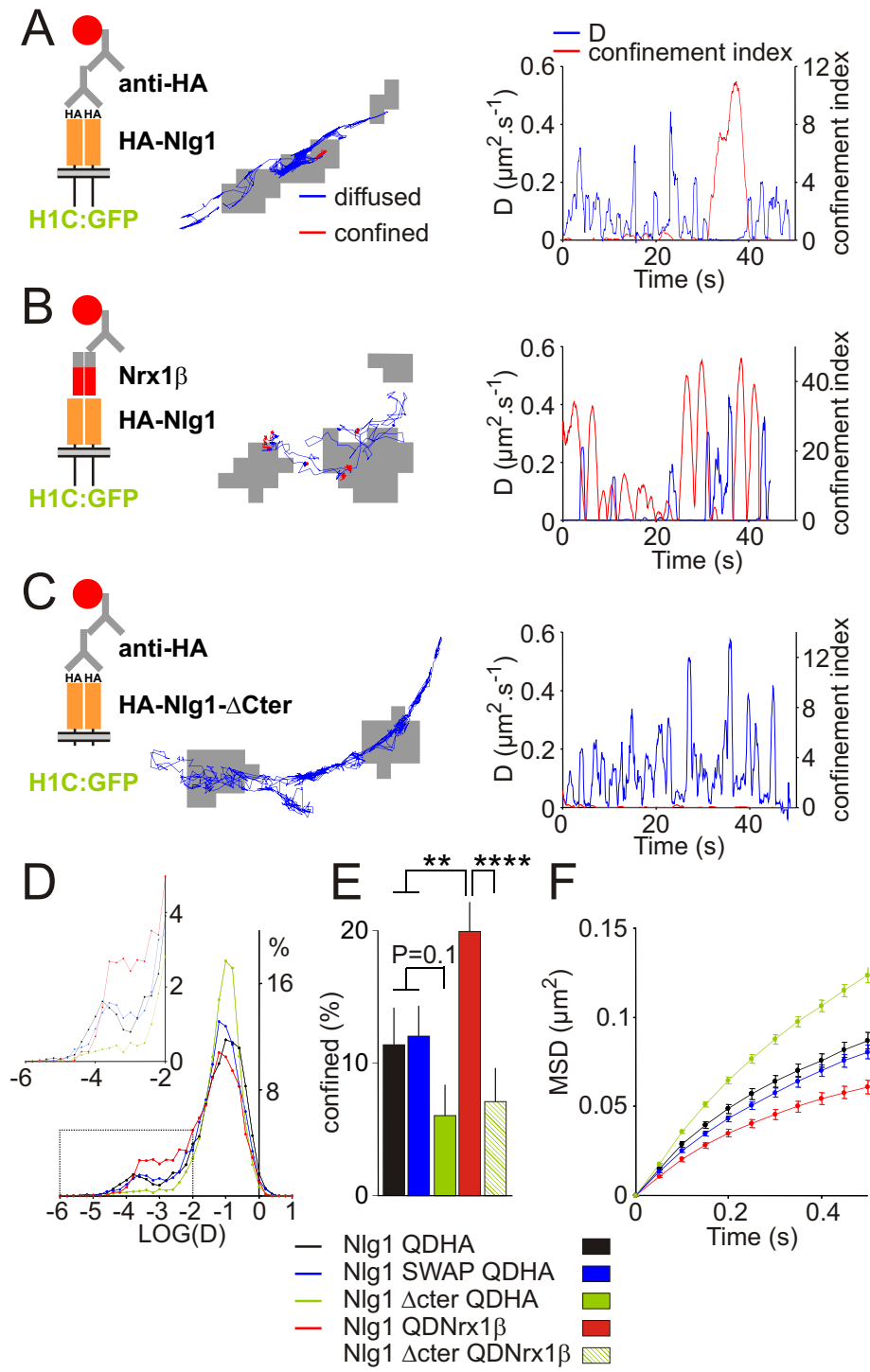


Figure 3

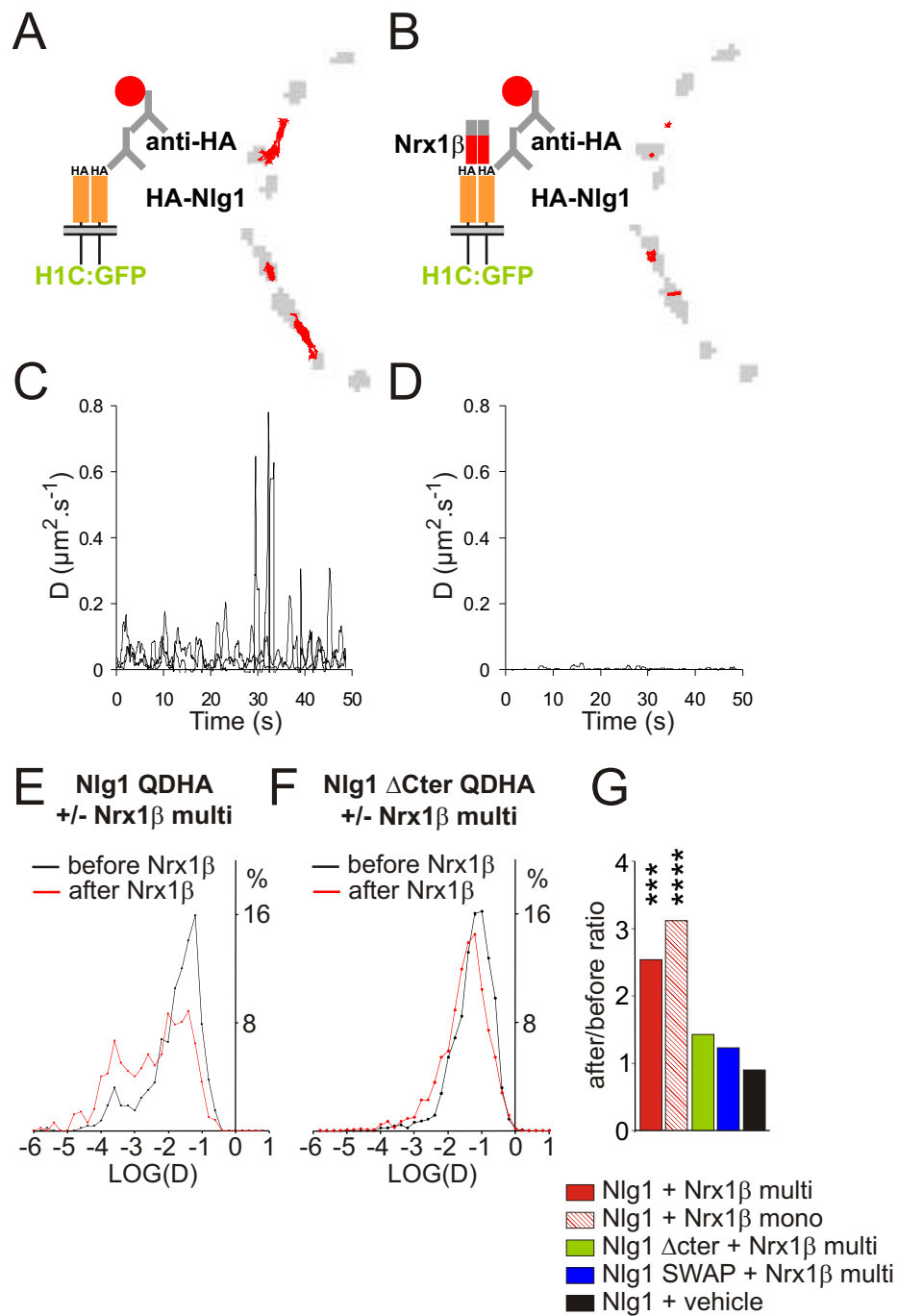
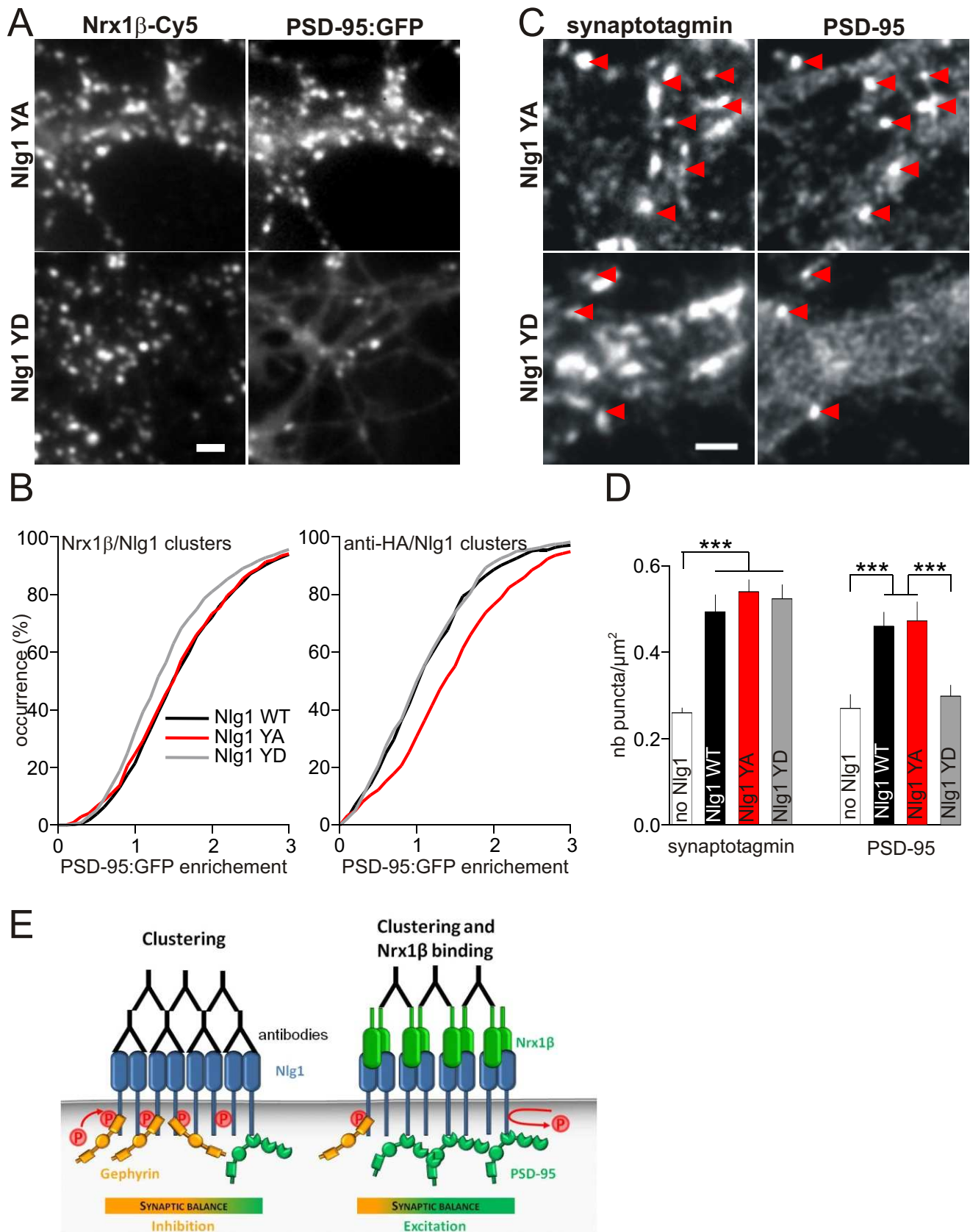
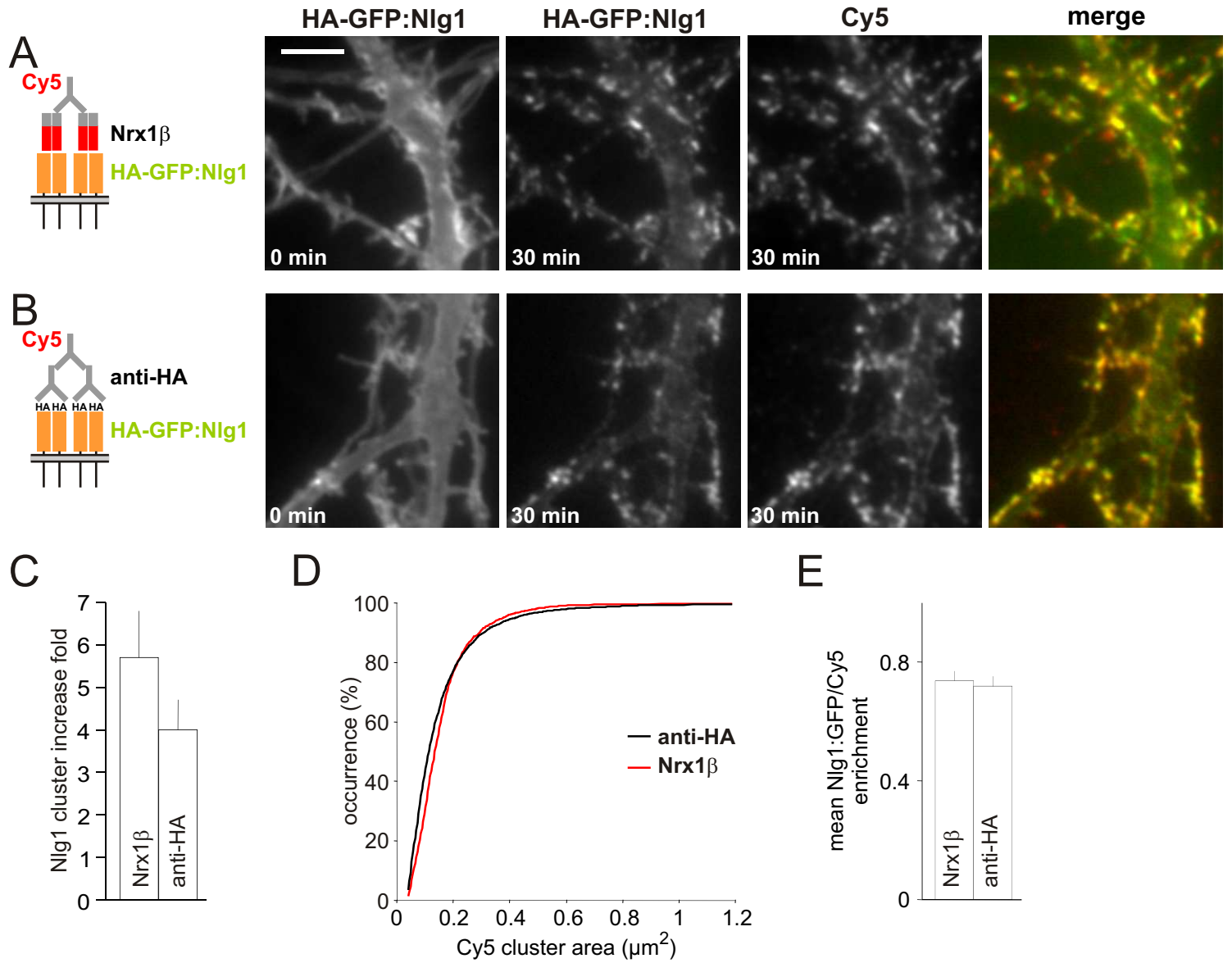


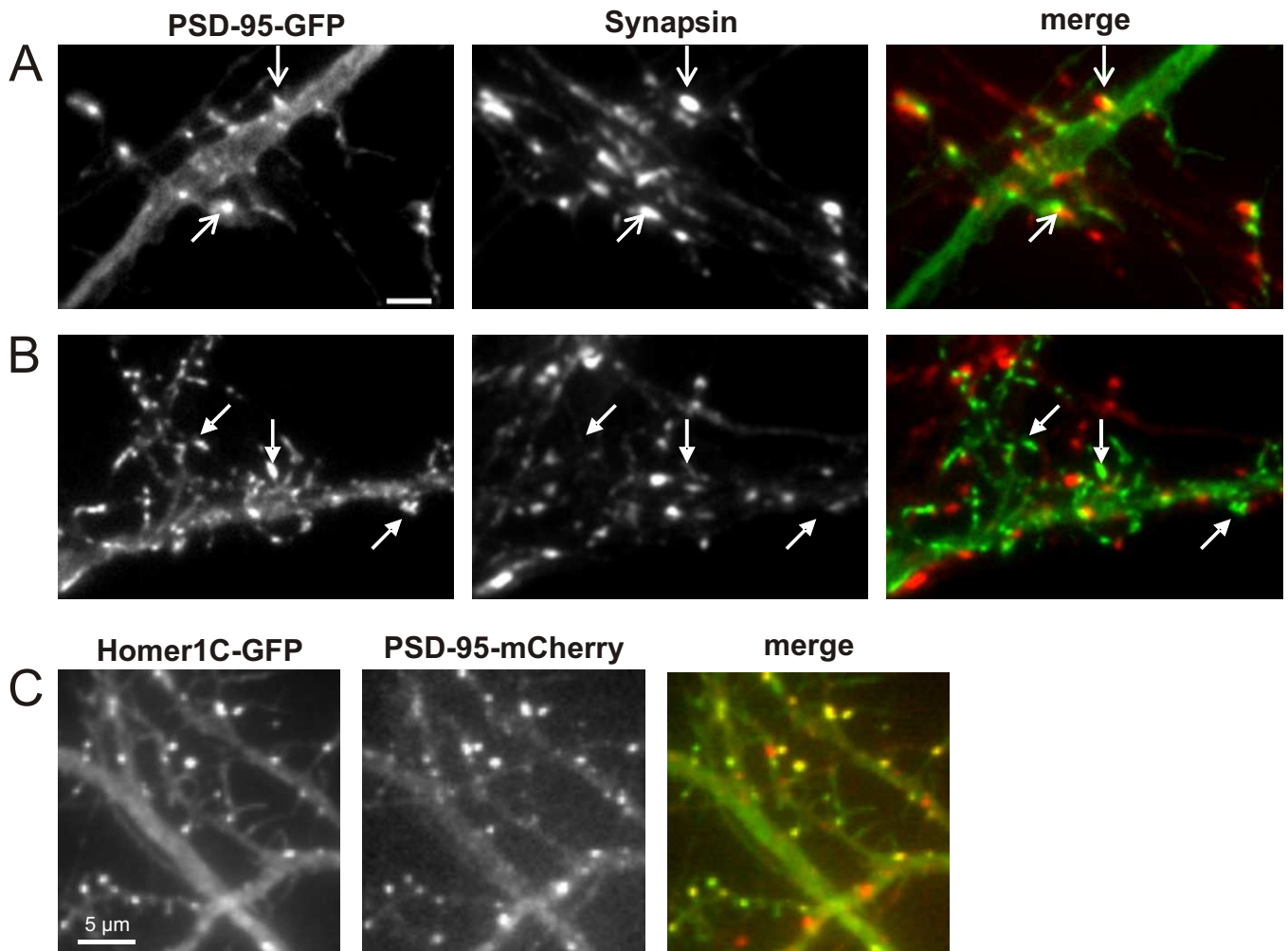
Figure 4



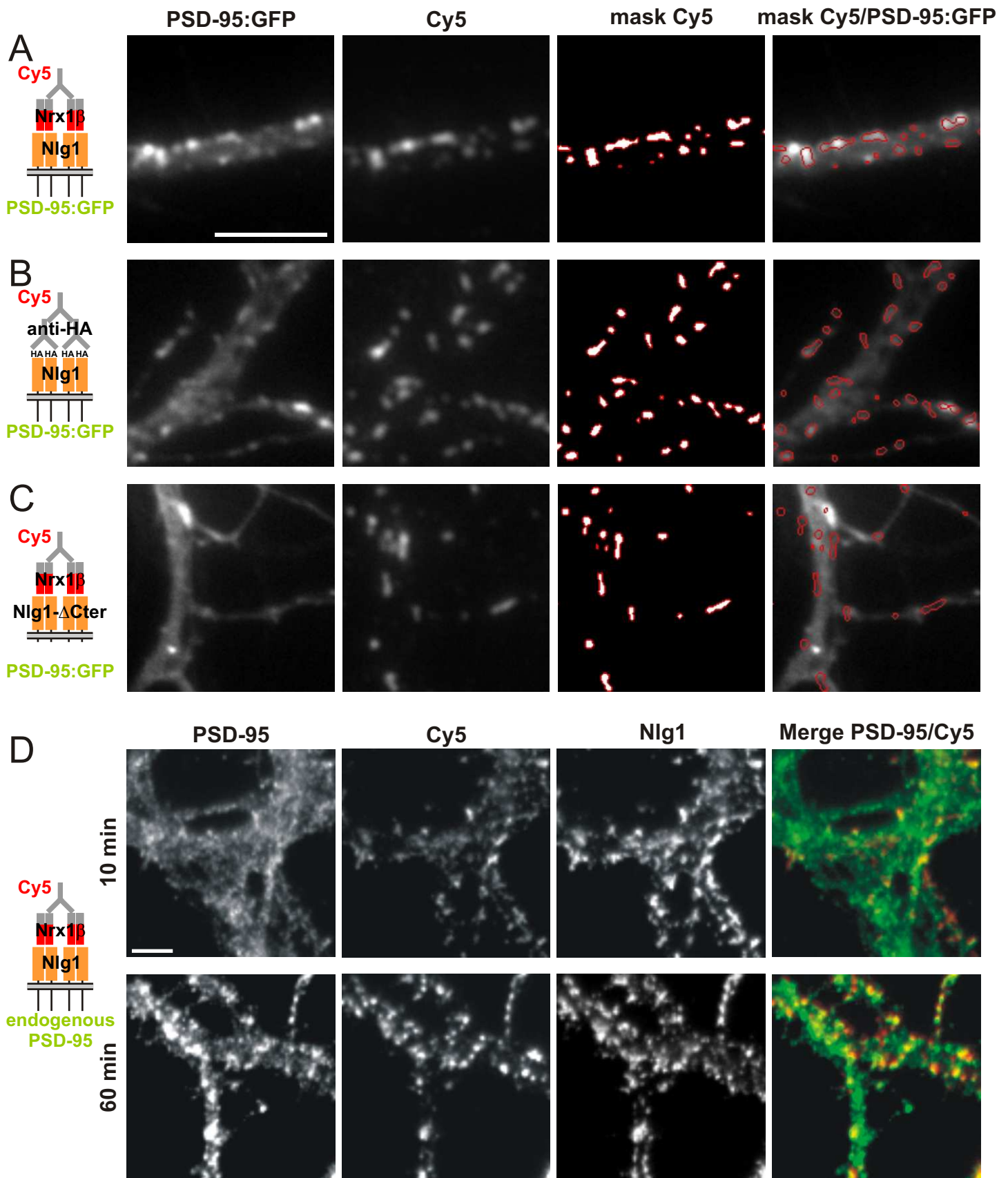
Supplemental Figure 1



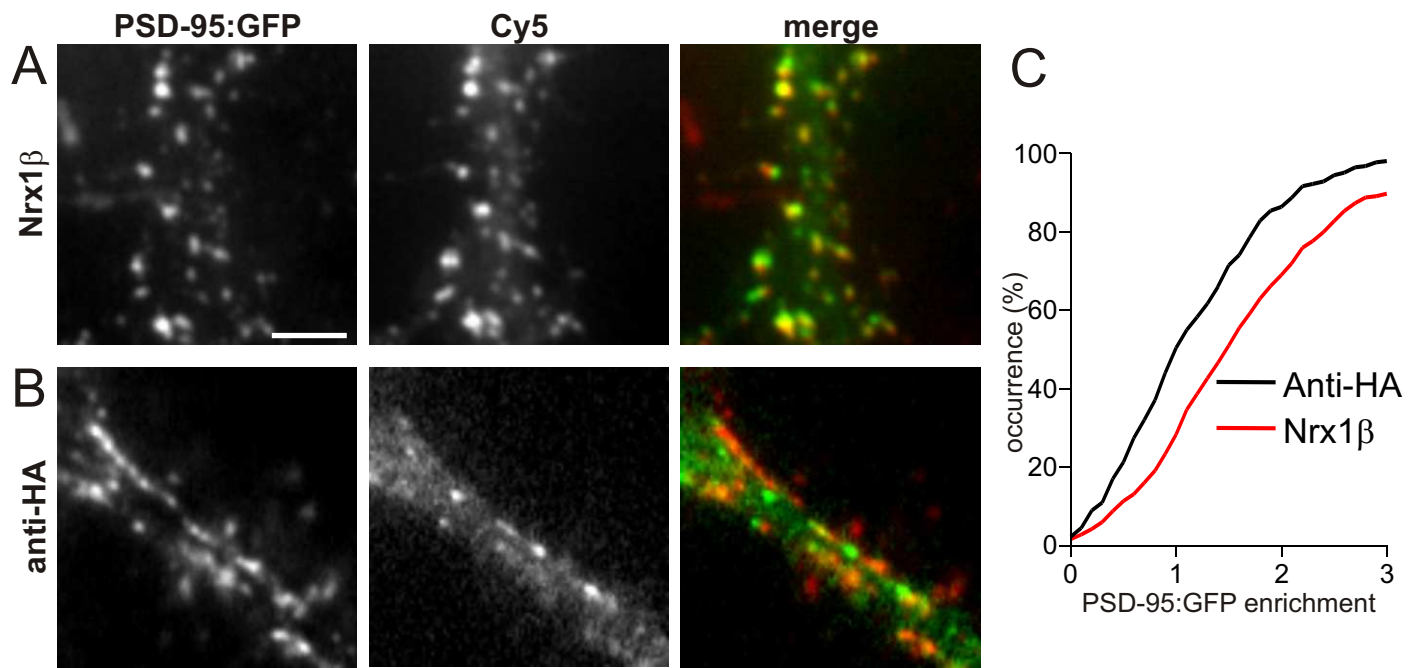
Supplemental Figure 2



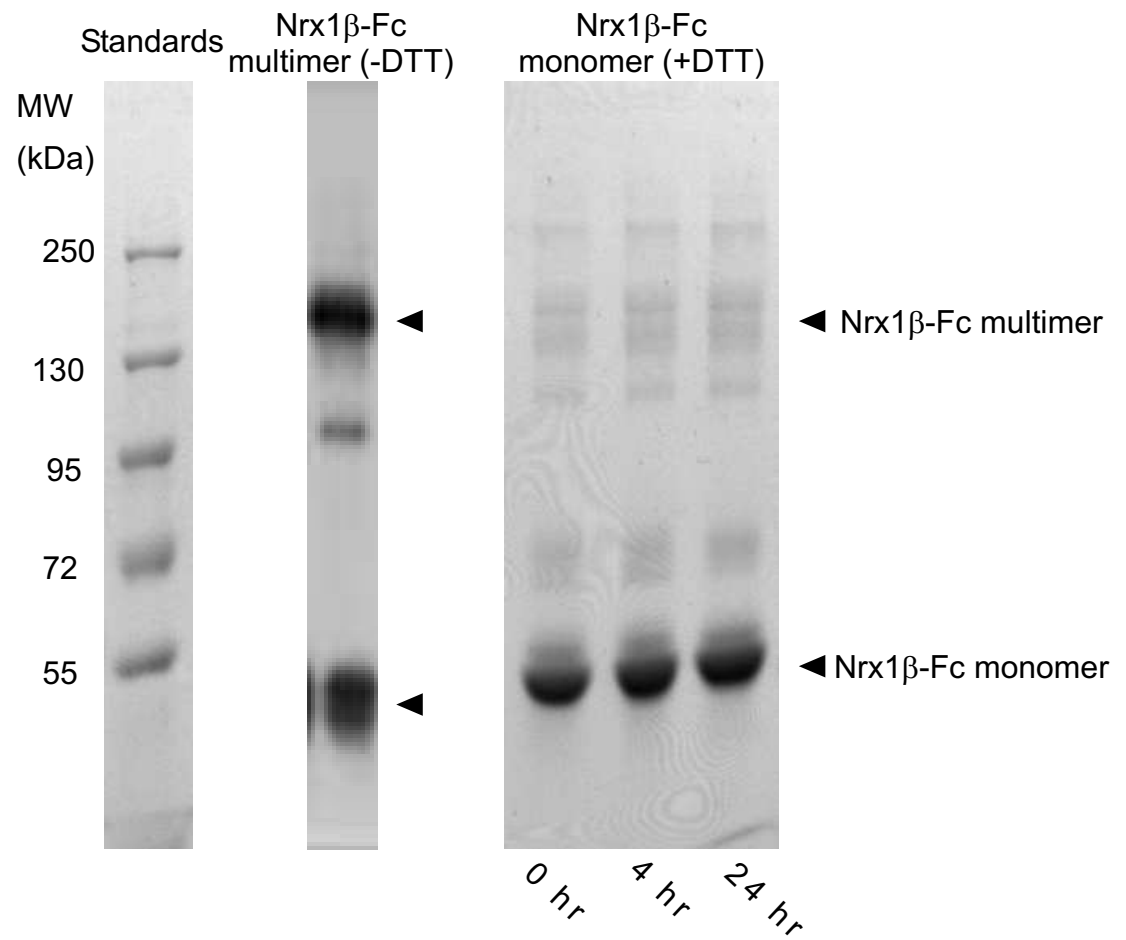
Supplemental Figure 3



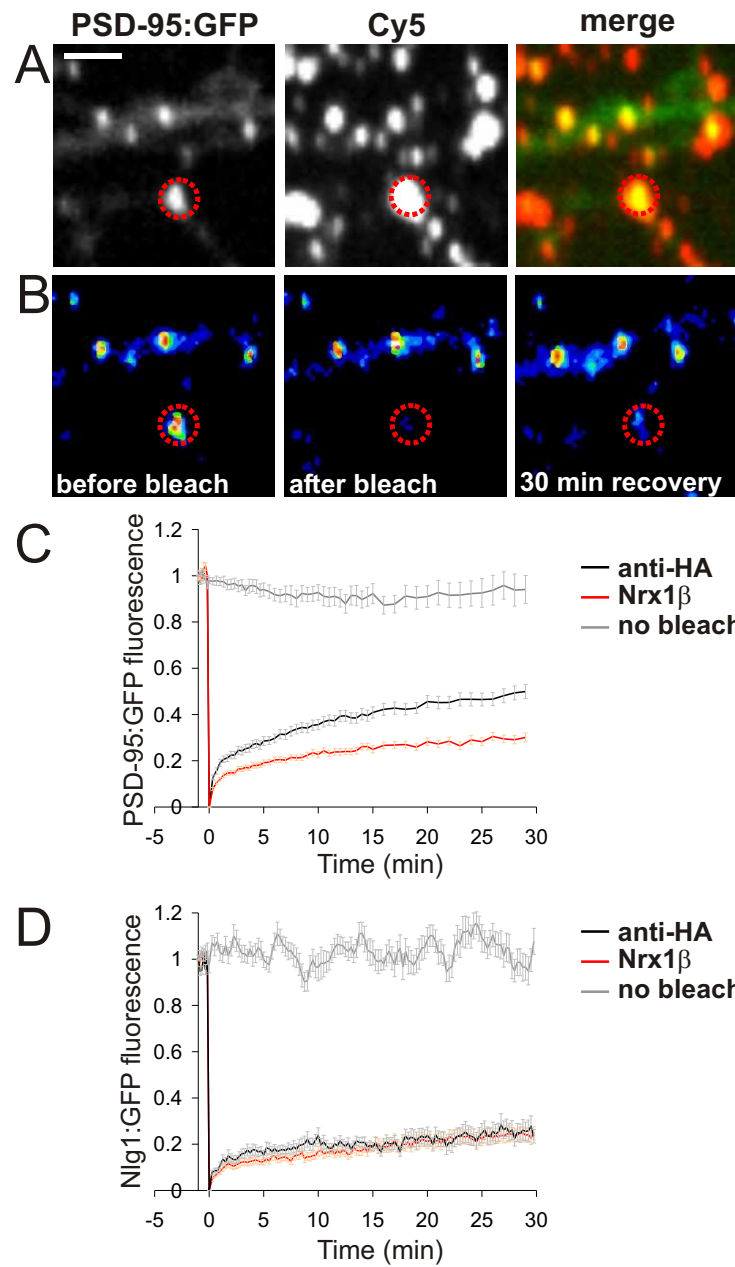
Supplemental Figure 4



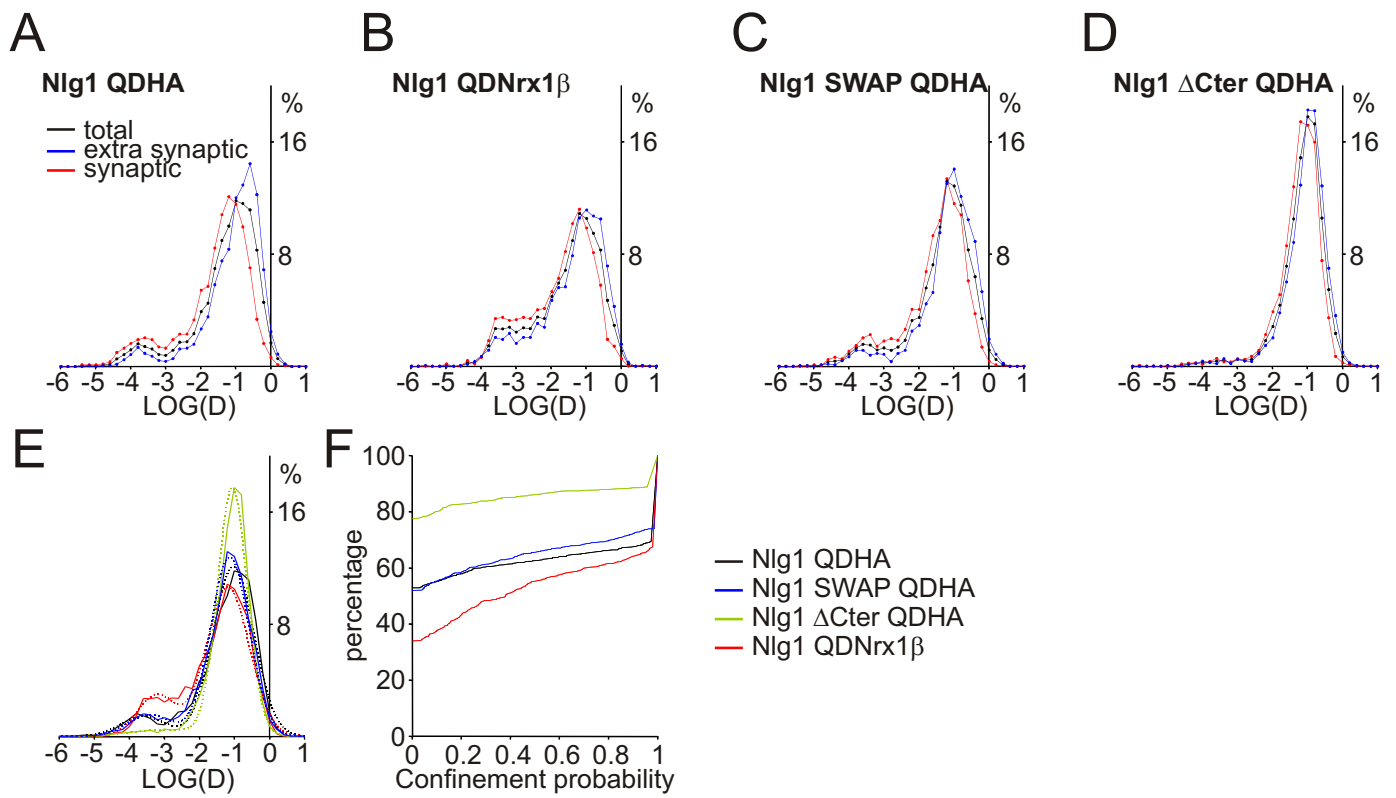
Supplemental Figure 5



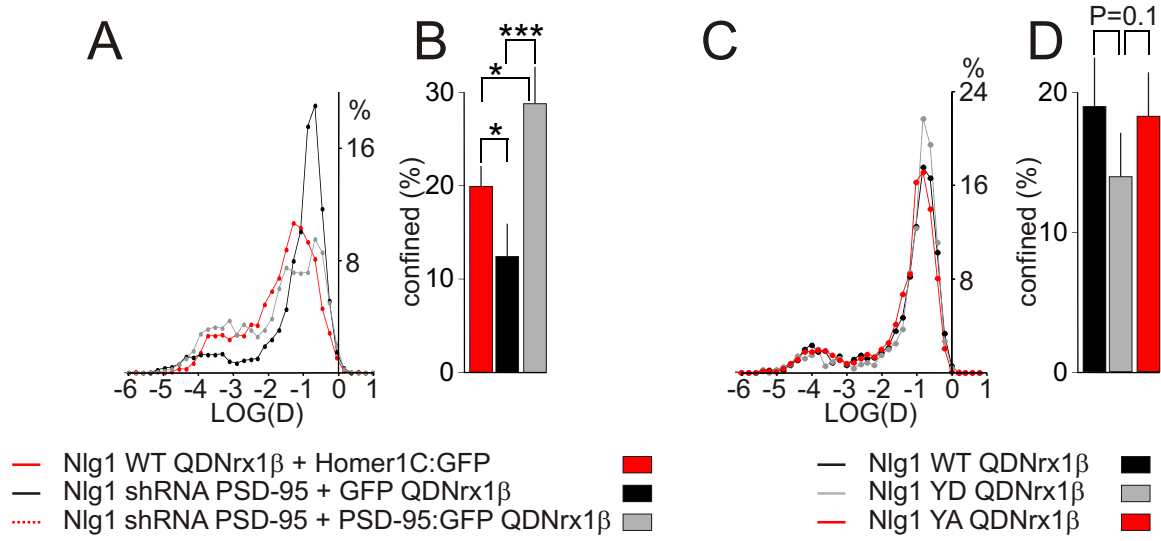
Supplemental Figure 6



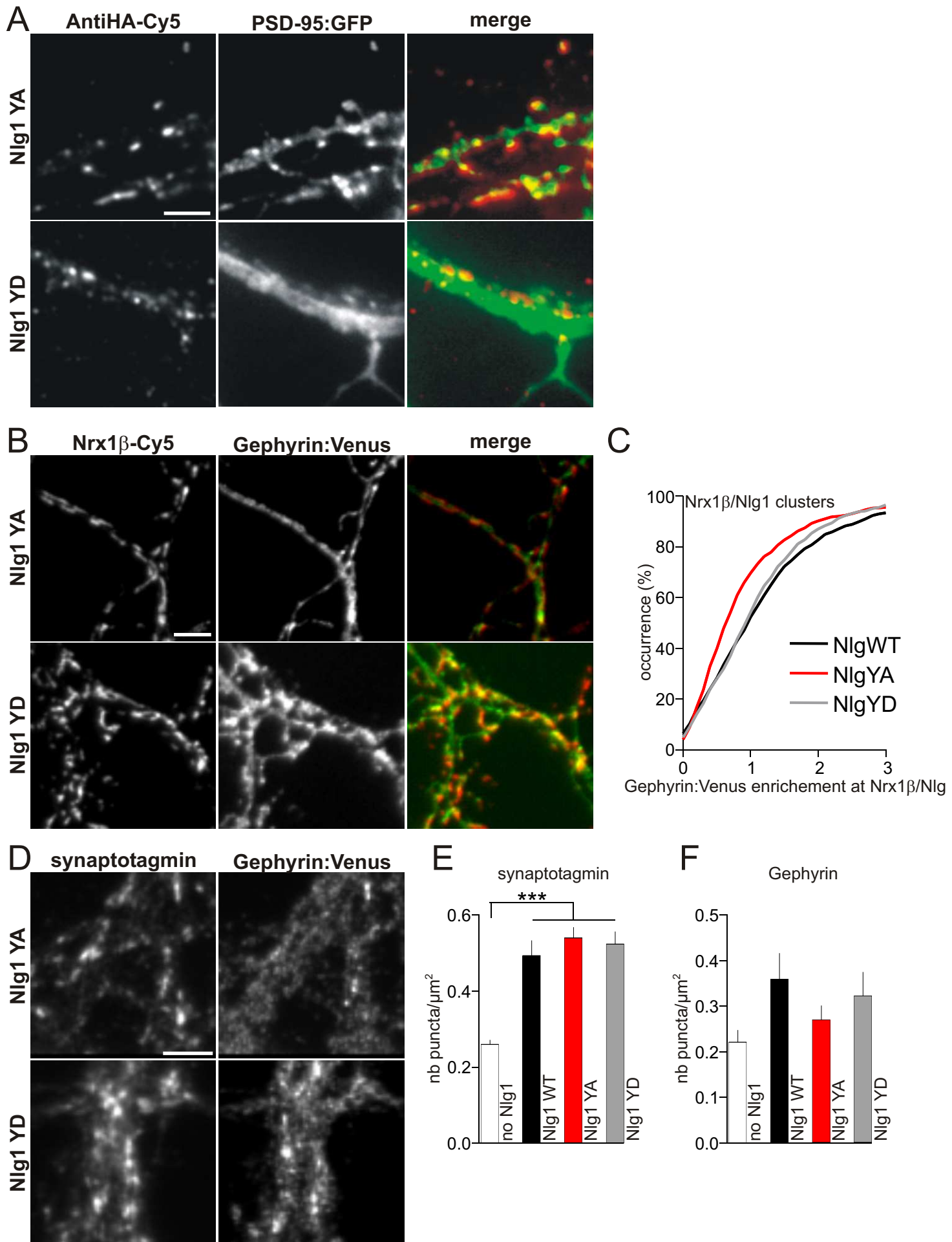
Supplemental Figure 7



Supplemental Figure 8



Supplemental Figure 9



III. Article 3: Neurexin-neuroligin adhesions capture AMPA receptors through PSD-95

Magali Mondin, Eric Hosy, Martin Heine, Florian Levet, Christel Poujol, Christophe Blanchet, Daniel Choquet et Olivier Thoumine. (Soumis)

A. Problématique

Les modèles de co-culture et de formation d'hémi synapses avec des billes recouvertes de Nr $x1\beta$ ou de Nlg1, ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel du complexe Nr $x1\beta$ /Nlg1 dans la formation de nouveaux contacts synaptiques. La différenciation post-synaptique se caractérise par l'accumulation de PSD-95, de rAMPA et de rNMDA fonctionnels aux contacts Nr $x1\beta$ /Nlg1 (Heine et al., 2008a). Alors que les rNMDA semblent être adressés aux synapses naissantes en agrégats pré-assemblés (Barrow et al., 2009), les mécanismes ainsi que les acteurs moléculaires du recrutement des rAMPA aux contacts Nr $x1\beta$ /Nlg1 ne sont pas encore connus. Une étude précédemment menée dans le laboratoire a permis de montrer que les rAMPA diffusant à la surface des neurones sont spécifiquement piégés au niveau des synapses via l'interaction de leur sous-unité auxiliaire la stargazine avec PSD-95 (Bats et al., 2007). Nous avons donc testé l'hypothèse que le recrutement des rAMPA aux contacts Nr $x1\beta$ /Nlg1 mettait en jeu un mécanisme de diffusion/piégeage par PSD-95.

B. Résultats majeurs

Dans cette étude, nous avons utilisé différentes techniques pour induire ou perturber les adhésions Nr $x1\beta$ /Nlg1. Nous avons ainsi utilisé différentes constructions permettant de surexprimer Nlg1 sauvage ou mutée pour l'interaction avec Nr $x1\beta$ ou PSD-95. De manière complémentaire, nous avons utilisé des shRNA pour induire une délétion aigüe de Nlg1 ou de PSD-95, ainsi que des souris Nlg1 KO pour étudier le rôle de ces interactions dans un modèle de délétion chronique. Enfin, pour induire spécifiquement les adhésions Nr $x1\beta$ /Nlg1 et étudier les mécanismes de recrutement des rAMPA, nous avons utilisé de la Nr $x1\beta$ purifiée agrégée par un anticorps secondaire sur des neurones d'hippocampe en culture (7-8 DIV). Dans un premier temps, nous avons étudié la diffusion latérale des rAMPA endogènes à la surface des neurones en couplant des Quantum Dots à un anticorps dirigé contre la sous-unité GluA2. En faisant varier l'expression de Nlg1 (surexpression, shRNA, culture de

neurones Nlg1 KO), nous avons pu mettre en évidence une corrélation inverse entre le coefficient de diffusion des rAMPA dans la membrane plasmique et le niveau d'expression de Nlg1. En effet, une surexpression de Nlg1 induit une immobilisation des rAMPA, alors qu'une délétion de Nlg1 induit une augmentation de leur diffusion. Ensuite, l'expression des mutants Nlg1Swap et Nlg1 Δ C incapables d'interagir avec Nr1 β et PSD-95 respectivement, nous a permis de montrer que l'immobilisation des rAMPA induite par Nlg1 dépend de son interaction avec PSD-95. De plus, en bloquant la diffusion des rAMPA de surface avec des anticorps avant d'induire la formation des adhésions Nr1 β /Nlg1, nous avons montré que le recrutement des rAMPA aux contacts Nr1 β /Nlg1 néoformés, nécessite leur diffusion dans la membrane plasmique. En étudiant le recrutement de PSD-95 aux contacts Nr1 β /Nlg1 par des expériences de vidéo-microscopie, nous avons pu observer une déplétion de PSD-95 des synapses natives, indiquant un mécanisme de compétition entre contact néoformé et synapses préexistantes. Nous avons confirmé ce mécanisme de compétition en mesurant par électrophysiologie une diminution de l'amplitude des mEPSCs AMPA dans des neurones en culture après induction des adhésions Nr1 β /Nlg1. Enfin, nous avons mesuré une diminution de la transmission synaptique AMPA dans l'hippocampe en développement (fréquence et amplitude des mEPSCs), chez les souris Nlg1 KO, indiquant que l'absence de Nlg1 affecte à la fois la formation de contacts synaptiques, mais aussi le recrutement et/ou la stabilisation des rAMPA aux synapses. L'ensemble de ces résultats suggère que les adhésions Nr1 β /Nlg1 jouent un rôle important dans les phases précoces de l'assemblage des synapses glutamatergiques et plus particulièrement dans la mise en place des rAMPA par un mécanisme de diffusion/piégeage.

Neurexin-neuroligin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95

Magali Mondin¹, Eric Hosy¹, Martin Heine², Florian Levet³, Christel Poujol³,
Christophe Blanchet¹, Daniel Choquet¹, Olivier Thoumine¹

1. Physiologie Cellulaire de la Synapse, CNRS, Université de Bordeaux, 33077, Bordeaux Cedex

2. Leibniz Institute of Neuroscience, Magdeburg, Germany

3. Bordeaux Imaging Center, University of Bordeaux, France

Running title: Neuroligin1 traps AMPARs through PSD-95

* corresponding author:

Tel: +33 5 57 57 56 09

Fax: +33 5 57 57 40 82

e-mail: othoumin@u-bordeaux2.fr

Total number of characters: 59106

Abstract

We examined the mechanisms underlying the recruitment of AMPA-type glutamate receptors (AMPA) at neuroligin/neurexin adhesions. Using single nanoparticle tracking in primary neurons over-expressing or lacking neuroligin-1, we reveal a striking inverse correlation between AMPAR diffusion and neuroligin-1 expression level. The use of neuroligin-1 mutants and inhibitory RNAs against PSD-95 demonstrates that this process requires an intact neuroligin-1/PSD-95 interaction. We also show a rapid and specific immobilization of functional AMPARs at nascent neuroligin-1/PSD-95 clusters triggered by neurexin multimers, a process which is prevented when AMPAR membrane diffusion is blocked by antibody-cross link. Triggering novel neurexin/neuroligin adhesions also caused a depletion of PSD-95 from pre-existing synapses and a drop in AMPAR miniature EPSCs, suggesting a competitive mechanism. Finally, AMPAR synaptic transmission was greatly diminished in hippocampal slices from newborn neuroligin-1 knock-out mice, confirming an important role of neuroligin-1 in driving AMPARs to nascent synapses. Together, these data show that membrane-diffusing AMPARs can be rapidly trapped at PSD-95 scaffolds assembled at novel neurexin/neuroligin adhesions, leading to post-synaptic development in competition with existing synapses.

Introduction

Synaptogenesis is a multi-step process taking place at sites of axo-dendritic or axo-somatic contacts, initiated by adhesion proteins and followed by the recruitment of scaffold proteins and receptor channels in a precise temporal order (Friedman et al., 2000; Gerrow et al., 2006; Zito et al., 2009). However, the mechanisms linking initial adhesive contact to the assembly of functional pre- and post-synaptic macromolecular complexes remain unclear. Several adhesion proteins have been implicated in driving synapse assembly, including SynCAM (Biederer et al., 2002), ephrins (Lai and Ip, 2009), leucine-rich repeat transmembrane proteins (LRRTM) (Linhoff et al., 2009), and neurexin/neurologin (Craig et al., 2006).

Neurexins and neuroligins are trans-membrane proteins mediating calcium dependent synaptic adhesion (Sudhof, 2008). At the pre-synapse, neurexins bind the multimodal scaffolding protein CASK (Mukherjee et al., 2008), and have an essential function in coupling calcium channels to the release machinery (Missler et al., 2003). At the post-synapse, neuroligins bind PSD-95, a major scaffold protein of excitatory synapses (Irie et al., 1997), which interacts directly with the C-terminus of NMDA glutamate receptors (NMDAR), and indirectly with AMPA glutamate receptors (AMPA) through binding to the C-terminus of the auxiliary subunit stargazin and related TARPs (Bats et al., 2007; Shi et al., 2009). Neuroligin knock-out (KO) mice die shortly after birth as a result of reduced network activity in respiratory centers (Varoqueaux et al., 2006), and show selectively altered NMDA-mediated synaptic responses (Chubykin et al., 2007).

Studies in primary neuronal cultures have shown that the neurexin/neurologin adhesion complex played a major role in synapse initiation and validation (Craig and Kang, 2007). Over-expressing neuroligins in primary neurons increases the number and size of synapses (Ko et al., 2009; Levinson et al., 2005), whereas down-regulating neuroligins shows the opposite (Chih et al., 2005). In addition, primary neurons form functional pre-synaptic terminals onto co-cultured heterologous cells expressing neuroligin (Scheiffele et al., 2000), and develop post-synaptic PSD-95 scaffolds onto co-cultured fibroblasts expressing neurexin-1 β (Graf et al., 2004). These effects can be reproduced using microspheres coated with either purified

neuroligin (Dean et al., 2003) or neurexin (Graf et al., 2004; Heine et al., 2008b), indicating that clustering adhesion molecules is enough to trigger pre- or post-synaptic differentiation, respectively.

Although both functional NMDA and AMPA glutamate receptors accumulate at newly formed neurexin/neuroligin contacts (Barrow et al., 2009; Graf et al., 2004; Heine et al., 2008b; Nam and Chen, 2005), the underlying molecular mechanisms are still unclear. One possibility is that receptors are delivered by exocytosis (Garner et al., 2002). Indeed, NMDA receptors are delivered to immature synaptic contacts as pre-assembled transport packets (Barrow et al., 2009), but no such evidence exists for AMPARs. Rather, surface diffusing extra-synaptic AMPARs were seen to be reversibly trapped at synaptic PSD-95 clusters, through an interaction with the AMPAR auxiliary subunit stargazin (Bats et al., 2007). We thus tested here the hypothesis that AMPARs could accumulate at nascent neurexin/neuroligin contacts through a diffusion/trap mechanism involving PSD-95. We tackled this issue by live imaging of PSD-95 and AMPAR diffusion in primary neurons, upon selective formation or perturbation of neurexin/neuroligin adhesions.

Materials and Methods

Molecular constructs

The pcDNA PSD-95:GFP and Homer-1c:GFP were gifts from S. Okabe (Tokyo University, Japan). For the PSD-95:mCherry construct, mCherry was amplified by PCR with primers containing KpnI/BsrGI sites. It was then inserted at the C-terminus of PSD-95 in place of GFP using these restriction sites. pcDNA dimer DsRed Homer1c was generated by ligation of PCR-amplified dimer DsRed in frame to replace the existing EGFP using HindIII and BsrGI sites. Nlg1 constructs WT, Δ C (truncated for the last 72 AA of the C-terminus tail) and Swap (acetylcholine-like extracellular region swapped with regular acetylcholine esterase) were gifts from P. Scheiffele (Biozentrum, Basel, CH). To make SEP:GluA1 and SEP:GluA2, the SEP (superecliptic pHluorin) sequence was amplified by PCR with primers containing AgeI/NheI sites. It was then inserted after the signal peptide of GluA1 or GluA2 cloned in eucaryotic expression vectors (respectively prk5 and pcDNA). shRNA against PSD-95 (sh + control plasmid) were gifts from O. Schlüter (Stanford University, Palo Alto, CA).

Purified recombinant proteins

The pcDNA neomycin β Neurexin δ 4-humanFc (abbreviated Nr α 1 β -Fc) plasmid received from P. Scheiffele was subcloned between sites HindIII/XhoI in pcDNAhygro(+) vector in order to select a stable hygromycin-resistant HEK cell line producing Nr α 1 β -Fc. Recombinant Nr α 1 β -Fc protein was expressed in HEK cells and purified from conditioned medium as described (Heine et al., 2008b), to a protein concentration of 0.8 mg/ml. The pFab7-SP encoding GluA2/4 specific antibody Fab fragment (called Fab anti-GluA2) plasmid was a gift from K. Keinänen (University of Helsinki, Finland). It was expressed in E.Coli Origami strain (Novagen) and proteins were extracted by sonication and centrifugation. Fab was purified on protein G affinity column to a protein concentration of 0.6 mg/ml.

Cell culture and transfection

Dissociated hippocampal neurons from E18 rat embryos were plated on 18 mm polylysine-coated glass coverslips at a density of 10'000 cells/cm² in MEM containing 10% horse serum (Gibco) for 3 hr, then cultured in Neurobasal medium (NB) supplemented with B27 on a layer of glial cells (Goslin et al., 1991). Neurons were transfected at 4-7 DIV using Effecten (Qiagen) and processed 2-5 days later. The same protocol was used to culture dissociated hippocampal neurons from P0 Nlg1 KO, GluA2 KO or WT littermate mice pups. To obtain neurons with an Nlg1 null background, we bred heterozygotes Nlg1 mice (Varoqueaux et al., 2006) generously given by N. Brose and F. Varoqueaux (Max Planck Institute, Goettingen). Newborn littermate pups were genotyped at P0, allowing selection of WT and KO animals for dissociated hippocampal cultures, performed as above. The same protocol was used to obtain GluA2 KO cultures from GluA2 heterozygote mice (gift from R. Sprengel, Max Planck Institute, Heidelberg).

Nrx1 β -Fc cluster formation

2 μ g of soluble Nrx1 β -Fc were mixed with 1 μ g of anti Human-Fc (Jackson ImmunoResearch) into 100 μ l of culture medium or observation medium containing 0.3% globulin-free BSA (Sigma) to avoid non specific binding. For live experiments, the secondary anti-human Fc was unlabelled, whereas for fixed experiments anti-human Fc was conjugated to Cy5 using a coupling kit from Amersham.

Immunocytochemistry

To measure endogenous AMPAR and NCAM recruitment, a 10 min live labelling of surface proteins was performed at 37°C with 1:100 antibody dilution in warm NB containing 0.3% of BSA. We respectively used a polyclonal anti-GluA1 (a gift of MD Ehlers, Duke University, Durham, NC) and a polyclonal anti-NCAM (a gift of RM Mège, INSERM, Paris). Cells were fixed for 10 min in warm 4% paraformaldehyde- 4% sucrose in PBS, and remaining active sites were saturated with 50 mM NH₄Cl in PBS for 15 min. Secondary Alexa⁴⁸⁸-conjugated goat anti-rabbit antibody (2 mg/ml, Molecular Probes) was added 1:1000 for 30 min at room temperature. Coverslips were then mounted in Mowiol (Calbiochem).

To measure recombinant SEP:GluA1 or SEP:GluA2 recruitment, cells were fixed and stained with 1:400 mouse anti-GFP (Roche) followed by 1:1000 Alexa⁴⁸⁸-conjugated goat anti-mouse antibody (2 mg/ml, Molecular Probes) for 30 min at room temperature.

To measure the number of synapses, cells expressing Nlg1 mutants were fixed and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. Non-specific binding was blocked with PBS containing 1% BSA. Synaptic structures were labelled with 1:400 mouse anti-synapsin (Synaptic Systems) followed by 1:1000 Alexa⁵⁶⁸-conjugated goat anti-mouse antibody (2 mg/ml, Molecular Probes).

To localize active pre-synapses in live experiments, cells were labelled using a 1:100 dilution of anti-synaptotagmin1 lumenal domain conjugated to Oyster 550 fluorophore (Synaptic Systems) in observation medium containing 50 mM KCl.

To quantify the level of Nlg1 surface expression, living neurons were incubated with soluble Nrx1 β -Fc (1:50 dilution in culture medium), fixed, and then stained with 1:300 goat anti-Human Fc (Jackson ImmunoResearch), conjugated to cy3 using a coupling kit from Amersham.

To measure the level of over-expression or knock-down of PSD-95, neurons transfected with shPSD-95 or replPSD-95 were fixed, permeabilized and labeled with 1:500 primary monoclonal anti PSD-95 (NeuroMab) followed by 1:1000 Alexa⁵⁶⁸-conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes).

To visualize the co-localization between Nlg1 and PSD-95, neurons co-transfected with HA:Nlg1 and PSD-95:GFP were live stained with 1:100 rat anti-HA (Roche), then fixed and incubated with 1:1000 anti-rat Alexa⁵⁶⁸.

Surface SEP:GluA2 X-link

To block GluA2 surface diffusion, live neurons transfected with recombinant SEP:GluA2 were treated with a 1:100 dilution of polyclonal anti-GFP (Invitrogen) at 37°C in culture medium during 10 min.

Live imaging of PSD-95:GFP

8-10 DIV neurons expressing Nlg1WT and PSD-95:GFP were mounted on an open chamber containing Tyrode solution (30mM D-Glucose, 120mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 25mM Hepes, pH 7.4) supplemented with 0.3% BSA. Cells were then observed on an Olympus microscope (IX70) using a 100x/1.4 oil objective and illumination with a mercury lamp and appropriate excitation/emission filters. At time zero, unconjugated Nr1β aggregates were added, and the PSD-95:GFP images were recorded every 20 sec for 30 min.

Image analysis

Immunostainings were visualized on a Leica DM R epifluorescence microscope equipped with a 63x/1.32 NA objective and appropriate filter sets. Images were acquired with a CCD camera (HQ CoolSnap, Roper scientific), using the Metamorph software (Universal Imaging Corp.).

To measure enrichment factors of PSD-95 or AMPARs to Nr1β-Fc clusters the Cy5 (Nr1β-Fc) images were treated by a segmentation program written within Metamorph (Groc et al., 2007), allowing precise detection of clusters. The corresponding contours were transferred to the PSD-95 or AMPAR image, and the signal intensity was measured in these regions, and normalized by that on a control area.

To count the number of synapses per surface area of neurite, synapsin images were treated by a segmentation program allowing clusters to be detected as single objects, which were then automatically counted. An intensity threshold was applied to define the neurite contour and calculate its area.

To compute the degree of apposition between pre-synaptic elements (typically obtained for synapsin or synaptotagmin stainings) and post-synaptic clusters (typically Homer1c:GFP or PSD:GFP labeling), a plugin was developed within ImageJ. Two binary images, one for each type of staining, were generated, allowing identification of synaptic structures as individual objects. If two objects are touching each other with no overlapping pixel, or if some overlapping pixels are present, the objects are considered as apposed. These apposed regions are used to determine the percentage of post-synaptic clusters which are apposed to a pre-synapse.

To measure the depletion in PSD-95:GFP fluorescence, PSD-95:GFP clusters present before incubation with Nr1β aggregates were isolated using a segmentation program written within Metamorph (Groc et al., 2007). The fluorescence intensity of isolated clusters was measured throughout the image acquisition stack, and was corrected for the global photobleaching. Because we analyzed only clusters that can be followed throughout the whole image stack, independently of newly forming clusters, this value is actually an underestimation.

Single Quantum dot tracking and surface diffusion calculation

1 μ l of 655 nm Quantum dots (Qdots) conjugated to goat (Fab')₂ anti-mouse or anti-rabbit IgG (Invitrogen) were incubated with 1 μ l Fab anti-GluA2, anti NCAM, or rabbit anti-GFP, in 7 μ l PBS for 20 min at room temperature. Non-specific binding was blocked by adding 1 μ l of 10% casein solution for 15 min (Vector Laboratories, USA), and this solution was kept at 4°C throughout the experiment. Neurons were incubated for 10 min at 37°C in 1 ml culture medium containing 1 μ l of the anti-GluA2 or anti-NCAM coated Qdot solution, or 0.05 μ l of anti-GFP coated Qdots. Cells were rinsed and mounted in an aluminium chamber containing Tyrode solution, and then observed on a Nikon microscope (Eclipse TE 2000-U), thermostated to 37°C using an objective heater (Biopetechs) and an air blower (Precision instruments). Qdots were detected using a 100x/1.4 oil objective and illumination with a mercury lamp and appropriate excitation/emission filters. A series of 1000 images were recorded with an integration time of 50 ms, using an EMCCD camera (Quantom, Roper Scientific). Qdots were followed on randomly selected dendritic regions for up to 20 min. Qdot recording sessions were processed with the Metamorph software (Universal Imaging Corp). The global instantaneous diffusion coefficient, D , was calculated for each trajectory, from linear fits of the first 8 points of the mean-square-displacement (MSD) versus time function using $MSD(t) = 4Dt$ (Groc et al., 2007). The synaptic and extra-synaptic diffusion coefficients were also calculated for stretches of trajectories identified as inside or outside synapses, by reference to the homer1c:GFP labeling.

Electrophysiology

Iontophoresis experiments

The extracellular solution contained in millimolar concentrations: 145 NaCl, 2.5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES and 10 D-Glucose, pH 7.4 supplemented with 10 μ M bicucullin (Tocris), 10 μ M APV and 1 μ M TTX to block GABA-A receptors, NMDA-receptors and sodium channels, respectively. Borosilicate pipettes (Clark Electromedical) were pulled with a micropipette puller (Sutter Instruments, Novato USA) to produce patch electrodes with resistances of 3-5 M Ω . The intracellular solution contained in millimolar concentrations: 130 CH₃CsSO₃, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 2 NaATP, 10 EGTA, 10 HEPES, and 0.4 GTP, pH = 7.25. Micropipette positioning was achieved through 3-axes micromanipulators (Luigs-Neumann, Germany), under an inverted epifluorescence microscope equipped with a 60x/1.35 objective (Zeiss). Recordings were performed with an EPC 10 double patch-clamp amplifier (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany). Data were acquired and stored using PatchMaster software version 2.0 (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) and analysed with IGOR-Wave-Metrics (Oregon USA) and GraphPad Prism Software (USA). Local activation of receptors was performed by glutamate iontophoresis, using pipettes with a resistance of 40-60 M Ω filled with 150 mM sodium glutamate pH 7.4 and connected to an amplifier from NPI electronics (Tamm, Germany). A small retaining current was needed to keep glutamate inside the pipette (usually between 10-50 nA). Current pulses of 80-150 nA and 1 ms duration were applied to evoke glutamate receptor mediated currents. At least 10 recorded current traces were averaged.

In order to find a synapse, a fluorescent image of a PSD-95:GFP expressing cell was taken before incubation with Nr1 β cross-linked with anti-human fc antibodies

conjugated to Cy3, and 30-60 min after. After the establishment of the whole-cell patch configuration, the iontophoretic pipette was navigated toward preselected spots of PSD-95:GFP that appeared during the incubation period, or were there before as control. We checked in the Cy3 fluorescence channel that the new PSD-95:GFP clusters were associated to Nr1 β spots.

Cluster experiments in cell culture

5 DIV hippocampal neurons were transfected with Nlg1 WT and PSD-95:GFP plasmids. After 3-4 days of expression, cells were perfused with extracellular solution composed of (in mM) 125 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 4 CaCl₂, 4 MgCl₂, 25 glucose and saturated with 95% O₂/5% CO₂. The patch pipette was loaded with the intracellular solution composed of (in mM): 140 Cs-gluconate, 10 HEPES, 10 EGTA, 4 Mg-ATP, 6 NaCl and 0,4 GTP. The extracellular and intracellular solutions were almost equimolar (300-305mOsm). To isolate AMPA mEPSCs, 1 μ M TTX and 50 μ M APV were added to the bath. For each coverslip, the first transfected cell was recorded for 15 min as the control condition. Then cross-linked Nr1 β was added for 10 min (without perfusion), and allowed for 20 min more (with perfusion) the formation of clusters. After this incubation, miniature events from transfected cells (1-2 per coverslip) were recorded for 15 min.

Slices experiments

Electrophysiological recordings of CA1 pyramidal cells were performed using parasagittal hippocampal slices from 8 and 9 days old WT and Nlg1 KO mice. Briefly, AMPA miniature EPSCs (mEPSCs) recordings (4–5 M Ω electrodes, –60 mV holding potential) were made at 33°C from pyramidal cells of the hippocampal CA1 field visualized by infrared video-microscopy. Slices were perfused with extracellular solution composed of (in mM): 124 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 4 CaCl₂, 4 MgCl₂, 10 glucose and saturated with 95% O₂/5% CO₂. TTX (0,5 μ M) was added to the bath to block action potential generation. The intracellular solution was composed of (in mM): 140 Cs-gluconate, 10 HEPES, 10 EGTA, 4 Mg-ATP, 6 NaCl and 0,4 GTP. Cells were kept at holding potential for 10 min, then mEPSCs were recorded for 15 min. We included in the comparison only cells which had similar membrane resistance, which reveals proper cell opening and seal quality.

Detection and analysis of AMPA mEPSCs

For mEPSCs recordings, data were analysed with IGOR-Wave-Metrics (Oregon USA), using an automated macro modified from (Hwang and Copenhagen, 1999). Briefly, this program automatically detected the recorded events that corresponded to AMPA mEPSCs, given defined characteristics, such as rise time, decay time, and duration. Among all these events, we decided to keep only the events that were above a threshold of 7 pA amplitude.

Results

Neurologin-1 over-expression reduces the surface diffusion of GluA2-containing AMPAR

To explore the impact of strengthening neuroligin/neurexin adhesions on AMPAR diffusion, we first over-expressed neuroligin-1 (Nlg1) in 8-10 DIV primary rat hippocampal neurons, and monitored the lateral mobility of AMPARs at both synaptic and extra-synaptic locations by single nano-particle tracking. Synapses were detected live with Homer1c:GFP, and endogenous surface diffusing AMPARs were individually labeled with fluorescent Quantum dots (*Qdots*) coated with anti-GluA2 Fabs (Supplemental Fig. 1A). We checked that Qdots attached specifically to GluA2 receptors, by either over-expressing recombinant SEP:GluA2 in rat neurons, or using cultures from GluA2 KO mice, and counting the number of bound Qdots (Supplemental Fig. 1C,D). Dilution was adjusted to yield sufficiently isolated Qdots, to allow for clear trajectory reconstruction, and the motion of single Qdots was captured at 20 Hz (Supplemental Fig. 1C,D). Custom software allowed calculation of the instantaneous diffusion coefficient for each 2D trajectory (Saint-Michel et al., 2009). Distributions of diffusion coefficients were then plotted for hundreds of Qdots, allowing comparison between conditions. The mobility of AMPARs conjugated to anti-GluA2 was decreased by a factor of 2 upon over-expression of Nlg1 WT, as compared to control cells expressing Homer1c:GFP alone (Fig. 1A,B). Endogenous AMPAR were also tracked with Qdots conjugated to anti-GluA1 antibodies. Their basal mobility was lower than that of anti-GluA2 coated Qdots, possibly linked to the bivalency of anti-GluA1 antibodies compared the monovalency of GluA2 Fabs (Saint-Michel et al., 2009), but was also strongly decreased by Nlg1 over-expression (Fig.1A,B). In contrast, the mobility of the control non-synaptic adhesion molecule NCAM was increased by Nlg1 expression, suggesting that this process is specific for synaptic receptors (Fig.1A,B).

To assess whether the impact of Nlg1 over-expression on AMPAR diffusion was dependent on the subunit composition of AMPARs, we expressed recombinant GluA1 and GluA2 subunits, and tracked their movement using the same preparations of anti-GFP conjugated Qdots (Fig.2C). The mobility of SEP:GluA2 receptors was

reduced by a factor of two upon Nlg1 over-expression, like that of endogenous AMPARs (Fig.2D). In contrast, the mobility of SEP:GluA1 receptors, likely to form GluA1 homomeric receptors, was twice lower than that of SEP:GluA2 receptors, and unaffected by Nlg1 over-expression. The fact that the mobility of both endogenous and recombinant GluA1-containing AMPAR was lower than that of GluA2 containing AMPAR suggests different trapping mechanisms. Overall, these data indicate that the population of endogenous AMPARs sensitive to the Nlg1 level is mostly composed of GluA1/GluA2 heteromers.

Nlg1 level bi-directionally affects AMPAR surface diffusion

To assess if AMPAR mobility was also sensitive to a down-regulation of Nlg1 expression level, we used KO and shRNA strategies, and measured AMPAR global surface diffusion using anti-GluA2 coated Qdots. Hippocampal cultures from Nlg1 knock-out mice showed an approximately two-fold increase in AMPAR mobility compared to cells from wild type (WT) animals (Fig. 2A,B). Accordingly, expression of shRNA against Nlg1 in neurons from WT mice increased AMPAR mobility to similar levels as those obtained in KO cultures, whereas over-expression of Nlg1 in KO cultures rescued AMPAR mobility to a low level similar to that of cultures from WT littermates (Fig. 2A,B). We noted that the mobility of AMPARs was lower in mice cultures than in rat cultures at the same age in vitro (9 DIV) (compare Figs. 1B and 2B). Surface labeling of neurons with soluble Nr_x1 β -Fc showed that Nlg1 membrane level was 2-fold higher in mice cultures than in rat cultures, and that both Nlg1 KO cultures or WT cultures treated with shRNA against Nlg1 showed similarly reduced Nlg1 expression (Fig. 2C,D). When compared with the Qdot mobility measurements, these experiments show that the Nlg1 expression level inversely correlates with the surface diffusion of AMPARs.

The immobilization of AMPAR by Nlg1 over-expression requires PSD-95

To examine if the reduction of AMPAR mobility caused by Nlg1 over-expression was linked to interactions between Nlg1 and Nr_x1 β , or between Nlg1 and PSD-95, respectively, we used two Nlg1 mutants: i) Nlg1Swap, with a swapped extra-cellular domain unable to interact with neurexin, and ii) Nlg1 Δ C, with a truncation of the C-terminus making it unable to interact with PSD-95 (Scheiffele et al., 2000).

Expression of Nlg1 Δ C resulted in a 50% increase in the number of synapsin puncta apposed to transfected neurons (Supplemental Fig. 2A,B), as obtained for Nlg1 WT and already known from previous studies (Ko et al., 2009; Levinson et al., 2005), but these new synapses lacked PSD-95 (Supplemental Fig. 2A,C). In parallel, the global and synaptic diffusion coefficients of AMPARs, tracked with either anti-GluA1 or anti-GluA2 coated Qdots, were unaffected by the expression of Nlg1 Δ C (Fig. 3A,B and Supplemental Fig. 3A). This indicates that the drop in AMPAR diffusion upon Nlg1 over-expression is not linked to the increase in synapse number, but rather to the specific interaction between Nlg1 and PSD-95 (Supplemental Fig. 3C). Accordingly, expression of Nlg1Swap, which did not increase synapse density but instead resulted in a displacement of PSD-95 clusters from synaptic to extra-synaptic locations (Supplemental Fig. 2), resulted in a drop of AMPAR mobility similar to that seen for Nlg1 WT (Fig. 3A,B and Supplemental Fig. 3C). Thus, Nlg1 immobilizes AMPARs through an interaction between the Nlg1 intracellular tail and PSD-95.

To confirm that PSD-95 was required for the reduction in AMPAR mobility caused by Nlg1 expression, we transfected rat hippocampal neurons with an shRNA construct to acutely knock-down PSD-95 expression (shPSD-95), or a control plasmid containing the same shRNA against PSD-95 but also expressing a recombinant PSD-95:GFP insensitive to the shRNA (replPSD-95) (Schluter et al., 2006). We estimated by immuno-staining that the shRNA diminished by 70% the expression level of endogenous PSD-95, while expression of repl-PSD-95 increased PSD-95 expression level by 20-fold (Supplemental Fig. 4A). A normal mobility of AMPARs was rescued when shRNA against PSD-95 was co-expressed with either Nlg1WT or Nlg1Swap (Fig. 3C,D), showing that the presence of PSD-95 was critical for AMPAR immobilization by Nlg1. As a control, the immobilization of AMPARs caused by Nlg1 WT or Nlg1Swap was not affected by the co-expression of replPSD-95 construct (Fig. 3C,D).

AMPARs specifically stop at Nlg1/PSD-95 clusters

We then analyzed in details the trajectories of membrane-diffusing AMPARs, in relation to Nlg1/PSD-95 clusters and synapses. The expression of PSD-95 alone caused a major reduction in global AMPAR mobility (Supplemental Fig. 4B), and a specific confinement of AMPARs at clusters containing both Nlg1 and PSD-95 (Fig.

3E and Supplemental Fig. 5). The effects of the Nlg1Swap mutant strengthened the concept that AMPAR are specifically trapped at Nlg1/PSD-95 clusters. Indeed, overexpression of Nlg1Swap had no effect on the synaptic diffusion of AMPARs at homer1c:DsRed puncta, but strikingly reduced their mobility at extra-synaptic PSD-95:GFP locations (Supplemental Fig. 2 and Fig. 3B). To summarize these data, we plotted the effects of Nlg1 mutants on AMPAR mobility in relation to the surface density of either Homer1c:GFP or PSD-95:GFP spots (Supplemental Fig. 3C). We found a striking inverse correlation between AMPAR diffusion and PSD-95 cluster density, and a very weak correlation with Homer1c spot density. This suggests a functional dissociation between Homer1c and PSD-95, in agreement with the differential dynamics of these two proteins (Kuriu et al., 2006), and confirms that PSD-95 is the primary interactor with surface diffusing AMPARs.

Cross-linking Nlg1 by Nr1 β multimers induces new post-synapses containing PSD-95 and functional AMPARs

To monitor the accumulation of AMPARs at newly formed Nr1/Nlg contacts, we induced hemi-synapse formation in primary neurons using purified Nr1 β -Fc cross-linked by Cy5 labeled secondary antibodies (Supplemental Fig. 1B), providing large statistics and precise timing for the recruitment of post-synaptic proteins (Barrow et al., 2009; Pouloupoulos et al., 2009). This resulted in a massive and rapid redistribution of both Nlg1 and PSD-95 from diffuse membrane pools into micron-scale clusters, co-localizing with Nr1 β -Fc aggregates (Fig. 4A). In control experiments, Nr1 β -Fc aggregates bound weakly to neurons transfected with Nlg1Swap (data not shown), whereas they bound strongly to neurons transfected with Nlg1 Δ C but did not recruit PSD-95 (Fig. 4D), demonstrating specificity of the protein interactions.

Clusters appeared within 5-10 min and persisted for at least 2 hr. In 30 min, the surface density of PSD-95 clusters increased by 80% (Supplemental Fig. 7A,C). Before addition of cross-linked Nr1 β -Fc, around 60% of pre-existing PSD-95 clusters were apposed to pre-synaptic puncta labeled with synaptotagmin, as reported (Gerrow et al., 2006). After Nr1 β -Fc addition, this proportion significantly fell to 50%, suggesting that new PSD-95 clusters were mostly non-synaptic hemi-

synapses (Supplemental Fig. 7A,D). The enrichment level of PSD-95 in the new clusters increased sharply over time and reached by 1 hr a plateau value corresponding to about half the enrichment of PSD-95 at endogenous synapses (Fig. 4D). We checked by immuno-cytochemistry that endogenous PSD-95 was recruited to similar levels as recombinant PSD-95:mCherry (enrichment at 1 hr = 1.60 ± 0.03 , $n = 432$ clusters out of 5 cells).

Nrx1 β clusters also contained endogenous AMPARs, labeled by live antibody staining, which accumulated to lower levels than PSD-95 (Fig. 4B,D). The adhesion molecule NCAM, labeled similarly, did not show any enrichment at new Nrx1 β clusters (Fig. 4C,D), demonstrating specificity of the assay. AMPAR did not accumulate at Nrx1 β clusters in neurons transfected with Nlg1 Δ C (Fig. 4D, empty squares), indicating that PSD-95 has to be present at Nrx/Nlg adhesions to recruit AMPAR. The newly accumulated AMPARs were functional, as assessed by patch clamp recordings upon glutamate iontophoresis (Fig. 4E). The amplitude of the elicited AMPA currents at Nrx1 β -Fc clusters was about half that measured at native synapses (Fig. 4F,G), closely corresponding to the difference in AMPAR enrichment level at Nrx1 β -Fc clusters versus endogenous PSD-95:mCherry spots (Fig. 4D). Thus, the newly formed Nrx1 β /Nlg1 adhesions selectively recruit PSD-95 and AMPARs.

Recruitment of AMPARs at Nrx/Nlg contacts relies on membrane diffusion

To assess the role of membrane diffusion in AMPAR recruitment at novel Nrx/Nlg adhesions, we first measured the mobility of Qdots conjugated with Fab anti-GluA2 with or without cross-linked Nrx1 β -Fc. Addition of Nrx1 β -Fc resulted in a significant reduction of the global AMPAR diffusion coefficient (Fig. 5B). As a control, the mobility of NCAM was not affected by treatment with cross-linked Nrx1 β -Fc (Fig. 5B). Specifically, AMPARs frequently stopped at Nrx/Nlg clusters, as they did at Homer1c puncta in control conditions (Fig. 5A). In both cases, AMPAR trapping at these obstacles was characterized by a dramatic drop in the instantaneous diffusion coefficient (Fig. 5B).

In a second set of experiments, we blocked the lateral mobility of surface AMPARs by antibody cross-linking, in neurons transfected with SEP-tagged GluA2 subunits and treated with a polyclonal antibody to GFP (Heine et al., 2008a). This treatment induced the formation of SEP:GluA2 clusters, and a dramatic reduction of AMPAR surface diffusion (Supplemental Fig. 6). In the absence of antibody cross-link, SEP:GluA2 accumulated at Nr_x/Nl_g clusters (Fig. 5C,F) with a similar time course as endogenous AMPARs (Fig. 4D). Antibody cross-linking resulted in a significant decrease in the enrichment level of SEP:GluA2 at Nr_x1 β -Fc clusters (Fig. 5D,F). In fact, antibody-induced SEP:GluA2 clusters were not co-localized with Nr_x1 β -Fc puncta (Fig. 5D). Interestingly, recombinant SEP:GluA1 receptors, whose mobility is reduced compared to SEP:GluA2 (Fig. 1C,D), did not accumulate at Nr_x1 β -Fc clusters (Fig. 5E,F). Altogether, these data strongly support the concept that surface diffusion is required for AMPAR recruitment at newly formed neurexin/neuroligin contacts.

A competition between new neurexin/neuroligin contacts and pre-existing synapses

To assess whether the recruitment of PSD-95 and AMPARs at nascent neurexin/neuroligin adhesions involved a competition with native synapses, we first monitored the PSD-95 content in pre-existing clusters upon addition of cross-linked Nr_x1 β -Fc, using time lapse imaging of PSD-95:GFP. We measured a progressive fluorescence decay (Fig. 6A), indicating that PSD-95 was leaving endogenous synapses. After 30 min, a significant 35 % fluorescence loss was observed (Fig. 6B). This effect was specific of the Nr_x1 β /Nl_g1/PSD-95 interactions since there was significantly less fluorescence loss when Nr_x1 β -Fc was replaced by control Fc, or when Nl_g1 was replaced by Nl_g1 Δ C (Fig. 6B). We also performed a retrospective live labeling of pre-synapses using a fluorescent antibody to the synaptotagmin luminal domain to identify synaptic versus extra-synaptic PSD-95 clusters (Supplemental Fig. 7A,B). Depletion rates were similar for extra-synaptic PSD-95 clusters and for post-synapses linked to pre-synapses (Supplemental Fig. 7E), suggesting that synaptic activity does not play a major role in retaining PSD-95.

To assess whether AMPARs also left endogenous synapses in this process, we recorded AMPA miniature EPSCs (mEPSCs) by patch clamp experiments, in neurons co-transfected with Nlg1 and PSD-95 and treated with cross-linked Nr1 β -Fc for 1 hr, or untreated neurons (Fig. 6C,D). We observed a 15% drop in the amplitude of AMPA mEPSCs in the group of neurons treated with clusters (16.1 ± 0.9 pA, $n = 10$), compared with untreated neurons (18.8 ± 0.8 pA, $n = 13$). This indicates that AMPARs were also removed from endogenous synapses upon triggering of new Nr1/Nlg contacts, albeit to a lower amplitude than PSD-95. We then asked whether the displacement of PSD-95 from native synapses to extra-synaptic locations induced by expression of the Nlg1Swap mutant (Supplemental Fig. 2) was also accompanied by a depletion of synaptic AMPARs. We thus measured the degree of apposition between GluA1 puncta and pre-synapses labeled with synapsin, in conditions of Nlg1 WT or Nlg1Swap expression (Fig. 6E). The percentage of GluA1 puncta apposed to pre-synapses was $34 \pm 2\%$ ($n = 20$ cells) for Nlg1WT, and $26 \pm 2\%$ for Nlg1Swap ($n = 15$), $P < 0.001$ by unpaired Student t-test. Together, these data show that both PSD-95 and AMPAR are displaced from existing synapses upon triggering of extra-synaptic Nlg1 adhesions.

Reduced AMPAR synaptic transmission in developing synapses from Nlg1 KO animals

Given such strong AMPAR targeting at Nr1/Nlg1 adhesions in primary neurons, we compared AMPAR synaptic transmission in Nlg1 KO and littermate control mice (P8-P9). We performed whole cell patch-clamp recordings of miniature AMPAR currents in CA1 pyramidal cells from acute hippocampal slices (Fig. 7A). We found a significant decrease in both the frequency (Fig. 7B) and amplitude (Fig. 7C) of AMPA mEPSCs in Nlg1 KO versus control animals. This indicates that Nlg1 deficiency inhibits the recruitment of AMPARs at nascent synapses *in vivo*, by both diminishing the number of inputs containing AMPARs, and by decreasing the unitary content of AMPARs at each synapse.

Discussion

Using a combination of live imaging assays, single nano-particle tracking, and electrophysiological recordings, we demonstrated here that functional GluA2-containing AMPARs quickly accumulate at the PSD-95 scaffold assembled by newly formed Nrx/Nlg contacts, through a diffusion/trap mechanism (Fig. 8). Such assembly of PSD-95 and AMPAR components at hemi-synapses triggered by Nrx/Nlg adhesion occurs in competition with pre-existing synapses.

Nrx/Nlg adhesions assemble post-synapses containing PSD-95 and AMPAR

We observed a major accumulation of PSD-95 and AMPARs at novel Nrx/Nlg adhesions in 30 min to 1 hr, a time course compatible with previous studies (Barrow et al., 2009; Friedman et al., 2000). PSD-95 and AMPAR levels in these biomimetic Nrx/Nlg contacts reached half the value at endogenous synapses, supporting a major role of the Nrx1/Nlg1 interaction in driving excitatory synapse assembly, but also revealing that other molecules (e.g. LRRTMs) and mechanisms are involved for post-synaptic maturation (de Wit et al., 2009; Linhoff et al., 2009). We did not focus on the directed motion of pre-existing extra-synaptic Nlg1/PSD-95 clusters since only a small fraction (10%) of these clusters is mobile (Barrow et al., 2009; Gerrow et al., 2006; Gutierrez et al., 2009). Instead, the most prominent phenomenon observed here was a rapid coalescence of diffuse cytosolic or membrane-associated PSD-95 at novel Nrx/Nlg clusters. In addition, monitoring the lateral mobility of AMPARs with Qdots, and blocking AMPAR membrane diffusion by antibody cross-link, showed that the accumulation of AMPARs at novel Nrx/Nlg clusters required surface diffusion. Although we do not rule out other mechanisms (Garner et al., 2002) such as motor-driven transport of AMPAR packets (Washbourne et al., 2002), or local endocytosis/exocytosis of AMPAR vesicles (Petrini et al., 2009), our data suggests that membrane diffusion is an important element for AMPAR accumulation at neuroligin/neurexin contacts.

Stoichiometry of AMPAR / PSD-95 complexes

The fact that the enrichment level of PSD-95 at Nr_x/Nl_g adhesions (50 % above dendrite level) was higher than that of AMPARs (30%) suggests that PSD-95 experiences a stronger driving force than AMPARs, e.g. freely diffusing cytosolic PSD-95 molecules could rapidly be recruited by a direct interaction with aggregated Nl_g1, then membrane AMPARs would be trapped through a slower 2D diffusion process. Alternatively, if AMPARs and PSD-95 are recruited as pre-formed complexes, then the higher enrichment level of PSD-95 must reflect an unequal stoichiometry of association (about 2 PSD-95 molecules for 1 AMPAR). This ratio is compatible with recent structural data showing that AMPARs can form complexes with 1-4 auxiliary subunits (TARPs) which mediate binding to PSD-95 (Kim et al., 2010), and with estimates of the numbers of molecules per synapse, i.e. 100-400 AMPARs (Cottrell et al., 2000; Tanaka et al., 2005) and between 200-450 PSD-95 (Sugiyama et al., 2005). At established synapses, the enrichment level of AMPARs reached a similar level as PSD-95 (around 2.2), revealing that either all PSD-95 slots became progressively occupied by AMPARs up to a 1:1 ratio, or that roughly half the population of AMPARs associate with other scaffold molecules, such as SAP-102 (Elias et al., 2006; Elias and Nicoll, 2007), SSCAM (Iida et al., 2004), or the cadherin/catenin complex (Saglietti et al., 2007).

Novel Nr_x/Nl_g adhesions compete with existing synapses

The triggering of new Nr_x/Nl_g adhesions which increased the number of extra-synaptic PSD-95 puncta, was accompanied by a partial dissolution of pre-existing PSD-95 clusters, consistent with a competition mechanism. PSD-95 is known to be dynamic and to constantly remodel at synapses (Blanpied et al., 2008; Kuriu et al., 2006). Cross-linking Nl_g1 with Nr_x1 β induced a 35% depletion of the PSD-95 population within 30 min. The turnover rates measured by FRAP experiments ranges between 50-60 % in 30 min (Sharma et al., 2006; Thoumine et al., 2008), meaning that Nr_x/Nl_g adhesions take up about half this fraction of constantly exchanging PSD-95 molecules. Depletion rates were similar for extra-synaptic and synaptic PSD-95 clusters, consistent with the fact that turnover of PSD-95 at synapses is activity-independent (Kuriu et al., 2006; Sharma et al., 2006; Tsuriei et al., 2006). Our results

thus suggest that the formation of new Nr $x1\beta$ /Nlg1 adhesions, by driving a massive extra-synaptic recruitment of PSD-95, displaces the dynamic equilibrium between extra-synaptic and synaptic PSD-95, and results in PSD-95 being dislodged from native synapses.

Addition of Nr x multimers caused a parallel reduction of AMPAR diffusion, AMPARs getting most likely trapped at extra-synaptic locations. Nlg1 cross-linking was also accompanied by a significant decrease in miniature AMPAR currents, suggesting that the drop in PSD-95 binding slots at synapses causes AMPARs to slowly diffuse out, by displacement of equilibrium. The turnover rate of about 40-50% in 5-10 min measured by FRAP experiments (Ashby et al., 2006; Frischknecht et al., 2009) can easily accomodate this moderate flux of AMPAR out of synapses. The differential levels of displacement of AMPARs and PSD-95 out of synapses (15% versus 35%, respectively) can be explained by interaction with other PDZ scaffold proteins at the synapse, or again by a stoichiometry of 2 PSD-95 molecules carrying away 1 AMPAR.

Equilibrium dynamics perturbed by Nlg1 mutants

At equilibrium, AMPARs switch from extra-synaptic to synaptic locations within seconds (Borgdorff and Choquet, 2002; Tardin et al., 2003), by an interaction with PSD-95 mediated by the auxilliary subunit stargazin (Bats et al., 2007). We showed here that Nlg1 over-expression which doubles the density of synapses containing PSD-95, induced a parallel reduction of AMPAR diffusion, the most likely explanation being that AMPARs were trapped at synapses through PSD-95. Although AMPARs can potentially bind many scaffold molecules, the use of shRNA against PSD-95 directly showed that PSD-95 was the major molecule involved in this trapping mechanism mediated by Nlg1. Furthermore, Nlg1 Δ C expression induced the formation of new synapses, but AMPAR mobility remained unchanged since these new synapses were lacking PSD-95. In addition, Nlg1 Δ C clusters triggered by Nr x contained neither PSD-95 nor AMPARs. Together, these data strongly supporting the concept that a PSD-95 scaffold is a requisite for AMPAR recruitment by diffusion. Our findings are consistent with a report showing that Nlg1 Δ C expression reduces both the frequency and amplitude of AMPA mEPSCs (Nam and Chen, 2005), revealing

that synapses contain less AMPARs on average. Finally, in neurons transfected with the Nlg1Swap mutant, which displaced PSD-95 to extra-synaptic locations, the mobility of AMPARs was slowed down only extra-synaptically, and AMPARs were less present at synapses. Altogether, these findings support the concept that trapping of surface diffusing AMPARs is intrinsically associated to the presence of a PSD-95 scaffold, be it synaptic, extra-synaptic, or newly assembled by Nrx/Nlg adhesion.

Subunit-specificity in the diffusion and recruitment of AMPAR at Nrx/Nlg adhesions

The behavior of recombinant GluA1 and GluA2 AMPAR subunits strengthens the model that membrane diffusion is required for AMPAR accumulation at Nrx/Nlg contacts. Indeed, recombinant GluA1 receptors, most likely forming homomers (Shi et al., 2001), diffused slowly and did not accumulate at Nrx/Nlg adhesions, whereas GluA2 subunits showing higher diffusion were recruited constitutively. Overall, the diffusion/trapping behavior of endogenous AMPARs, tracked with either anti-GluA1 or anti-GluA2 conjugated Qdots, was dictated by the presence of the GluA2 subunit. A differential affinity of GluA1 and GluA2 subunits for various PDZ domain molecules (Barry and Ziff, 2002) may explain differences in both diffusion properties and selectivity of recruitment at post-synaptic scaffolds. Differential anchoring could be mediated directly via the C-terminus of GluA1/GluA2 subunits, or indirectly via different TARPs which could associate with various stoichiometries to either GluA1 or GluA2 subunits (Shi et al., 2009). Interestingly, the recruitment of GluA1 recombinant receptors at Nrx/Nlg adhesions was previously shown to depend on synaptic activity (Heine et al., 2008b; Nam and Chen, 2005). In parallel, trapping of surface diffusing AMPARs at synapses requires activity (Ehlers et al., 2007), more specifically post-synaptic calcium entry through NMDA receptors (Heine et al., 2008a), which triggers CAMKII activation and causes AMPAR immobilization through stargazin phosphorylation (Opazo et al., 2010). Although stargazin can bind equally well GluA1 and GluA2 subunits in biochemical assays (Chen et al., 2000), a differential association between TARPs and GluA1 versus GluA2 may be dynamically regulated by synaptic activity (Morimoto-Tomita et al., 2009; Tomita et al., 2004).

Link between Nlg1 expression and AMPA transmission in Nlg1 knock-out mice

Because of striking effects of Nlg1 depletion on AMPAR diffusion in primary neurons, we re-examined AMPAR synaptic transmission in Nlg1KO mice, where originally no major effect on AMPAR function was reported (Chubykin et al., 2007; Varoqueaux et al., 2006). We focused on a specific developmental window (P8-P9) of active synaptogenesis (Groc et al., 2002), during which the Nlg1 expression level gradually increases (Varoqueaux et al., 2006), and found a significant reduction of both the amplitude and frequency of AMPAR mEPSCs in newborn Nlg1 KO mice compared to control littermates. The reduced frequency of AMPA mEPSCs calls for a reduction in synaptic inputs in Nlg1 KO mice at this developmental stage. In CA1 cells from PSD-95 knock-out mice or treated with shRNA against PSD-95, there is a strong decrease in the evoked AMPA/NMDA ratio, and in the frequency of AMPA mEPSCs, related to an increase in the number of AMPAR silent synapses (Beique et al., 2006; Elias et al., 2006). Because Nlg1 seems closely involved in the recruitment of PSD-95 at synapses, the reduction in AMPA mEPSC frequency observed here in Nlg1 KO mice may be explained by the existence of such synapses containing no detectable AMPARs. Knock-down of the Nr1β receptor LRRTM2 in CA1 cells results in a 50% reduction of AMPA transmission (de Wit et al., 2009), suggesting a redundant role of LRRTM2 and Nlg1 in the recruitment of PSD-95 and AMPARs (Siddiqui et al., 2010). Based on those data, one main difference between culture and knock-out studies could be a differential time-regulation of the expression levels of cell adhesion molecules mediating synaptogenesis (Brose, 2009).

Acknowledgements

We thank P. Scheiffele for the generous gifts of Nlg1 plasmids and scientific insight, O. Schlüter for the gift of PSD-95 shRNA constructs, N. Brose and F. Varoqueaux for the gift of neuroligin KO mice, neuroligin antibodies, and scientific insight, R. Sprengel and P. Seeburg for GluA2 KO mice, M.D. Ehlers for the gift of anti-GluA1 and critical reading of the manuscript, R.M. Mège for the anti-NCAM antibody, K. Keinänen for the Fab anti GluA2, M. Sainlos for the making of PSD-95:mCherry, A. Vimeney, A. Laquement, and E. Normand for help on animal care and genotyping, P.S. Pinheiro and F. Lanore for electrophysiology experiments, B. Tessier for the production of neurexin and anti-GluA2 Fabs, D. Bouchet, C. Breillat, A. Frouin for cell culture, P. Gonzales for technical assistance, and G. Giannone, L. Groc, and P. Opazo for scientific discussions.

References

- Ashby, M.C., Maier, S.R., Nishimune, A. and Henley, J.M. (2006) Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *J Neurosci*, **26**, 7046-7055.
- Barrow, S.L., Constable, J.R., Clark, E., El-Sabeawy, F., McAllister, A.K. and Washbourne, P. (2009) Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev*, **4**, 17.
- Barry, M.F. and Ziff, E.B. (2002) Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol*, **12**, 279-286.
- Bats, C., Groc, L. and Choquet, D. (2007) The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron*, **53**, 719-734.
- Beique, J.C., Lin, D.T., Kang, M.G., Aizawa, H., Takamiya, K. and Huganir, R.L. (2006) Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 19535-19540.
- Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E.T. and Sudhof, T.C. (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science*, **297**, 1525-1531.
- Blanpied, T.A., Kerr, J.M. and Ehlers, M.D. (2008) Structural plasticity with preserved topology in the postsynaptic protein network. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 12587-12592.
- Borgdorff, A.J. and Choquet, D. (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature*, **417**, 649-653.
- Brose, N. (2009) Synptogenic proteins and synaptic organizers: "many hands make light work". *Neuron*, **61**, 650-652.
- Chen, L., Chetkovich, D.M., Petralia, R.S., Sweeney, N.T., Kawasaki, Y., Wenthold, R.J., Brecht, D.S. and Nicoll, R.A. (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature*, **408**, 936-943.
- Chih, B., Egelman, H. and Scheiffele, P. (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*, **307**, 1324-1328.

- Chubykin, A.A., Atasoy, D., Etherton, M.R., Brose, N., Kavalali, E.T., Gibson, J.R. and Sudhof, T.C. (2007) Activity-Dependent Validation of Excitatory versus Inhibitory Synapses by Neuroligin-1 versus Neuroligin-2. *Neuron*, **54**, 919-931.
- Cottrell, J.R., Dube, G.R., Egles, C. and Liu, G. (2000) Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, **84**, 1573-1587.
- Craig, A.M., Graf, E.R. and Linhoff, M.W. (2006) How to build a central synapse: clues from cell culture. *Trends Neurosci*, **29**, 8-20.
- Craig, A.M. and Kang, Y. (2007) Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol*, **17**, 43-52.
- de Wit, J., Sylwestrak, E., O'Sullivan, M.L., Otto, S., Tiglio, K., Savas, J.N., Yates, J.R., 3rd, Comoletti, D., Taylor, P. and Ghosh, A. (2009) LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. *Neuron*, **64**, 799-806.
- Dean, C., Scholl, F.G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E. and Scheiffele, P. (2003) Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci*, **6**, 708-716.
- Ehlers, M.D., Heine, M., Groc, L., Lee, M.C. and Choquet, D. (2007) Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity. *Neuron*, **54**, 447-460.
- Elias, G.M., Funke, L., Stein, V., Grant, S.G., Bredt, D.S. and Nicoll, R.A. (2006) Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins. *Neuron*, **52**, 307-320.
- Elias, G.M. and Nicoll, R.A. (2007) Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends Cell Biol*, **17**, 343-352.
- Friedman, H.V., Bresler, T., Garner, C.C. and Ziv, N.E. (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron*, **27**, 57-69.
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C.I., Choquet, D. and Gundelfinger, E.D. (2009) Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci*, **12**, 897-904.
- Garner, C.C., Zhai, R.G., Gundelfinger, E.D. and Ziv, N.E. (2002) Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci*, **25**, 243-251.
- Gerrow, K., Romorini, S., Nabi, S.M., Colicos, M.A., Sala, C. and El-Husseini, A. (2006) A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron*, **49**, 547-562.
- Goslin, K., Asmussen, H. and Banker, G. (1991) Rat hippocampal neurons in low-density culture. In Banker, G. and Goslin, K. (eds.), *Culturing nerve cells*. The MIT Press, Cambridge, pp. 339-370.
- Graf, E.R., Zhang, X., Jin, S.X., Linhoff, M.W. and Craig, A.M. (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*, **119**, 1013-1026.
- Groc, L., Gustafsson, B. and Hanse, E. (2002) Spontaneous unitary synaptic activity in CA1 pyramidal neurons during early postnatal development: constant contribution of AMPA and NMDA receptors. *J Neurosci*, **22**, 5552-5562.
- Groc, L., Lafourcade, M., Heine, M., Renner, M., Racine, V., Sibarita, J.B., Lounis, B., Choquet, D. and Cognet, L. (2007) Surface trafficking of neurotransmitter receptor: comparison between single-molecule/quantum dot strategies. *J Neurosci*, **27**, 12433-12437.
- Gutierrez, R.C., Flynn, R., Hung, J., Kertesz, A.C., Sullivan, A., Zamponi, G.W., El-Husseini, A. and Colicos, M.A. (2009) Activity-driven mobilization of post-synaptic proteins. *Eur J Neurosci*, **30**, 2042-2052.
- Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Beique, J.C., Lounis, B., Rumbaugh, G., Huganir, R.L., Cognet, L. and Choquet, D. (2008a) Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science*, **320**, 201-205.

- Heine, M., Thoumine, O., Mondin, M., Tessier, B., Giannone, G. and Choquet, D. (2008b) Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroigin contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 20947-20952.
- Hwang, T.N. and Copenhagen, D.R. (1999) Automatic detection, characterization, and discrimination of kinetically distinct spontaneous synaptic events. *J Neurosci Methods*, **92**, 65-73.
- Iida, J., Hirabayashi, S., Sato, Y. and Hata, Y. (2004) Synaptic scaffolding molecule is involved in the synaptic clustering of neuroigin. *Mol Cell Neurosci*, **27**, 497-508.
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T.W. and Sudhof, T.C. (1997) Binding of neuroigins to PSD-95. *Science*, **277**, 1511-1515.
- Kim, K.S., Yan, D. and Tomita, S. (2010) Assembly and stoichiometry of the AMPA receptor and transmembrane AMPA receptor regulatory protein complex. *J Neurosci*, **30**, 1064-1072.
- Ko, J., Zhang, C., Arac, D., Boucard, A.A., Brunger, A.T. and Sudhof, T.C. (2009) Neuroigin-1 performs neurexin-dependent and neurexin-independent functions in synapse validation. *Embo J*, **28**, 3244-3255.
- Kuriu, T., Inoue, A., Bito, H., Sobue, K. and Okabe, S. (2006) Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and -independent mechanisms. *J Neurosci*, **26**, 7693-7706.
- Lai, K.O. and Ip, N.Y. (2009) Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Curr Opin Neurobiol*, **19**, 275-283.
- Levinson, J.N., Chery, N., Huang, K., Wong, T.P., Gerrow, K., Kang, R., Prange, O., Wang, Y.T. and El-Husseini, A. (2005) Neuroigins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroigin-induced synaptic specificity. *J Biol Chem*, **280**, 17312-17319.
- Linhoff, M.W., Lauren, J., Cassidy, R.M., Dobie, F.A., Takahashi, H., Nygaard, H.B., Airaksinen, M.S., Strittmatter, S.M. and Craig, A.M. (2009) An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron*, **61**, 734-749.
- Missler, M., Zhang, W., Rohlmann, A., Kattenstroth, G., Hammer, R.E., Gottmann, K. and Sudhof, T.C. (2003) Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, **423**, 939-948.
- Morimoto-Tomita, M., Zhang, W., Straub, C., Cho, C.H., Kim, K.S., Howe, J.R. and Tomita, S. (2009) Autoinactivation of neuronal AMPA receptors via glutamate-regulated TARP interaction. *Neuron*, **61**, 101-112.
- Mukherjee, K., Sharma, M., Urlaub, H., Bourenkov, G.P., Jahn, R., Sudhof, T.C. and Wahl, M.C. (2008) CASK Functions as a Mg²⁺-independent neurexin kinase. *Cell*, **133**, 328-339.
- Nam, C.I. and Chen, L. (2005) Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroigin interaction and neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 6137-6142.
- Opazo, P., Labrecque, S., Tigaret, C.M., Frouin, A., Wiseman, P.W., De Koninck, P. and Choquet, D. (2010) CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron*, **67**, 239-252.
- Petrini, E.M., Lu, J., Cognet, L., Lounis, B., Ehlers, M.D. and Choquet, D. (2009) Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation. *Neuron*, **63**, 92-105.
- Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Zhang, M., Paarmann, I., Fuchs, C., Harvey, K., Jedlicka, P., Schwarzacher, S.W., Betz, H., Harvey, R.J., Brose, N., Zhang, W. and Varoqueaux, F. (2009) Neuroigin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron*, **63**, 628-642.
- Saglietti, L., Dequidt, C., Kamieniarz, K., Rousset, M.C., Valnegri, P., Thoumine, O., Beretta, F., Fagni, L., Choquet, D., Sala, C., Sheng, M. and Passafaro, M. (2007) Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron*, **54**, 461-477.

- Saint-Michel, E., Giannone, G., Choquet, D. and Thoumine, O. (2009) Neurexin/neuroigin interaction kinetics characterized by counting single cell-surface attached quantum dots. *Biophys J*, **97**, 480-489.
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R. and Serafini, T. (2000) Neuroigin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, **101**, 657-669.
- Schluter, O.M., Xu, W. and Malenka, R.C. (2006) Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. *Neuron*, **51**, 99-111.
- Sharma, K., Fong, D.K. and Craig, A.M. (2006) Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Mol. Cell. Neurosci.*, **31**, 702-712.
- Shi, S., Hayashi, Y., Esteban, J.A. and Malinow, R. (2001) Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell*, **105**, 331-343.
- Shi, Y., Lu, W., Milstein, A.D. and Nicoll, R.A. (2009) The stoichiometry of AMPA receptors and TARPs varies by neuronal cell type. *Neuron*, **62**, 633-640.
- Siddiqui, T.J., Pancaroglu, R., Kang, Y., Rooyakkers, A. and Craig, A.M. (2010) LRRTMs and neuroigins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. *J Neurosci*, **30**, 7495-7506.
- Sudhof, T.C. (2008) Neuroigins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, **455**, 903-911.
- Sugiyama, Y., Kawabata, I., Sobue, K. and Okabe, S. (2005) Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. *Nat Methods*, **2**, 677-684.
- Tanaka, J., Matsuzaki, M., Tarusawa, E., Momiyama, A., Molnar, E., Kasai, H. and Shigemoto, R. (2005) Number and density of AMPA receptors in single synapses in immature cerebellum. *J Neurosci*, **25**, 799-807.
- Tardin, C., Cognet, L., Bats, C., Lounis, B. and Choquet, D. (2003) Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J*, **22**, 4656-4665.
- Thoumine, O., Ewers, H., Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Giannone, G., Poujol, C., Legros, P., Lounis, B., Cognet, L. and Choquet, D. (2008) Probing the dynamics of protein-protein interactions at neuronal contacts by optical imaging. *Chem Rev*, **108**, 1565-1587.
- Tomita, S., Fukata, M., Nicoll, R.A. and Brecht, D.S. (2004) Dynamic interaction of stargazin-like TARPs with cycling AMPA receptors at synapses. *Science*, **303**, 1508-1511.
- Tsuriel, S., Geva, R., Zamorano, P., Dresbach, T., Boeckers, T., Gundelfinger, E.D., Garner, C.C. and Ziv, N.E. (2006) Local sharing as a predominant determinant of synaptic matrix molecular dynamics. *PLoS Biol.*, **4**, e271.
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R.L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Sudhof, T.C. and Brose, N. (2006) Neuroigins determine synapse maturation and function. *Neuron*, **51**, 741-754.
- Washbourne, P., Bennett, J.E. and McAllister, A.K. (2002) Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nat Neurosci*, **5**, 751-759.
- Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T. and Svoboda, K. (2009) Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron*, **61**, 247-258.

Figures legends

Figure 1: Nlg1 over-expression decreases AMPAR membrane diffusion

(A) Surface mobility of anti-GluA2, anti-GluA1, or anti-NCAM conjugated Qdots in 8-10 DIV rat neurons transfected with Homer1c:GFP (white staining) alone, or with Homer1c:GFP and Nlg1. Red traces represent individual Qdots trajectories over a 50 sec acquisition period. **(B)** The instantaneous diffusion coefficient was calculated for 200-350 per condition for 6 independent experiments (anti-GluA2), 40-154 trajectories from 1 experiment (anti-GluA1), and 200-700 trajectories from 2 experiments (anti-NCAM). Data are represented as median $\pm$ percentile (25-75% of the population) and compared using non parametric Mann Whitney test $**P<0.01$, $***P<0.0001$. **(C, D)** SEP-tagged recombinant GluA1 and GluA2 subunits transfected in neurons with or without Nlg1 were tracked using anti-GFP conjugated Qdots. **(C)** Representative trajectories for each condition. **(D)** Quantification of the global diffusion coefficients for 70-400 trajectories per condition from 2 experiments. Data were analysed by one-way ANOVA and Dunn's non parametric post test ($***P<0.001$).

Figure 2: Down-regulating Nlg1 expression increases AMPAR membrane diffusion

(A) AMPAR diffusion was measured using anti-GluA2 conjugated Qdots in primary neurons obtained from either WT or Nlg1 KO mouse pups. In some experiments, KO cultures were transfected with Nlg1 WT, and WT cultures with shRNA against Nlg1. **(B)** Diffusion coefficients were computed for 500-2000 trajectories from 6 independent experiments. Conditions were compared by one-way ANOVA and Dunn's non parametric post test ($***P<0.001$). **(C)** Surface expression of endogenous Nlg1 was measured in 1 week old rat or mouse neurons, in conditions of over-expression or down regulation of Nlg1 expression, using a live surface labelling with Nr1 β -Fc, followed by a secondary Cy3-conjugated anti-Fc antibody (false colour coding). **(D)** Quantification of the Nr1 fluorescent labelling in arbitrary units. The number of cells examined in each condition is indicated in the columns (2 independent experiments). Data were compared using non parametric one-way ANOVA followed by Dunn's non parametric post test for graphs C and E ($***P<0.001$), and Bonferroni's parametric post test in graph G ($*P<0.05$; $***P<0.001$). Nlg1 over-expression results in an approximately 10-fold increase in Nr1 β -Fc labeling in rat neurons (not shown).

Figure 3: Nlg1 immobilizes AMPAR at PSD-95 clusters

(A,B) The surface mobility of AMPARs was monitored using anti-GluA2 or anti-GluA1 Qdots in 8-10 DIV rat neurons co-expressing Homer1c:GFP and different Nlg1 mutants (no Nlg1, Nlg1 WT, Nlg1 Δ C, or Nlg1 SWAP). **(A)** Examples of 50 sec trajectories of anti-GluA2 Qdots for each condition. **(B)** Distributions of the global diffusion coefficient for anti-GluA2 and anti GluA1 coated Qdots, for each Nlg1 mutant (100-350 trajectories from 6 independent experiments, and 40-187 trajectories from 1 experiment, respectively). **(C, D)** AMPAR mobility was monitored using anti-GluA2 Qdots in rat neurons co-transfected with Nlg1 WT or Nlg1 SWAP, together with shRNA against rat PSD-95, or a control construct containing the same shRNA against PSD-95 but also expressing a recombinant PSD-95:GFP insensitive to the shRNA (replPSD-95). **(C)** Representative traces for GluA2 trajectories in each condition. **(D)** Distributions of the global diffusion coefficient for each condition (450-1350 trajectories from 3 independent experiments). In all graphs, conditions were compared by one-way ANOVA and Dunn's non parametric post test *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$. **(E)** Distribution of diffusion coefficients inside or outside PSD-95 clusters. Data from 280-1320 trajectories, from 2 independent experiments were compared using non parametric Mann Whitney test (*** $P < 0.0001$). **(inset)** Representative trace showing the specific confinement of a GluA2-conjugated Qdot on PSD-95:GFP clusters (red dots) obtained for a neuron transfected with replPSD-95 and Nlg1 WT.

Figure 4: Binding of Nr1 β aggregates induces formation of post-synapses, and recruitment of AMPARs

(A) 6-7 DIV rat hippocampal neurons expressing Nlg1 WT or Nlg1 Δ C were incubated with purified Nr1 β -Fc cross-linked by Cy5 labelled secondary antibodies. Green arrowheads point to pre-existing PSD-95:GFP clusters. Incubation with Nr1 β aggregates induced the formation of new PSD-95 clusters co-localized with Nr1 β spots (red arrows). **(B-D)** Neurons expressing Nlg1 WT and PSD-95:mCherry were incubated with Nr1 β aggregates. **(B)** Endogenous AMPARs were live stained with an antibody against the GluA1 extracellular domain. **(C)** As a control, the non synaptic protein NCAM was live stained with a polyclonal antibody. **(D)** Quantification of the enrichment of GluA1, NCAM, and PSD-95:mCherry at Nr1 β aggregates (400-5000 clusters from 2 independent experiments, 7-30 cells per condition and per time point). Data were analysed by two-way ANOVA and Bonferroni's post test, comparing PSD-95:mCherry and GluA1 enrichment to NCAM, over time (*** $P < 0.001$). To analyze the recruitment of PSD-95 and AMPAR at Nr1 β clusters with either Nlg1 WT or Nlg1 Δ C, data were compared using Mann-Whitney t-test (*** $P < 0.0001$). In parallel experiments, the enrichment level of PSD-95:mCherry, GluA1, and NCAM was measured at native synapses (i.e. PSD-95:mCherry puncta), in the absence of Nr1 β clusters. These data are represented by closed circles on the left of the graph

(synapses). **(E, F)** Representative examples of AMPA currents elicited upon glutamate iontophoresis at either pre-existing synaptic PSD-95 clusters (green arrowhead) or newly formed PSD-95 clusters induced by cross-linked Nr α 1 β -Fc (red arrow). **(G)** Average current amplitudes obtained from 8 neurons (the number of clusters is indicated in the columns). Data were significantly different by unpaired t-test (** $P < 0.01$).

Figure 5: Lateral diffusion is necessary for AMPAR recruitment at novel Nr α /Nlg adhesions

(A-B) 9 DIV rat hippocampal neurons co-expressing Nlg1 WT and Homer1c:GFP were incubated or not with purified Nr α 1 β -Fc cross-linked by Cy3 labelled secondary antibodies. The surface mobility of either AMPARs **(A, B)** or NCAM **(B)** was monitored using anti-GluA2 or anti-NCAM conjugated Qdots, respectively. **(A)** Representative Qdot trajectories showing the immobilization of AMPARs at Homer1c:GFP labelled synapses in the control condition, or on Nr α 1 β -Fc aggregates (red dots). **(B)** Quantification of the global diffusion coefficients of AMPARs (450 -700 trajectories) and NCAM (100-400 trajectories), and of the local Qdot diffusion coefficient of AMPARs at either Homer1c:GFP spots or Nr α 1 β -Fc aggregates (41 and 366 trajectories, respectively). Data were compared using a Mann Whitney t-test (* $P < 0.05$). **(C-F)** Recruitment of recombinant AMPAR subunits at Nr α 1 β aggregates. Neurons were co-transfected with Nlg1 WT and either SEP:GluA1 **(E)** or SEP:GluA2 **(C,D)**. After a 30 min or 1 hr incubation period with Nr α 1 β aggregates, cells were fixed and surface receptors were labelled with anti-GFP antibodies. **(D, F)** In some experiments, neurons expressing Nlg1 WT and SEP:GluA2 were pre-treated with a polyclonal anti GFP antibody to cross-link surface SEP:GluA2 in order to block their membrane diffusion, then exposed to Nr α 1 β aggregates. Cells were fixed and surface SEP:GluA2 receptors were stained with a monoclonal anti-GFP antibody followed by a secondary anti-mouse alexa 488. **(F)** Comparison of the specific enrichment of each subunit at Nr α /Nlg1 clusters (300-3500 clusters, 8-30 cells per condition and per time point). Data were analysed by two-way ANOVA and Bonferroni's post test comparing SEP:GluA2 enrichment to SEP:GluA1 (** $P < 0.001$), or X-link SEP:GluA2 to SEP:GluA2 (** $P < 0.001$).

Figure 6: Recruitment of PSD-95 and AMPARs at novel Nr α /Nlg adhesions competes with pre-existing synapses

9 DIV rat hippocampal neurons expressing either Nlg1 WT or Nlg1C, together with PSD-95:GFP were incubated with purified Nr α 1 β -Fc (or human Fc as a control) cross-linked by Cy5 labelled anti-Fc antibodies. **(A-B)** The distribution of PSD-95:GFP was monitored in living cells during a 30 min incubation period. **(A)** Representative

time course images showing the progressive disappearance of PSD-95:GFP from pre-existing clusters (red arrowheads), concomitant to the formation of new clusters (white arrows). **(B)** Quantification of the fluorescence of a subset of well-identified pre-existing PSD-95:GFP clusters over time, after correction for global photo-bleaching (mean $\pm$ sem of 50-80 clusters from 7-15 cells). The control condition includes neurons expressing Nlg1 Δ C incubated with cross-linked Nr1 β -Fc, and neurons expressing Nlg1 WT and incubated with cross-linked Fc. Data were compared using two-way ANOVA and Bonferroni's post test (***P<0.001). A depletion rate was quantified for each cluster by fitting a linear relationship through the fluorescence decay. Depletion rates expressed in % fluorescence decrease/min, were 0.84 ± 0.07 (n = 82 PSD-95 clusters) for Nr1 β /Nlg1, 0.24 ± 0.11 (n = 32) for Fc/Nlg1, and 0.44 ± 0.14 (n = 27) for Nr1 β /Nlg1 Δ C (statistical significance P<0.0001 by 1-way ANOVA). **(C-D)** Neurons expressing Nlg1 WT and PSD-95:GFP either without treatment or after a 1 hr incubation with cross-linked Nr1 β -Fc, were subjected to patch clamp recording, in the presence of TTX and APV to isolate AMPA mEPSCs. **(C)** Images of a patched neuron in DIC and in fluorescence (PSD-95:GFP in green, and Nr1 β -Fc Cy5 clusters in red). **(D)** Representative time sequence and individual AMPA mEPSCs traces. **(E)** Double staining of endogenous AMPAR with anti-GluA1 antibodies (green), and pre-synapses with anti-synapsin (red), in 10 DIV neurons expressing either Nlg1WT or Nlg1Swap. Transfected cells were detected by co-expression of GFP (not shown). Note the lower degree of apposition between GluA1 and synapsin for the Nlg1Swap mutant.

Figure 7: Reduced AMPA currents in developing synapses

CA1 pyramidal neurons of acute hippocampal slices from P8-P9 WT or Nlg1 KO pups, were subjected to patch-clamp recordings at -60 mV, in the presence of 0.5 μ M TTX and 4 mM Mg to isolate AMPA mEPSCs. **(A)** Representative electrophysiological sequences of 10 sec for both conditions. Events of amplitude greater than a 7 pA threshold were automatically detected. **(B)** The mEPSC frequency was calculated for each cell as the total number of events per 15 min recording, and averaged out. The number of recorded cells is indicated in the bars. Data were compared with student t-test * p<0.05. **(C)** Cumulative distribution of all inter-event intervals (2357 events for WT, and 1183 for KO cells, respectively). **(D)** The median of the non-gaussian distribution of mEPSC amplitudes per cell was averaged over 12-14 cells per condition. Data were compared with student t-test * p<0.05. **(E)** Cumulative distribution of all mEPSC amplitudes.

Figure 8: Model of the recruitment of post-synaptic components to novel Nr1 β /Nlg1 contacts

Triggering the formation of new Nr1/Nlg adhesions (1) induces the initial recruitment of PSD-95 from both extra-synaptic pools and synapses (2). These novel PSD-95

slots serve as anchors for trapping surface diffusing AMPARs coming both from extra-synaptic compartments and synapses (3).

Supplemental Figure 1: Experimental design and Qdot binding specificity

(A) Schematic diagram of the Qdot tracking experiment. **(B)** Schematic diagram of the Nrj/Nlg cross-linking experiment. **(C)** Representative images of neurons incubated for 10 min with Qdots conjugated with Fab anti-GluA2. Rat neurons (left) were either untransfected (7 cells) or transfected with SEP:GluA2 (5 cells), and compared with neurons from either WT (9 cells) or GluA2 KO (12 cells) mice neurons (right). **(D)** Quantification of the number of Qdots bound per dendrite surface area, in all conditions (mean $\pm$ SEM). Data were compared using one-way ANOVA and Bonferroni's post test (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$).

Supplemental Figure 2: Effects of Nlg1 mutants on pre- and post-synapse formation

(A) Rat hippocampal neurons expressing PSD-95:GFP and Nlg1 mutants were fixed and labelled for the pre-synaptic marker synapsin. **(B)** Quantification of the number of synapsin puncta per μm^2 . Over-expression of Nlg1 WT and Nlg1 ΔC induced an increase of 50% in the number of synapsin puncta when compared with cells transfected with PSD-95:GFP alone. In contrast, Nlg1Swap had no effect. **(C)** Quantification of the number of PSD-95:GFP puncta per μm^2 . Only Nlg1 and Nlg1Swap increased the number of PSD-95:GFP puncta. **(D)** Analysis of the fraction of PSD-95:GFP clusters apposed to synapsin spots. Without over-expression of Nlg1 there is only 50% of PSD-95 clusters apposed to a pre-synapse. This proportion does not change upon expression of Nlg1 WT and Nlg1 ΔC . In striking contrast, the expression of Nlg1Swap decreases to 25% the fraction of PSD-95 clusters apposed to a pre-synapse (comparison of 2 independent experiments, $n = 8-19$ cells). Data were compared using one-way ANOVA and Bonferroni's post test ** $P < 0.01$.

Supplemental Figure 3: The reduction in AMPAR diffusion caused by Nlg1 is correlated with the presence of PSD-95 slots

(A, C) The surface mobility of AMPARs was monitored using anti-GluA2 Qdots in 8-10 DIV rat neurons co-expressing Homer1c:GFP and different Nlg1 mutants (no Nlg1, Nlg1 WT, Nlg1 ΔC , or Nlg1 Swap). **(A)** The diffusion coefficient was computed for stretches of trajectories specifically localized on Homer1c:GFP synaptic stainings (40-120 trajectories). **(B)** The surface mobility of AMPARs was monitored using anti-GluA2 Qdots in 8-10 DIV rat neurons co-expressing either Nlg1WT + replPSD-95 + Homer1c:DsRed, or Nlg1Swap + replPSD-95 + Homer1c:DsRed. The diffusion

coefficient at Homer1c:DsRed or PSD-95:GFP clusters was compared using the same trajectories (60-260 trajectories). **(C)** Plot of the median GluA2 diffusion coefficient versus the surface density of either Homer1c:GFP, or PSD-95:GFP clusters, upon expression of the various Nlg1 mutants. Diffusion values are taken from Fig.3B. Synapse density values are taken from Supplemental Fig. 2. The correlation coefficient in either case was evaluated by linear regression.

Supplemental Figure 4: Effect of PSD-95 knock-down or replacement on actual PSD-95 level and AMPAR diffusion

(A) 10 DIV rat hippocampal neurons expressing shPSD-95 or the replPSD-95 plasmid (GFP channel) were immuno-labelled for endogenous PSD-95 (Alexa⁵⁶⁸ red channel) and the fluorescence intensity in dendrites was measured. Intensity values were 43 ± 5 arbitrary units for neurons expressing shPSD-95, and 142 ± 18 arbitrary units for untransfected counterparts in the same field of view ($P < 0.0001$ by paired t-test, $n = 11$ cells), indicating a 70% down-regulation. Intensity values were 7452 ± 1181 arbitrary units ($n = 12$ cells) for cells expressing replPSD-95, and 356 ± 53 arbitrary units ($n = 14$ cells) for un-transfected counterparts on the same field of view ($P < 0.0001$ by unpaired t-test), showing an over-expressing factor of 20. **(B)** Quantification of endogenous GluA2 instantaneous diffusion in neurons expressing GFP, shPSD-95 and GFP, or replPSD-95 (320-1130 trajectories per condition). Data were compared using Mann-Whitney t-test ($***P < 0.0001$).

Supplemental Figure 5: AMPARs stop at co-localizing Nlg1 and PSD-95 clusters

(A) 9 DIV Neurons expressing HA:Nlg1 and PSD-95:GFP were labelled for surface Nlg1 using anti-HA antibodies. All cells expressing PSD-95:GFP presented a positive labelling for HA:Nlg1, demonstrating co-expression. Membrane HA:Nlg1 was partially co-localized with PSD-95:GFP clusters. **(B)** Example trace showing the specific confinement of a GluA2-conjugated Qdot on a cluster containing both PSD-95 (blue pixels) and Nlg1 (magenta pixels).

Supplemental Figure 6: Cross-linking surface AMPARs by antibodies blocks their membrane diffusion

8 DIV neurons co-expressing Nlg1 and SEP:GluA2 in control condition **(A)**, or after surface cross-linking of SEP:GluA2 using anti-GFP antibody **(B)**. The red traces represent GluA2-coupled Qdot trajectories. **(C)** Quantification of SEP:GluA2 instantaneous diffusion in control condition, or after surface cross-linking (255 and 107 trajectories, respectively, from 2 independent experiments). Data were compared using a non parametric Mann Whitney test ($*** P < 0.0001$).

Supplemental Figure 7: Distinction between synaptic and extra-synaptic PSD-95 clusters upon triggering Nrx/Nlg adhesions

Neurons co-expressing Nlg1 WT and PSD-95:GFP were treated with cross-linked Nrx1 β -Fc for 30 min. After treatment, active pre-synapses were labelled by live staining using a fluorescently-labeled antibody against the synaptotagmin luminal domain. **(A)** Images of PSD-95:GFP before (left) and after (right) Nrx1 β -Fc addition. The green arrow is pointing a pre-existing PSD-95:GFP cluster apposed to a pre-synaptic terminal. The red arrows show newly-formed PSD-95:GFP clusters non-apposed to the synaptotagmin labeling. **(B)** Examples of PSD-95:GFP and synaptotagmin images treated by a wavelet segmentation program to isolate pre- and post-synaptic spots. Two spots were taken as being apposed if the distance between them was smaller or equal to 1 pixel. **(C)** Surface density of PSD-95:GFP puncta before, and after 30 min of incubation with antibody cross-linked Nrx1 β -Fc. The mean density increased from 0.19 ± 0.02 to 0.30 ± 0.03 clusters/ μm^2 (16 cells). **(D)** Percentage of apposition between PSD-95:GFP clusters and endogenous synaptotagmin puncta before and after 30 min incubation with cross-linked Nrx1 β -Fc. The percentage decreased from 58 ± 3 % to 48 ± 3 % (16 cells). Data were compared by paired t-test (***) $P < 0.0001$. **(E)** Analysis of the fluorescence depletion for PSD-95:GFP clusters apposed or not to a pre-synapse (n = 27 and 16 clusters respectively, from 7 different cells). Extra-synaptic and synaptic clusters exhibited similar depletion rates.

Figure 1

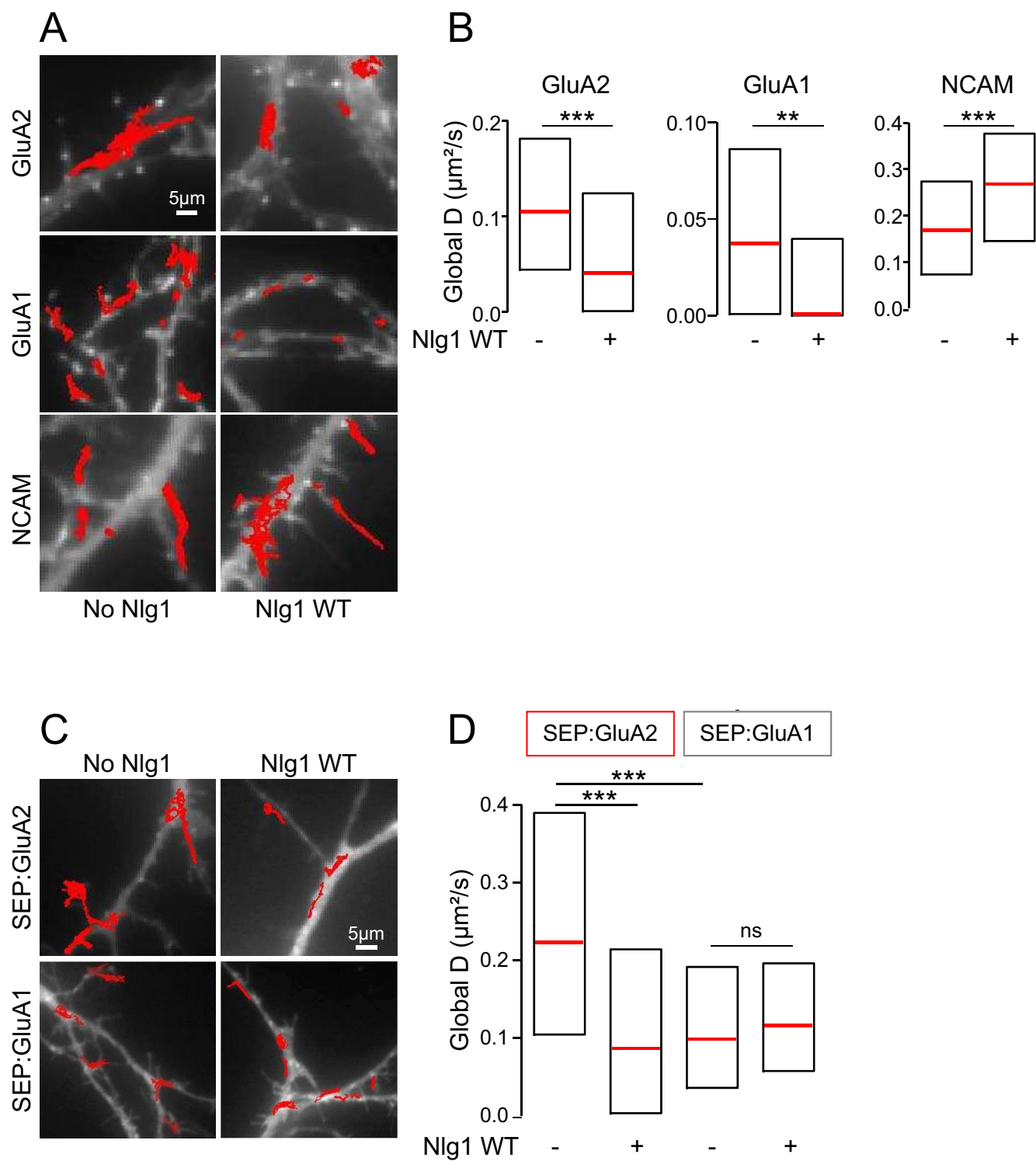


Figure 2

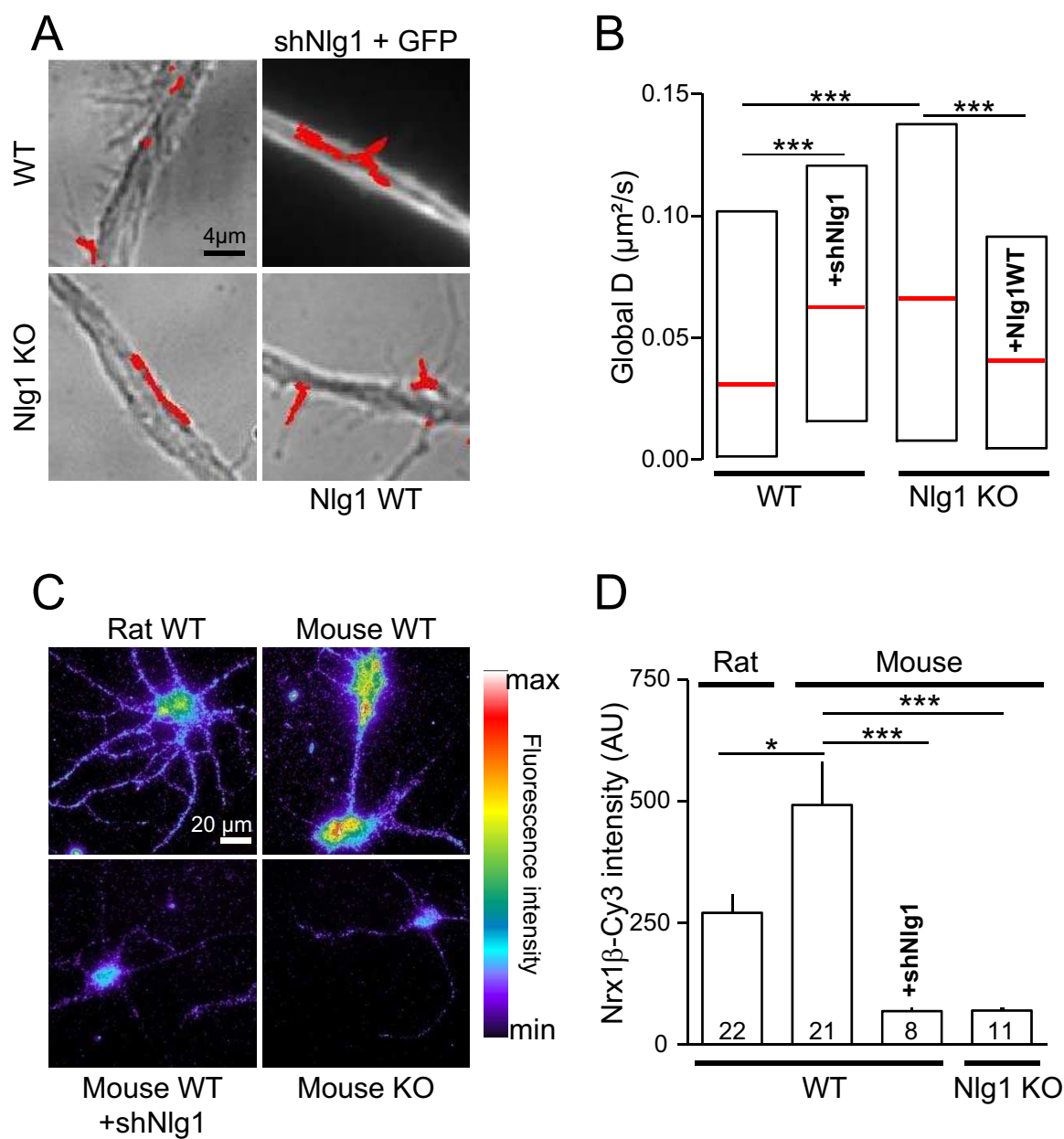


Figure 3

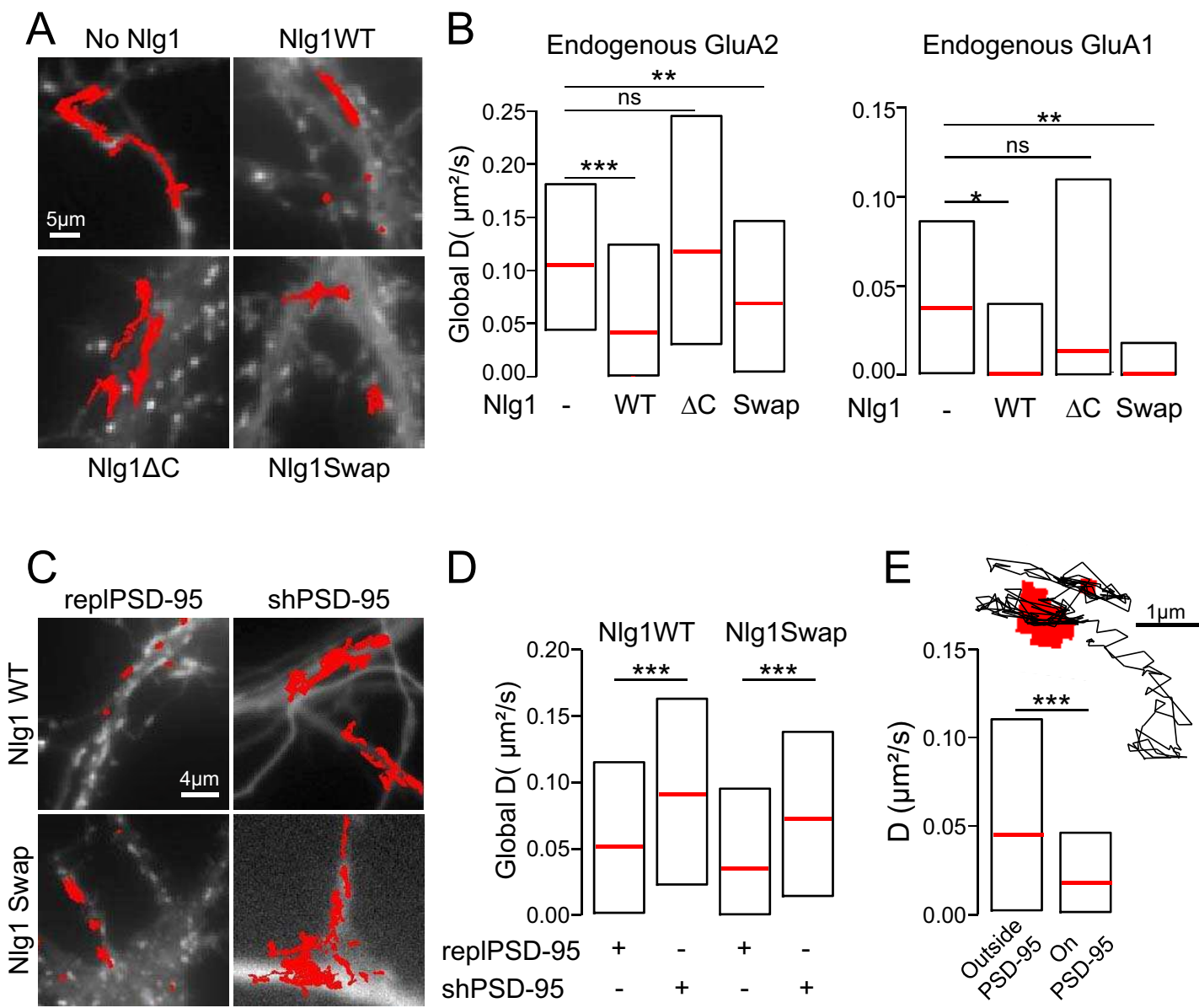


Figure 4

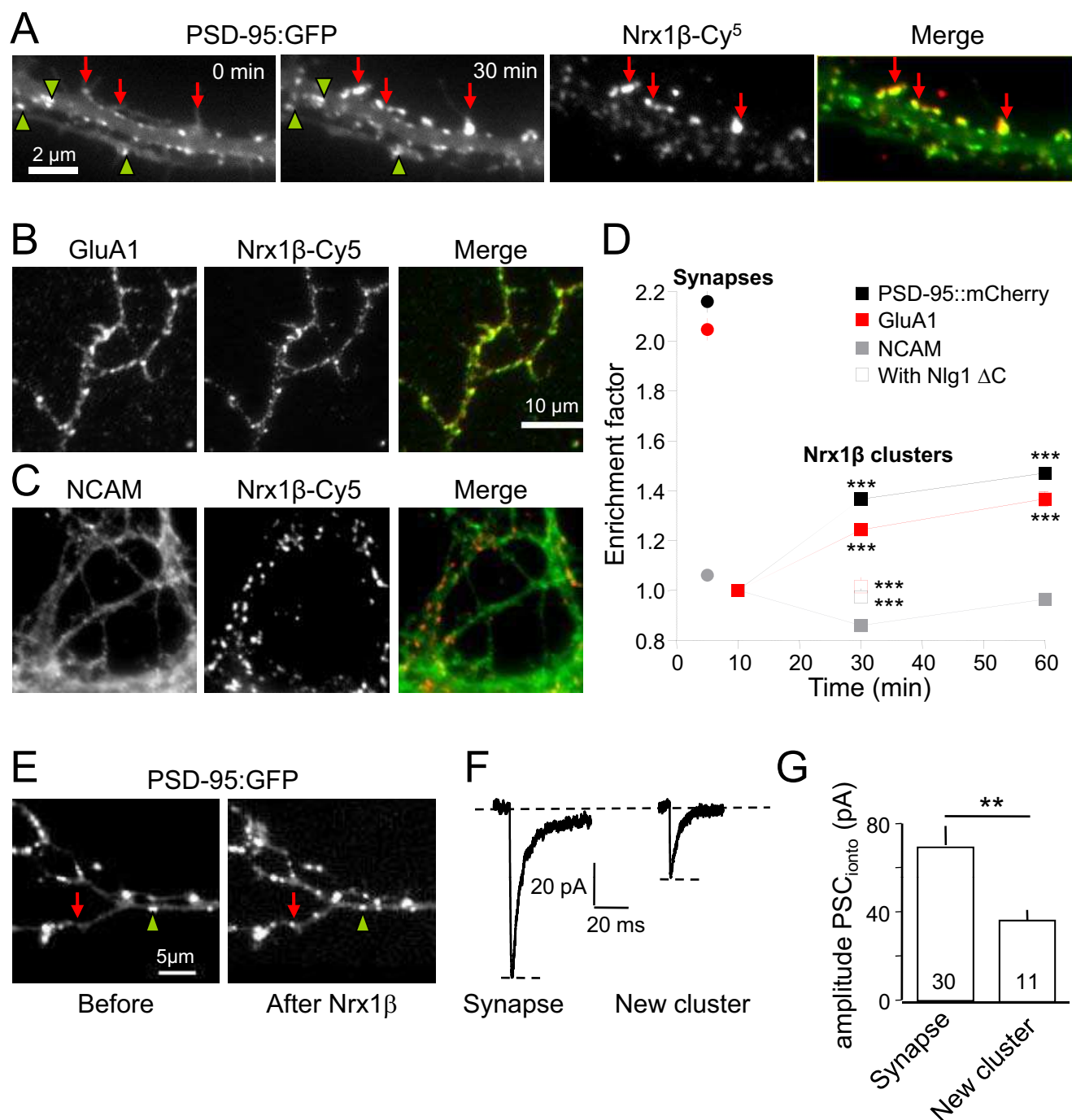


Figure 5

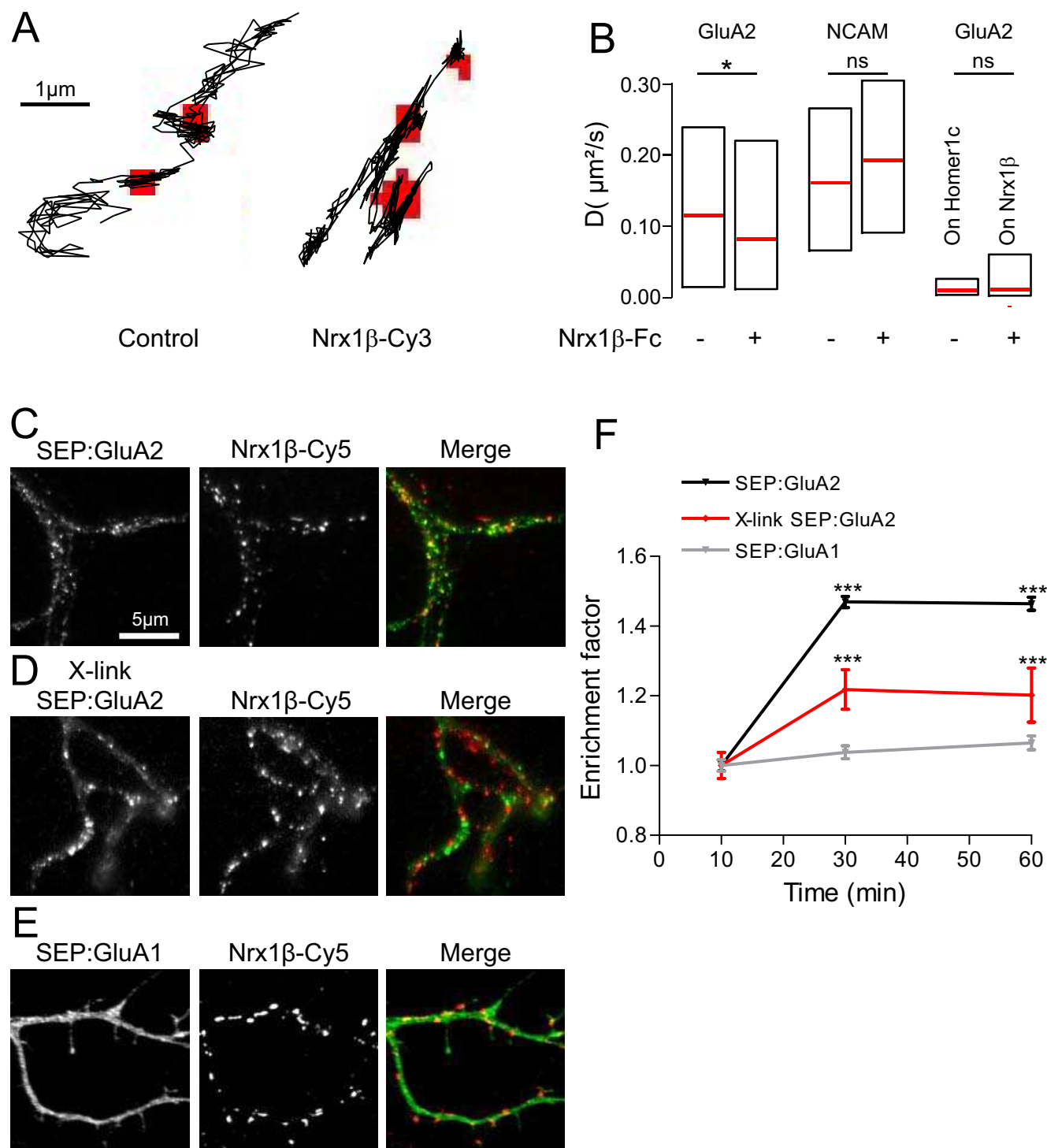


Figure 6

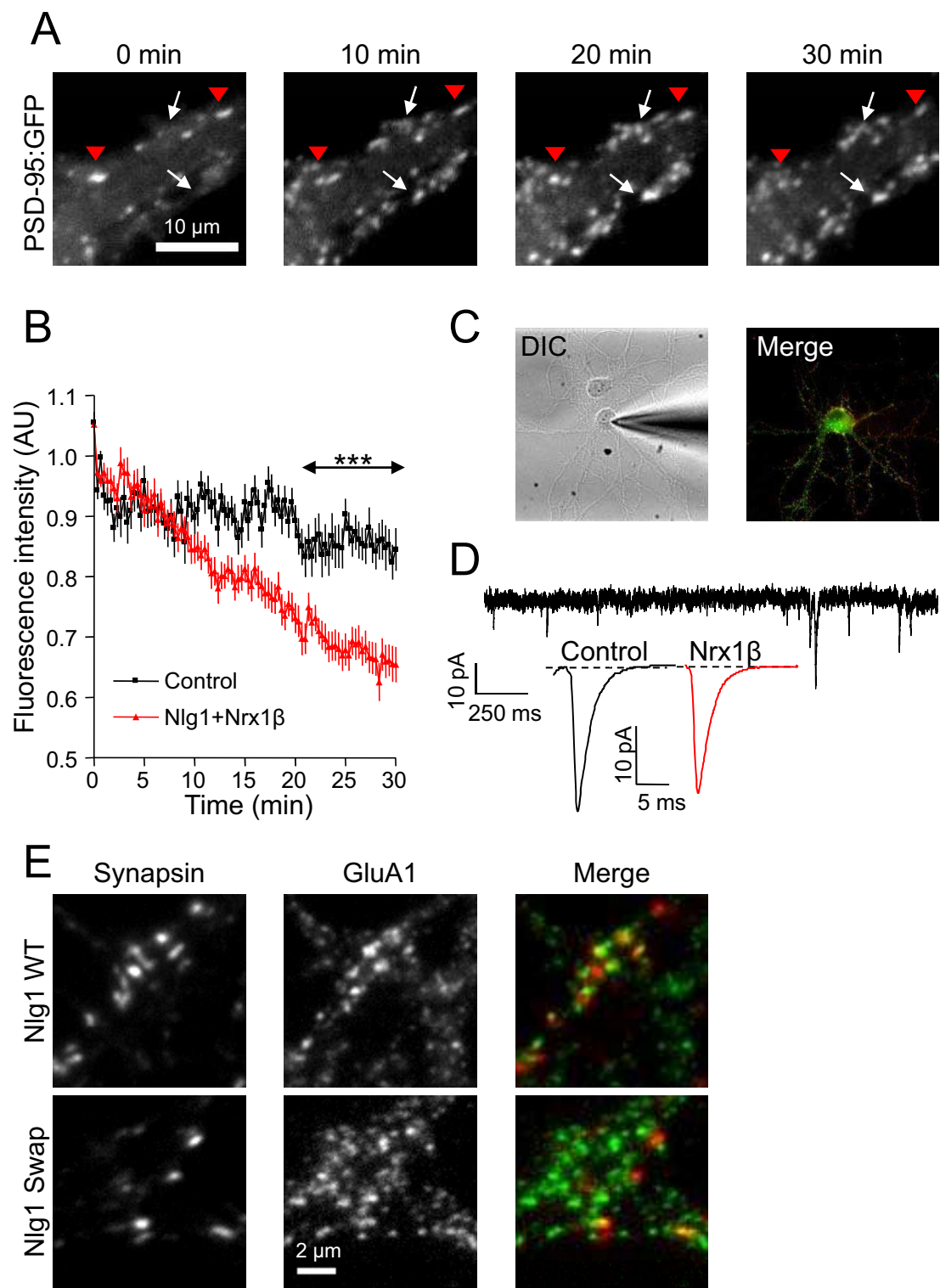


Figure 7

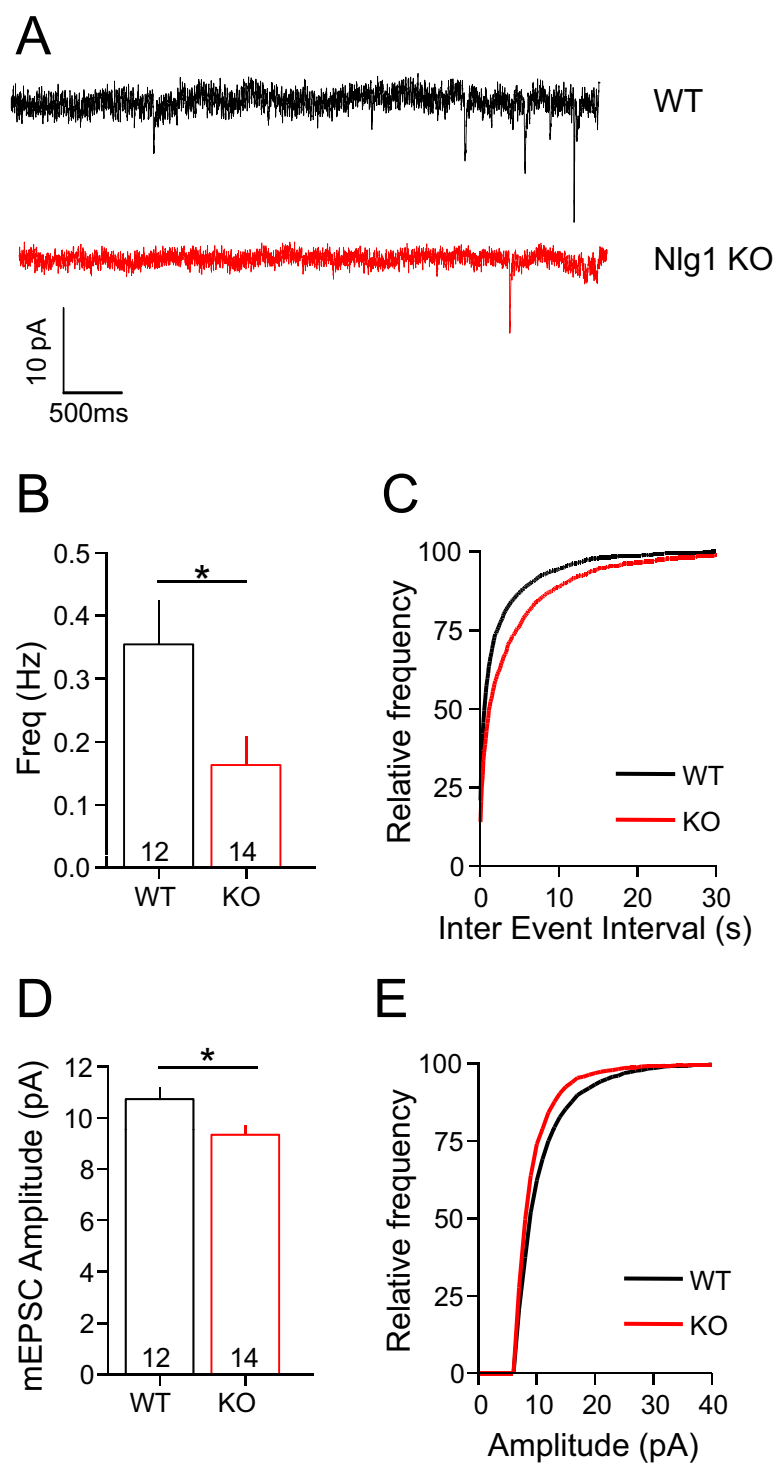
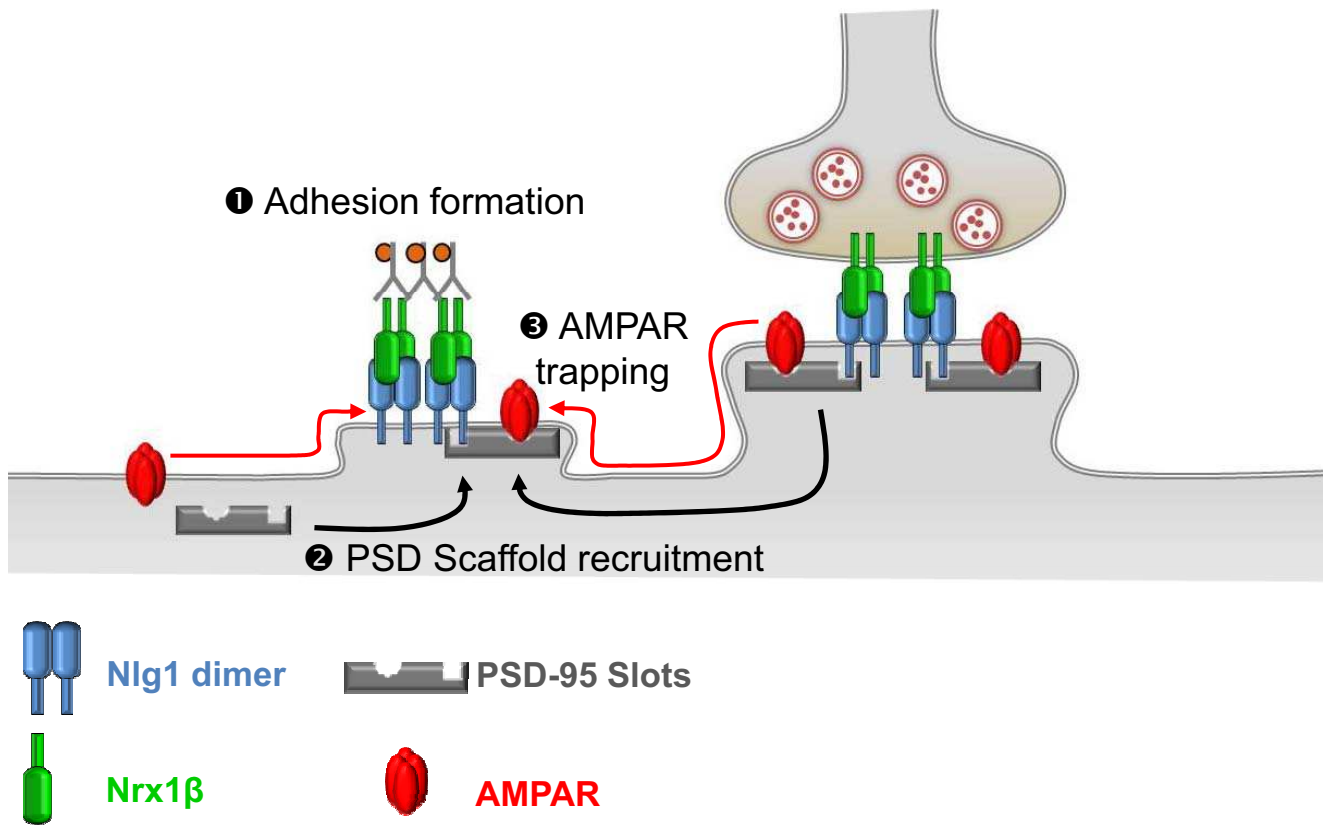
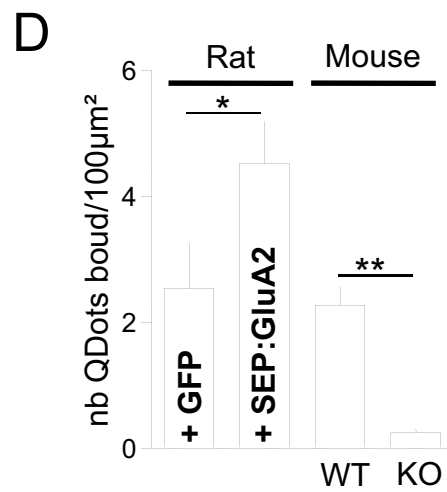
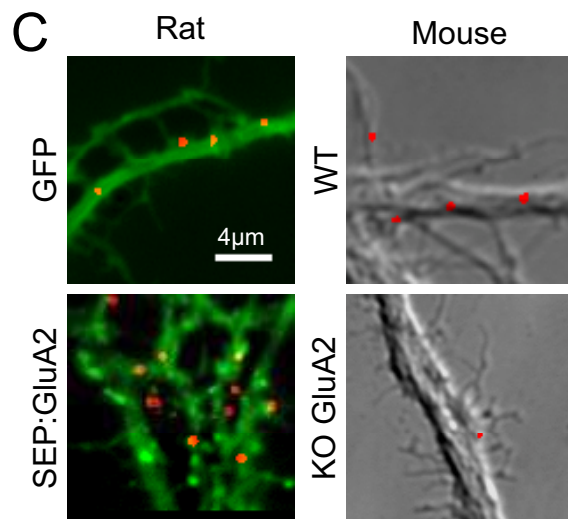
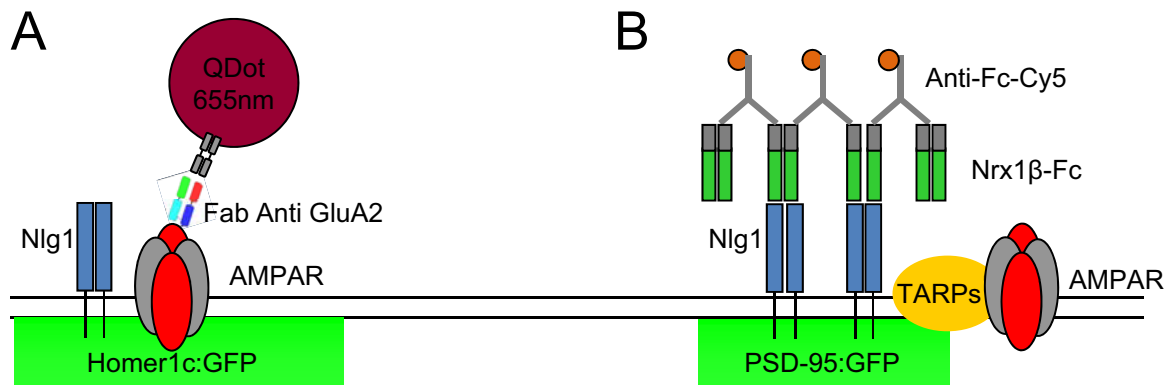


Figure 8

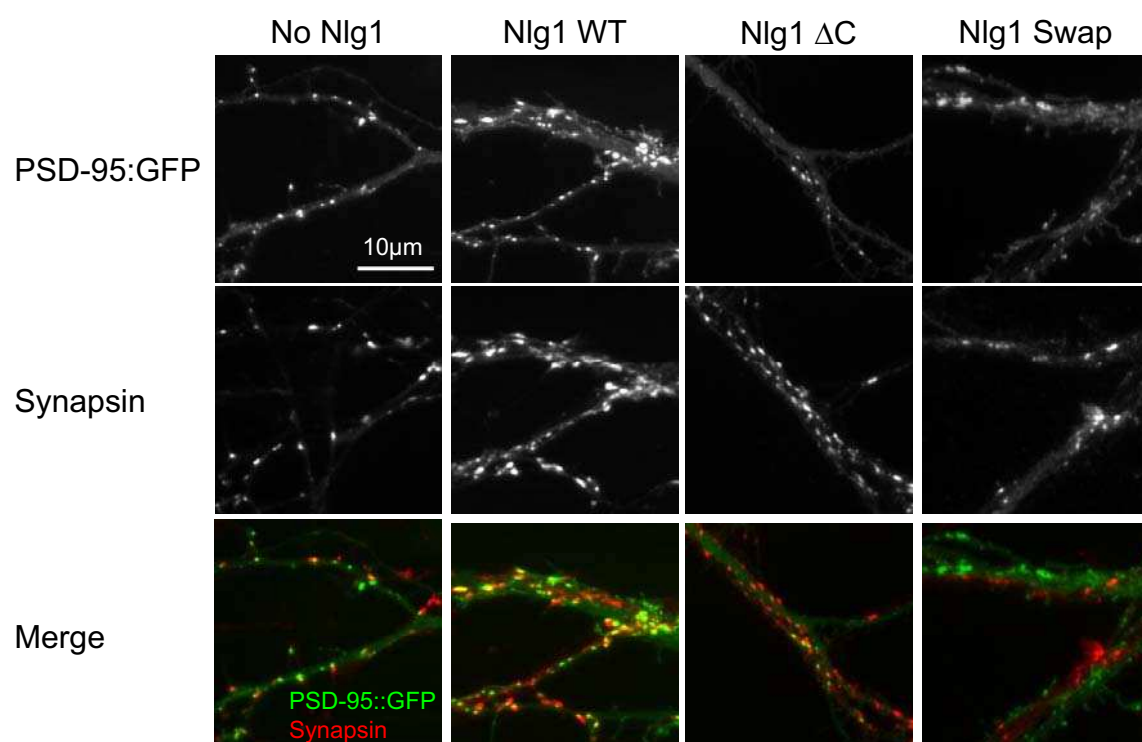


Supplemental Fig 1

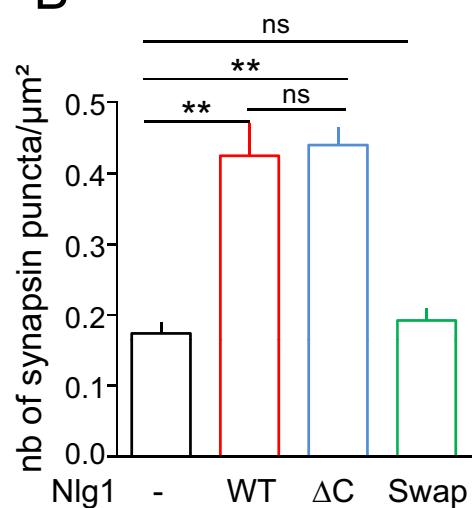


Supplemental Fig 2

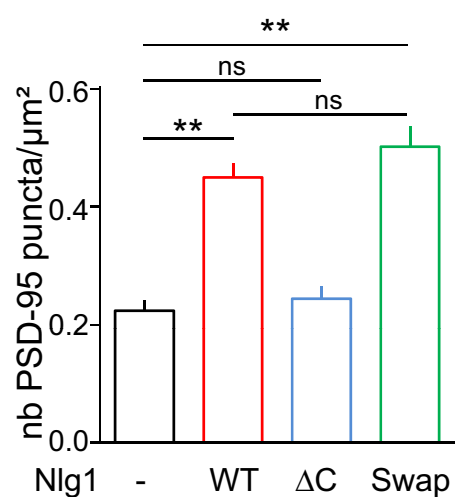
A



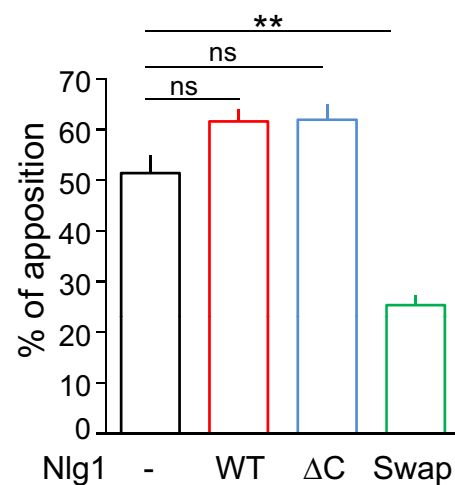
B



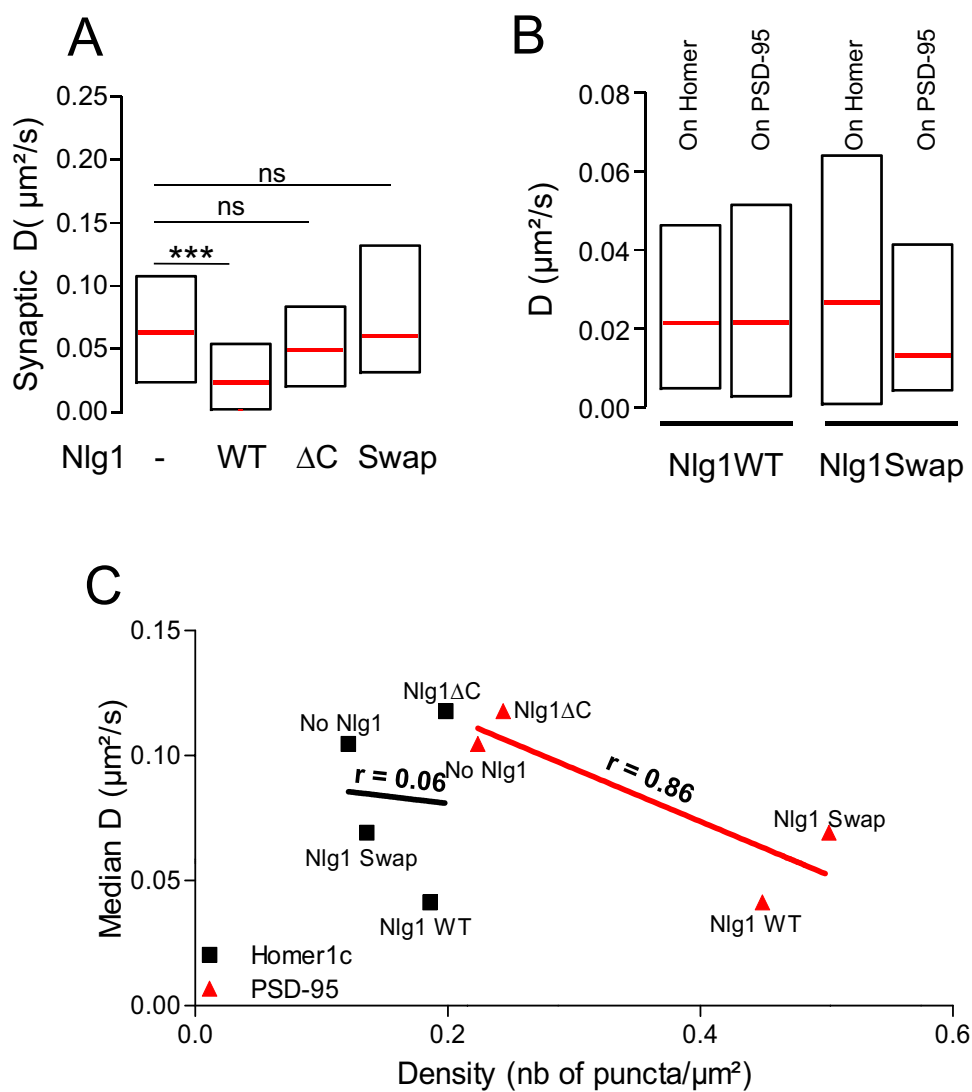
C



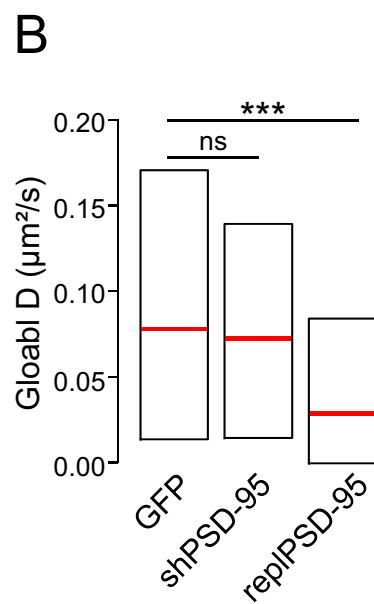
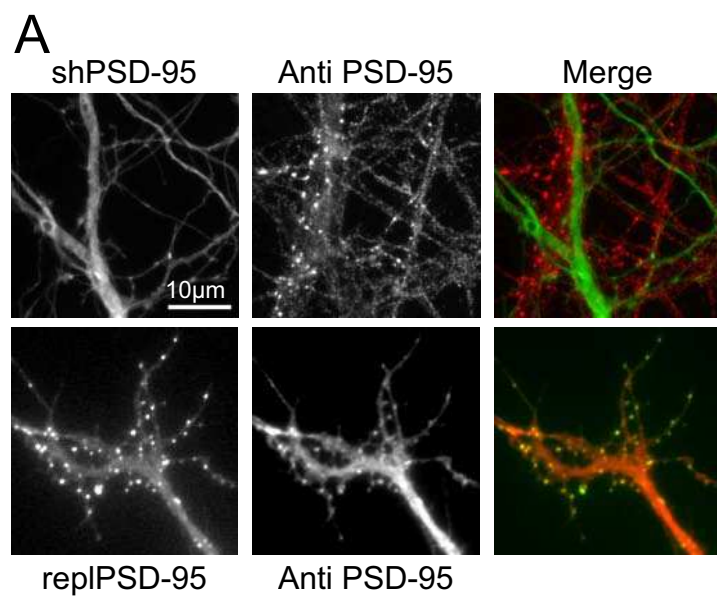
D



Supplemental Fig 3

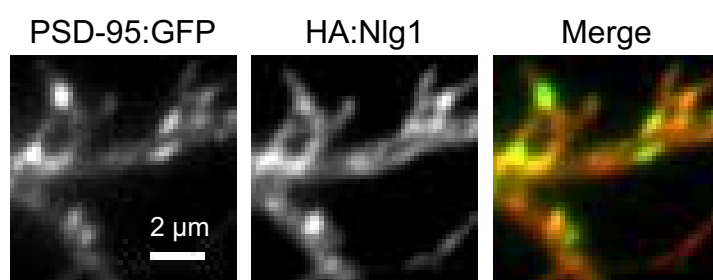


Supplemental Fig 4

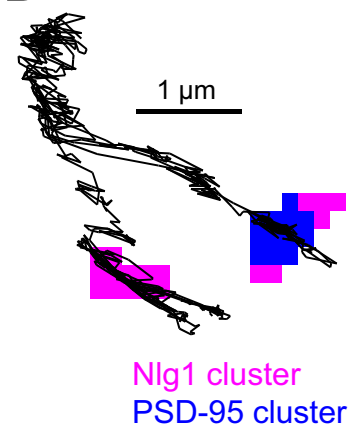


Supplemental Fig 5

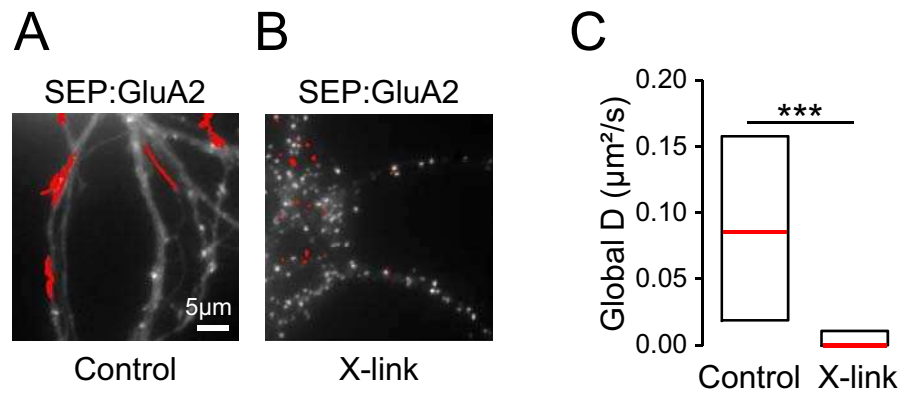
A



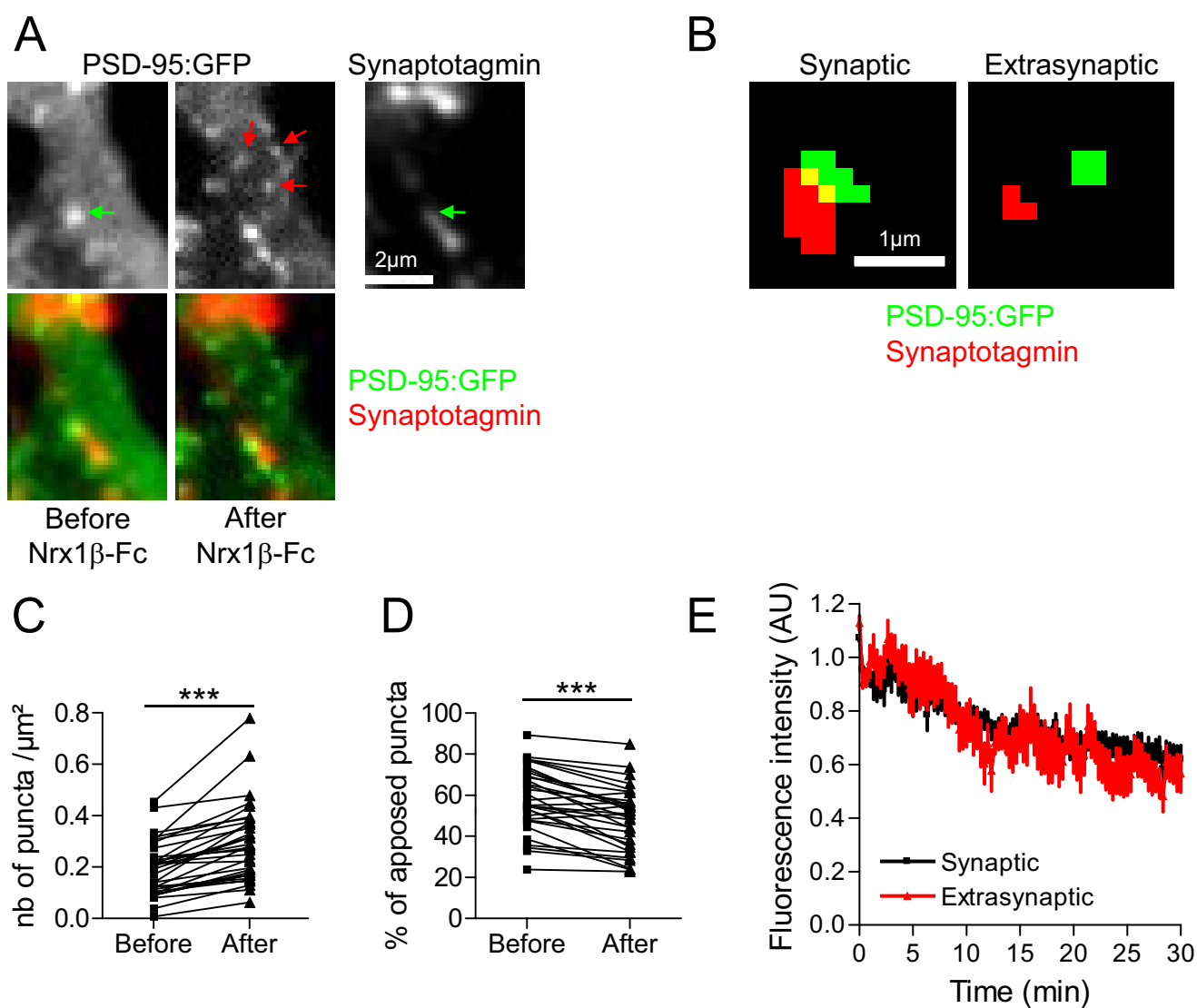
B



Supplemental Fig 6



Supplemental Fig 7



DISCUSSION PERSPECTIVES

DISCUSSION/PERSPECTIVES

Au cours de ces 3 études, nous avons tenté d'élucider les mécanismes de formation des post-synapses excitatrices induites par les complexes $\text{Nrx1}\beta/\text{Nlg1}$. Nous nous sommes intéressés aux acteurs moléculaires et à leurs mécanismes de recrutement aux synapses naissantes. L'utilisation des différents modèles biomimétiques pour induire la formation des post-synapses nous a permis de mettre à jour les cinétiques de recrutement de PSD-95 et des rAMPA. L'utilisation de mutants ou d'outils d'invalidation tels que les shRNA nous a permis de montrer que le recrutement préalable de PSD-95 est indispensable au recrutement des rAMPA. Ainsi, PSD-95 servirait de socle à l'ancrage des récepteurs aux contacts $\text{Nrx1}\beta/\text{Nlg1}$. En étudiant les rAMPA endogènes ou les sous-unités GluA1 et GluA2 nous avons mis en évidence leur cinétique de recrutement aux contacts $\text{Nrx1}\beta/\text{Nlg1}$, ainsi que les mécanismes mis en jeu dans ce recrutement. L'ensemble de ces études nous a donc permis de mettre en évidence le rôle primordial que jouent les complexes Nrx/Nlg lors de l'assemblage des contacts synaptiques et plus particulièrement dans la mise en place des rAMPA.

I. Evolution des modèles biomimétiques

Les modèles de co-culture ont permis de mettre en évidence le rôle des molécules d'adhérence dans la différenciation synaptique (Biederer and Scheiffele, 2007). Ces modèles ont l'avantage de pouvoir localiser de manière aisée les sites de contacts (cellule hétérologue/neurone) et d'isoler l'effet de complexes protéiques précis en exprimant des protéines recombinantes à la surface des cellules hétérologues. Cependant, la formation des contacts dépend de la densité de neurones et de cellules hétérologues, ainsi que de la croissance neuritique. Dans ce modèle, les cellules et les neurones sont mis en contact pendant 24 à 48 heures avant d'être observés. Il n'est donc pas possible de connaître précisément l'âge des contacts formés et donc d'étudier les cinétiques de recrutement des composants synaptiques. Par la suite, l'utilisation de billes recouvertes de protéines recombinantes incubées sur des neurones en culture a permis d'avoir accès à ces cinétiques. En effet, dans ce modèle, le temps de contacts entre les billes et les cellules est maîtrisé (avec un délai d'environ 1 heure), ce qui nous a permis de montrer un recrutement de PSD-95 et des rAMPA aux contacts $\text{Nrx1}\beta/\text{Nlg1}$ en 1 à 4 heures. Ces résultats, bien que donnant une appréciation de la gamme de temps nécessaire au recrutement des composants post-synaptiques, présentent des cinétiques plus longues que d'autres études

ayant observé la formation de post-synapses en 30 minutes à 1 heure (Friedman et al., 2000; Bresler et al., 2001). Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'après avoir été déposées dans le milieu de culture, les billes de latex doivent sédimenter avant de rentrer en contact avec les cellules. Afin de diminuer ce temps de latence et de synchroniser la fixation des billes sur les cellules, O. Thoumine a envisagé une étape de centrifugation juste après avoir déposé les billes sur les cellules. Cependant, cette étape accroît fortement la fixation non spécifique des billes recouvertes de Nr x 1 β au substrat de verre (observations non publiées). En nous basant sur l'article de C. Dean en 2003 (Dean et al., 2003), nous avons ensuite mis au point un modèle différent dans lequel la Nr x 1 β purifiée est agrégée par des anticorps afin de mimer les phénomènes d'adhésion induisant la formation de post-synapses. Entre temps, des études utilisant des modèles identiques ou similaires pour étudier le rôle des adhésions Nr x /Nlg dans la synaptogenèse sont parues (Barrow et al., 2009; Pouloupoulos et al., 2009). Nous avons ainsi pu observer la formation d'un grand nombre de post-synapses de taille comparable à celle des synapses endogènes. En utilisant ce modèle, nous avons pu disséquer de manière plus précise les cinétiques d'assemblage de ces post-synapses et observer un recrutement de PSD-95 après 10 à 30 minutes de formation des contacts Nr x 1 β /Nlg1.

II. Mécanismes de recrutement

A. Mise en place de l'échafaudage PSD-95

Les expériences d'imagerie de PSD-95:GFP sur cellules vivantes lors de l'application de Nr x 1 β (vidéo-microscopie) montrent une redistribution rapide et majeure de PSD-95 à partir d'une population cytoplasmique ou sous-membranaire diffuse. L'utilisation du mutant Nlg1 Δ C qui ne contient plus le site de liaison aux domaines PDZ et qui ne peut pas lier PSD-95 (Scheiffele et al., 2000), abolit ce recrutement de PSD-95. De plus, un mutant de PSD-95 portant la mutation H/V sur les domaines PDZ1, 2 et 3 n'est pas recruté non plus aux contacts Nr x 1 β /Nlg1néoformés. Cette mutation change les domaines PDZ de classe I en domaines de classe II, ce qui modifie leur spécificité d'interaction pour les ligands (Schnell et al., 2002). Bien que Nlg1 interagisse préférentiellement avec le domaine PDZ3 de PSD-95 (Irie et al., 1997), nous avons dû muter les trois domaines PDZ de PSD-95. Cet effet peut s'expliquer par l'existence d'une redondance d'interaction entre les domaines PDZ d'une même protéine (Sainlos *et al.*, soumis). L'ensemble de ces expériences indique que PSD-95

est recrutée aux contacts $\text{Nrx1}\beta/\text{Nlg1}$ par l'interaction spécifique de Nlg1 avec les domaines PDZ de PSD-95.

B. Recrutement des rAMPA

En agrégeant Nlg1 avec de la $\text{Nrx1}\beta$ purifiée et réticulée par des anticorps secondaires, nous avons pu observer un recrutement important et rapide des rAMPA endogènes aux contacts $\text{Nrx1}\beta/\text{Nlg1}$.

1. Les rAMPA sont recrutés de manière indépendante de l'activité mais dépendante de leur composition en sous-unité

De manière intéressante, des études précédentes utilisant des modèles similaires, n'avaient pas pu détecter ni les rAMPA endogènes par immuno-marquage (Graf et al., 2004), ni des récepteurs recombinants étiquetés avec des protéines fluorescentes (Nam and Chen, 2005). Il avait alors été montré que les rAMPA ne pouvaient être recrutés aux post-synapses induites qu'après activation avec du glutamate ou expression d'une forme active de CamKII (Nam and Chen, 2005). Afin de tester l'effet de l'activité synaptique dans notre modèle de recrutement, nous avons bloqué la génération des potentiels d'action avec de la TTX (tétrodotoxine) et bloqué l'activité des rNMDA avec de l'APV, pendant les 24h d'incubation avec les billes de $\text{Nrx1}\beta$. Ce traitement n'affecte pas le recrutement de PSD-95 aux billes, ni la participation des rAMPA aux courants induits par iontophorèse de glutamate (Martin Heine). Ainsi, contrairement à ce qui avait été précédemment montré, l'effet synaptogène observé ne semble pas dépendre de l'activité des rNMDA et le recrutement des rAMPA semble indépendant de l'activité synaptique (Nam and Chen, 2005; Chubykin et al., 2007). Pour comprendre ces différences, nous nous sommes replacés dans les mêmes conditions que pour l'étude de Nam et Chen (Nam and Chen, 2005), qui ont utilisé la sous-unité recombinante GluA1. Pour cela, nous avons étudié le recrutement de rAMPA recombinants, en comparant les récepteurs contenant la sous-unité GluA1 et ceux contenant GluA2. Par immuno-marquage, nous avons confirmé que les récepteurs recombinants contenant la sous-unité GluA1 ne sont pas recrutés aux contacts $\text{Nrx1}\beta/\text{Nlg1}$, alors que la sous-unité GluA2 est fortement recrutée. Dans les deux cas, ce phénomène n'est pas sensible à un traitement TTX-APV, du fait qu'il n'y ait pas de pré-synapse active dans ces modèles d'hémi synapses. De plus, l'application de TTX-APV en bain permet aussi d'exclure toute participation de glutamate venant des synapses natives voisines. Afin de comprendre l'effet de l'activité sur chacune de ces sous-unités, nous avons comparé leur enrichissement

respectif aux synapses endogènes. En conditions basales, on observe un recrutement égal de l'une ou de l'autre des sous-unités aux synapses. Cependant, en présence de TTX/APV, le recrutement des rAMPA contenant la sous-unité GluA2 n'est pas affecté, alors que celui des récepteurs contenant GluA1 est réduit de manière importante, confirmant une insertion différentielle de ces deux sous-unités aux synapses (Passafaro et al., 2001; Shi et al., 2001). Dans nos modèles de formation d'hémi synapses, l'absence d'une pré-synapse active, explique l'absence de recrutement des rAMPA contenant GluA1. Dans les expériences de iontophorèse, nous nous intéressons aux rAMPA endogènes qui sont majoritairement des hétéromères GluA1/GluA2 et GluA2/GluA3 (Wentholt et al., 1996). En effet, les courbes I/V (intensité/voltage) des courants AMPA induits après iontophorèse de glutamate, ne présentent pas de rectification, ce qui est caractéristique de récepteurs contenant la sous-unité GluA2 (Heine et al., 2008b). Donc le recrutement de rAMPA que nous observons dans notre modèle est celui de récepteurs endogènes contenant la sous-unité GluA2 dont le recrutement aux contacts $Nrx1\beta/Nlg1$ est constitutif. De plus, en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre le domaine extracellulaire de la sous-unité GluA1, nous avons pu observer une accumulation des rAMPA endogènes par immuno-marquage aux contacts $Nrx1\beta/Nlg1$. Il existe très peu d'homomères GluA1 endogènes dans l'hippocampe (environ 8% des rAMPA totaux) (Wentholt et al., 1996). Ainsi un marquage endogène de la sous-unité GluA1 marque probablement très majoritairement les hétéromères GluA1/GluA2 qui sont recrutés aux synapses de manière constitutive.

Dans le cadre de cette étude sur le rôle de l'activité synaptique dans l'adressage des rAMPA aux synapses, nous nous sommes aussi intéressés au phénomène d'homéostasie appelé « synaptic scaling ». En effet, lorsque l'activité synaptique est bloquée par un traitement à la TTX de 24 heures, on observe une augmentation du nombre de récepteurs AMPA aux synapses caractérisée par une augmentation de l'amplitude des courants miniatures AMPA (Turrigiano, 2008). Plus particulièrement, il a été montré que l'utilisation d'APV en plus de la TTX induit le même effet mais dans un délai beaucoup plus court, de 1 à 4 heures, démontrant l'importance des courants miniatures NMDA dans le contrôle de l'homéostasie des rAMPA (Sutton et al., 2006). Ainsi lorsque nous avons traité nos cultures avec un cocktail TTX-APV pendant 4 heures pour observer l'effet sur le recrutement des rAMPA aux contacts $Nrx1\beta/Nlg1$, nous avons pu observer ce phénomène. Il a été montré que l'augmentation du nombre de rAMPA aux synapses implique une synthèse protéique locale, qui pourrait faire intervenir une régulation post-transcriptionnelle via des microARN (Sutton et al., 2006). Nous avons alors débuté une collaboration avec Alexandre Favereaux (Unité INSERM 862, Bordeaux), pour identifier des microARN impliqués dans les neurones dans la régulation de l'expression des rAMPA dans le cadre du « synaptic scaling ». A l'heure actuelle nous avons identifié par RT PCR quantitative (A. Favereaux) quelques

microARN pouvant cibler GluA1 ou GluA2 dont l'expression est modifiée après application d'un traitement TTX-APV de 4 heures (Sutton et al., 2006) et nous essayons actuellement de tester la fonction de ces microARN sur l'expression des rAMPA.

2. Le recrutement des rAMPA aux contacts Nr1 β /Nlg1, implique un mécanisme de diffusion latérale dans la membrane plasmique

Nous avons montré que la surexpression de Nlg1 induit une immobilisation des rAMPA diffusant à la surface des neurones. Au contraire, une délétion de Nlg1 induit une augmentation de la mobilité des rAMPA, indiquant une corrélation inverse entre le niveau d'expression de Nlg1 et la régulation de la diffusion de surface des rAMPA. D'autre part, la formation de contacts Nr1 β /Nlg1 induit elle aussi une immobilisation des rAMPA, qui présentent alors un comportement de confinement aux sites de contacts Nr1 β /Nlg1 semblable à celui observé au niveau des synapses endogènes. Enfin, en bloquant la diffusion des rAMPA de surface par des anticorps, nous avons pu montrer un défaut de recrutement aux contacts Nr1 β /Nlg1 néoformés. L'ensemble de ces données indique que la diffusion membranaire des rAMPA est un mécanisme important dans leur recrutement aux synapses naissantes. Il a été montré que les rNMDA sont recrutés aux contacts Nr1/Nlg1 et plus généralement aux synapses naissantes, par un mécanisme de trafic intracellulaire en paquets pré-assemblés (Washbourne et al., 2002; Barrow et al., 2009). Bien que nous n'ayons pas étudié spécifiquement ces mécanismes, il est possible que les rAMPA soient adressés aux sites de contacts par transport intracellulaire (Perestenko and Henley, 2003) puis exportés au niveau extra-synaptique (Passafaro et al., 2001; Yudowski et al., 2007). En effet, dans les neurones jeunes, les rAMPA sont distribués de manière diffuse dans les neurites, indiquant un adressage extra-synaptique (Craig et al., 1993; Mammen et al., 1997; Cottrell et al., 2000). De ce fait, l'implication de la diffusion latérale des rAMPA dans leur recrutement aux contacts Nr1 β /Nlg1 pourrait expliquer la fonction de ces rAMPA extra-synaptiques.

3. Les rAMPA sont recrutés via des « plateformes » de PSD-95

Avec les expériences de billes, nous avons observé une corrélation entre le niveau d'enrichissement de PSD-95 et celui des rAMPA aux contacts Nr1 β /Nlg1. De la même manière, quand nous avons étudié la diffusion des rAMPA, avec les mutants de Nlg1, nous avons mis en évidence une corrélation inverse entre le nombre d'agrégats de PSD-95 et la mobilité des rAMPA. En effet, les mutants qui induisent une augmentation du nombre de spots de PSD-95 (Nlg1 WT et Nlg1Swap), induisent une immobilisation conjointe des rAMPA

de surface, alors que le mutants Nlg1 Δ C qui ne forme pas de nouveaux points de PSD-95 n'a aucun effet sur la diffusion des rAMPA. D'autre part, l'immobilisation des rAMPA induite par la surexpression Nlg1, est abolie en absence de PSD-95. De plus, dans les expériences d'agrégation de Nlg1 avec de la Nr1 β , l'utilisation du mutant Nlg1 Δ C abolit non seulement le recrutement de PSD-95, mais aussi celui des rAMPA aux contacts néoformés. Enfin, le mutant Nlg1Swap, qui délocalise PSD-95 des synapses vers les compartiments extra-synaptiques, délocalise aussi les rAMPA des synapses. L'ensemble de ces données suggère fortement que les rAMPA sont recrutés et stabilisés aux contacts Nr1 β /Nlg1 par une interaction avec PSD-95. Les rAMPA lient PSD-95 via leur sous-unité auxiliaire, la stargazine (Schnell et al., 2002) et c'est par cet intermédiaire que PSD-95 stabilise les rAMPA aux synapses (Schnell et al., 2002; Bats et al., 2007). Bien que nous n'ayons pas mis en évidence le rôle des TARPs dans le piégeage des rAMPA aux contacts Nr1 β /Nlg1 dans ces études, il semble fort probable qu'elles soient les intermédiaires du recrutement via PSD-95.

III. Assemblage par compétition

L'ajout d'agrégats de Nr1 β sur les cellules en culture induit non seulement une redistribution massive de PSD-95, mais s'accompagne aussi d'une déplétion partielle des agrégats de PSD-95 préexistants. Cette observation suggère l'existence d'un mécanisme de compétition par lequel le contenu des post-synapses existantes peut être redistribué lors de la formation de nouveaux contacts. Cette redistribution est possible car de manière générale et particulièrement dans les tissus immatures, PSD-95 est dynamique et peut être déplacée des synapses (Okabe et al., 1999; Marrs et al., 2001; Gray et al., 2006). Des expériences de FRAP ont mesuré un taux d'échange de PSD-95 de 50 à 60% en 30 minutes (Sharma et al., 2006; Thoumine et al., 2008). Nous avons observé dans notre modèle une déplétion de 35% des agrégats préexistants de PSD-95, indiquant que dans la proportion de molécules de PSD-95 qui est échangée en permanence, la moitié est utilisée lors de la formation de nouveaux contacts Nr1 β /Nlg1. Nous n'avons pas pu dans nos conditions expérimentales observer de partage local entre un agrégat de PSD-95 préexistant et un spot en formation. En utilisant une construction de PSD-95 fusionnée avec une GFP photoactivable, O.Thoumine a tenté d'observer une redistribution locale de PSD-95 après formation des contacts Nr1 β /Nlg1. Cependant, étant donné qu'au site d'activation, le signal obtenu est assez faible, il est difficile d'observer une redistribution qui va se manifester par une réduction et une dispersion du signal. Cependant, il a été montré en tranches organotypiques qu'au niveau de structures synaptiques immatures il peut y avoir

dédoublage d'une PSD puis migration sur une faible distance, afin de créer un nouveau site post-synaptique (Marrs et al., 2001). Dans les neurones immatures (7DIV), 50% des agrégats de PSD-95 visibles ne sont pas apposés à une structure pré-synaptique (Gerrow et al., 2006). Parmi ces agrégats extra-synaptiques 10% sont mobiles et peuvent être recrutés aux synapses naissantes (Gerrow et al., 2006). Nous avons donc comparé les taux de déplétion des spots de PSD-95 synaptiques et extra-synaptiques préexistants dans l'hypothèse où les agrégats extra-synaptiques seraient plus sensibles à la déplétion induite par la formation de nouveaux contacts Nr α 1 β /Nlg1. Au contraire, les deux types de spots de PSD-95 présentaient les mêmes taux de dissociation, indiquant une redistribution égale des molécules de PSD-95, qu'elles soient impliquées dans une synapse ou pas. Il faut quand même noter que le modèle que nous utilisons est basé sur des cultures jeunes, immatures et donc que les dynamiques des protéines post-synaptiques et plus particulièrement de PSD-95, sont plus importantes que dans des neurones matures.

La formation de nouveaux contacts Nr α 1 β /Nlg1 s'accompagne aussi d'une déplétion des rAMPA synaptiques marquée par une diminution de l'amplitude des mEPSCs AMPA après addition de Nr α 1 β sur les neurones en culture (Eric Hosy). Nous avons montré que le recrutement et la stabilisation des rAMPA aux contacts Nr α 1 β /Nlg1 nécessitent PSD-95 et de manière générale, la stabilisation des rAMPA aux synapses dépend de PSD-95 (Schnell et al., 2002; Elias et al., 2006; Bats et al., 2007). Ces résultats indiquent que la redistribution de PSD-95 en dehors des synapses induit une délocalisation conjointe des rAMPA. A l'heure actuelle, tout comme pour PSD-95, nous ne savons pas si les rAMPA délocalisés des synapses sont recrutés aux nouveaux contacts par diffusion latérale sur de faibles distances, ou s'ils entrent dans les voies de recyclage.

IV. Rôle primordial des complexes Nr α /Nlg dans la synaptogenèse

Au cours de ces études, nous avons pu mettre en évidence un recrutement rapide de PSD-95 et des rAMPA aux contacts Nr α 1 β /Nlg1. Bien que nous ayons majoritairement utilisé la surexpression de PSD-95 recombinante (étiquetée GFP ou mCherry), nous avons pu montrer que le niveau d'enrichissement de PSD-95 endogène aux contacts Nr α 1 β /Nlg1 dans nos conditions expérimentales est le même. Ainsi dans ce modèle, les rAMPA et PSD-95 sont recrutés dans des cinétiques comparable à celles observées lors du développement de synapses endogènes (Friedman et al., 2000; Bresler et al., 2001). De plus, le contenu en PSD-95 et en rAMPA aux contacts Nr α 1 β /Nlg1 néoformés représente 50% de celui des

synapses endogènes. Ces observations suggèrent que les complexes Nr α 1 β /Nlg1 jouent un rôle important dans la mise en place des post-synapses glutamatergiques et renforcent l'hypothèse que ce complexe intervienne dans les phases précoces de la synaptogenèse. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié la transmission synaptique AMPA chez des animaux sauvages ou invalidés pour le gène de Nlg1 (Varoqueaux et al., 2006), en nous plaçant dans une fenêtre développementale de synaptogenèse dans l'hippocampe (P8-P9) (Groc et al., 2002). Nous avons alors observé une diminution de la fréquence des courants miniatures AMPA compatible avec un défaut dans la formation des contacts synaptiques, mais aussi une diminution de l'amplitude de ces courants pouvant s'expliquer par un défaut dans le recrutement des rAMPA, aux synapses ne contenant pas de Nlg1. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'une étude récente, où la délétion de Nlg1 chez des têtards de xénope induit une diminution de la fréquence et de l'amplitude des mEPSCs AMPA (Chen et al., 2010). Cependant, des études précédentes, sur les souris Nlg1 KO n'ont pas mis en évidence ce défaut de la transmission AMPA (Chubykin et al., 2007; Blundell et al., 2010). Dans ces études, les enregistrements ont été effectués sur des animaux plus âgés, entre 3 et 8 semaines. Chez ces animaux, il se peut que des phénomènes de compensation avec les autres Nlg ou d'autres protéines d'adhérence telles que LRRTM2 se soient mis en place. Par exemple, une délétion de LRRTM2 dans les cellules pyramidales de CA1 induit une diminution de 50% de la transmission AMPA (de Wit et al., 2009), suggérant une redondance dans la fonction de Nlg1 et de LRRTM2.

Afin de comprendre si l'effet de la délétion de Nlg1 KO sur la transmission AMPA est dû à un défaut dans la formation des synapses, ou dans l'adressage des rAMPA aux synapses, nous avons entamé une collaboration avec Virginie Labrousse (UMR CNRS 5091, Bordeaux). Le but est d'effectuer des expériences d'immuno-histochimie, dans la région CA1 de l'hippocampe d'animaux sauvages et Nlg1 KO, pour marquer PSD-95 et les pré-synapses, ainsi que les rAMPA et les pré-synapses. De cette manière, nous pourrions mesurer la densité de synapses, mais aussi évaluer le degré d'apposition entre les structures pré-synaptiques et PSD-95 et entre les structures pré-synaptiques et les rAMPA.

V. Extension du modèle de diffusion piégeage des rAMPA, de la synaptogenèse à la plasticité

A travers ces études, nous avons mis en évidence que le modèle de diffusion/piégeage des rAMPA aux synapses via l'échafaudage de PSD-95, s'applique aussi au cours de la mise en place des post-synapses excitatrices par les complexes Nr α /Nlg. De

manière intéressante, nous avons aussi montré que la liaison de la $Nrx1\beta$ induit une stabilisation de la $Nlg1$ diffusant dans la membrane (Grégory Giannone). Cette stabilisation associée à l'activation de la fonction de $Nlg1$ induit le recrutement de PSD-95 qui à son tour va piéger les rAMPA de surface. Il a été proposé que dans le modèle de diffusion/piégeage des récepteurs membranaires, les protéines d'adhérence soient des obstacles passifs, alors que les protéines d'échafaudage restreindraient la diffusion des récepteurs par des interactions spécifiques, contribuant ainsi à créer des sous-domaines membranaires ayant des propriétés de diffusion distinctes (Choquet and Triller, 2003). Ici, nous proposons que lors de la formation des contacts cellule/cellule, les Nrx pré-synaptiques contactent les Nlg diffusant dans la membrane post-synaptique, créant ainsi un site d'accumulation et de concentration des protéines d'échafaudage servant de piège pour les récepteurs aux neurotransmetteurs.

Les données expérimentales que nous avons obtenu soit en étudiant la diffusion des rAMPA au cours du développement *in vitro* (Katalin Czondör), soit en utilisant la surexpression de $Nlg1$ pour augmenter le nombre d'obstacles (agrégats PSD-95), sont compatibles avec ce modèle de diffusion/piégeage. Elles ont servi de base pour identifier les paramètres de mobilité des rAMPA et pour établir un modèle quantitatif de la diffusion latérale des rAMPA utilisant des simulations en 2 dimensions générées par ordinateur (O.Thoumine). En effectuant un grand nombre de simulations, nous pouvons réaliser des cartes de densité et mesurer ainsi l'enrichissement des rAMPA aux synapses et le comparer aux données expérimentales d'électrophysiologie (Cottrell et al., 2000; Heine et al., 2008a). Nous avons observé que la position des sites d'exocytose (site d'insertion, t_0 de la trajectoire), influence l'enrichissement des rAMPA aux synapses. En effet, une insertion entre deux synapses induit un enrichissement 2 fois inférieur à celui obtenu avec un site d'insertion proche de la PSD. Bien qu'il ait été montré que l'insertion des rAMPA a principalement lieu au niveau extra-synaptique (Passafaro et al., 2001; Yudowski et al., 2007), il semble que lors de protocoles de type LTP, l'insertion des rAMPA ait lieu directement dans les épines, en bordure de la PSD (Kennedy et al., 2010). Ainsi, l'augmentation de la densité de rAMPA synaptiques observée dans les phénomènes de LTP pourrait s'expliquer par une délocalisation des sites d'exocytose au plus proche de la PSD, puis par un mécanisme de diffusion piégeage des rAMPA (Czondör/Mondin, en préparation).

VI. Activation par le ligand

En utilisant le test de recrutement de PSD-95 aux contacts $Nrx1\beta/Nlg1$ comme test fonctionnel, nous avons mis en évidence que la liaison de la $Nrx1\beta$ non seulement permet

l'agrégation de Nlg1 mais induit aussi une activation nécessaire à la fonction de Nlg1. L'agrégation de Nlg1 par un anticorps non activant (anti-HA) induit un recrutement de PSD-95 aux contacts naissants, comme cela avait déjà été démontré dans des expériences de billes recouvertes d'un anti-GFP (Graf et al., 2004). Cependant la liaison de Nr1 β induit un recrutement plus important, plus rapide et plus stable de PSD-95. Cette différence ne peut s'expliquer par des différences d'agrégation entre anti-HA et Nr1 β . En effet, dans les deux cas, nous avons pu observer la formation d'agrégats de Nlg1 comparables en taille, en nombre et en stabilité. La différence observée quand au recrutement de PSD-95 s'explique donc par un phénomène « d'activation » permettant d'augmenter la probabilité d'association de Nlg1 avec PSD-95 et la stabilité de cette association. Ainsi, le fait que l'agrégation par l'anti-HA induise un léger recrutement de PSD-95 serait le reflet d'un niveau d'association basal entre Nlg1 et PSD-95.

« L'activation » de Nlg1 par son ligand Nr1 β , induit des mécanismes de signalisation permettant probablement une déphosphorylation de la tyrosine en position 782, favorisant ainsi la liaison avec PSD-95. La phosphorylation de cette tyrosine conservée sur Nlg2 (en position 770), est au contraire nécessaire à la liaison à la géphyrine (Poulopoulos et al., 2009). Nous avons observé que lorsque la tyrosine 782 de Nlg1 est constitutivement phosphorylée, elle est incapable de recruter PSD-95, mais qu'elle est toujours capable de recruter géphyrine. Au contraire le mutant Y782A recrute PSD-95 mais pas géphyrine. De manière intéressante un mutant de Nlg2 ne contenant plus la tyrosine en position 770, est délocalisé des synapses inhibitrices (marquées par VGAT et géphyrine) (Levinson et al., 2010). Ainsi l'état de phosphorylation de cette tyrosine permet de réguler l'interaction avec les protéines d'échafaudage. De plus, les effets inverses observés pour Nlg1/PSD-95 et Nlg2/géphyrine suggèrent l'existence d'un mécanisme de compétition pour la liaison des protéines d'échafaudage aux Nlg qui pourrait être impliqué dans la régulation de la balance excitation/inhibition. A ce stade, nous n'avons pas identifié les kinases ou les phosphatases responsables de ce mécanisme. En effet, dans un premier temps, nous avons voulu observer le niveau de tyrosine phosphorylation de Nlg1, soit des dans systèmes hétérologues, soit à partir d'extraits de cerveaux (Béatrice Tessier). Cependant, nous nous sommes confrontés à deux types de problèmes : 1/ Les kinases et les phosphatases impliquées sont spécifiques des neurones et n'existent probablement pas dans les systèmes hétérologues (Cellules COS-7), 2/ A partir des extraits de cerveaux, nous n'avons pu observer aucune tyrosine phosphorylation de Nlg1 en Western-Blot. Ceci peut être dû au fait qu'*in vivo*, Nlg1 est majoritairement associée à PSD-95 et est donc déphosphorylée en Y782. Par la suite, avec l'aide de M. Sainlos, nous avons effectué une étude de la séquence de la queue C-terminale de Nlg1 et identifié des séquences consensus pour des tyrosine-kinases. Nous sommes actuellement en train de produire des protéines de fusion entre la

GST (Glutathion-S-Transferase) et le domaine C-terminal de Nlg1, pour tester *in vitro* les kinases candidates (B.Tessier). La difficulté de ce projet repose sur le fait que la phosphorylation ou la déphosphorylation de Nlg1 semble être l'étape finale d'une cascade de signalisation impliquant de multiples réactions de phosphorylation et déphosphorylation. En effet, en utilisant des inhibiteurs à large spectre des tyrosine-kinases, ou des tyrosine-phosphatases (Génistéine et Vanadate respectivement), dans les expériences de recrutement de PSD-95 aux contacts Nr x 1 β /Nlg1, nous avons observé des effets inverses de ceux obtenus avec les mutants de Nlg1. D'autre part, Nlg1 interagit avec PTPRT (protein tyrosine phosphatase receptor type), dont la surexpression induit une augmentation du nombre de synapses excitatrices (Lim et al., 2009). Une hypothèse serait que la liaison de la Nr x 1 β recrute Nlg1 et PTPRT qui déphosphorylerait la tyrosine en position 782, permettant la liaison à PSD-95 et ainsi la différenciation en post-synapse excitatrice. Dans des expériences préliminaires, nous avons utilisé un shRNA contre PTPRT et observé l'effet sur le recrutement de PSD-95 aux adhésions Nr x 1 β /Nlg1. Nous avons alors observé une augmentation du recrutement de PSD-95 contraire à l'hypothèse que PTPRT permettrait de déphosphoryler de manière directe Nlg1 et d'induire le recrutement de PSD-95. Ainsi, n'ayant pas identifié précisément les kinases et les phosphatases impliquées, nous avons choisi de travailler avec les mutants ponctuels, pour s'assurer de regarder spécifiquement le rôle de la tyrosine 782 dans la fonction de Nlg1. Dans un second temps, il serait intéressant de voir de quelle manière les différents isoformes de Nr x (-S4 vs +S4, α vs β) peuvent moduler le taux de phosphorylation de cette tyrosine à la fois sur Nlg1 et sur Nlg2, afin de mieux comprendre comment se fait l'acquisition du caractère inhibiteur ou excitateur. Enfin, nous avons ici mis en évidence au niveau post-synaptique, un mécanisme de transduction induit par la liaison du ligand extracellulaire, permettant le recrutement des partenaires intracellulaires. De manière intéressante, des mécanismes de signalisation semblables existent en pré-synapse. Il a en effet été montré que Cdk-5 phosphoryle CASK et que cette phosphorylation est nécessaire à l'adressage de CASK aux synapses (Samuels et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs montrent que la différenciation pré-synaptique observée dans des neurones en co-culture avec des cellules exprimant Nlg1, est abolie en utilisant des cultures de neurones invalidés pour Cdk-5 (Samuels et al., 2007). Ainsi, Cdk-5 participerait à la synaptogenèse en phosphorylant CASK qui modulerait la fonction des complexes Nr x /Nlg par son interaction directe avec les Nr x (Biederer and Stagi, 2008). Il serait donc intéressant d'explorer ces voies en pré-synapse en utilisant les mêmes modèles biomimétiques avec de la Nlg1 purifiée, pour avoir une vue d'ensemble du dialogue mené par les complexes Nr x /Nlg, entre les compartiments pré- et post-synaptiques.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abe K, Chisaka O, Van Roy F, Takeichi M (2004) Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nat Neurosci* 7:357-363.
- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3:445-451.
- Arac D, Boucard AA, Ozkan E, Strop P, Newell E, Sudhof TC, Brunker AT (2007) Structures of neuroligin-1 and the neuroligin-1/neurexin-1 beta complex reveal specific protein-protein and protein-Ca²⁺ interactions. *Neuron* 56:992-1003.
- Ashby MC, Maier SR, Nishimune A, Henley JM (2006) Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *J Neurosci* 26:7046-7055.
- Atasoy D, Schoch S, Ho A, Nadasy KA, Liu X, Zhang W, Mukherjee K, Nosyreva ED, Fernandez-Chacon R, Missler M, Kavalali ET, Sudhof TC (2007) Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2525-2530.
- Augustin I, Rosenmund C, Sudhof TC, Brose N (1999) Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400:457-461.
- Barrow SL, Constable JR, Clark E, El-Sabeawy F, McAllister AK, Washbourne P (2009) Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev* 4:17.
- Barton WA, Himanen JP, Antipenko A, Nikolov DB (2004) Structures of axon guidance molecules and their neuronal receptors. *Adv Protein Chem* 68:65-106.
- Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53:719-734.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.
- Benson DL, Tanaka H (1998) N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6892-6904.
- Berninghausen O, Rahman MA, Silva JP, Davletov B, Hopkins C, Ushkaryov YA (2007) Neurexin Ibeta and neuroligin are localized on opposite membranes in mature central synapses. *J Neurochem* 103:1855-1863.
- Biederer T (2006) Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules. *Genomics* 87:139-150.
- Biederer T, Scheiffele P (2007) Mixed-culture assays for analyzing neuronal synapse formation. *Nat Protoc* 2:670-676.
- Biederer T, Stagi M (2008) Signaling by synaptogenic molecules. *Curr Opin Neurobiol* 18:261-269.
- Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Sudhof TC (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297:1525-1531.
- Blanpied TA, Scott DB, Ehlers MD (2002) Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* 36:435-449.
- Blasi F, Bacchelli E, Pesaresi G, Carone S, Bailey AJ, Maestrini E (2006) Absence of coding mutations in the X-linked genes neuroligin 3 and neuroligin 4 in individuals with autism from the IMGSAC collection. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B:220-221.
- Blundell J, Tabuchi K, Bolliger MF, Blaiss CA, Brose N, Liu X, Sudhof TC, Powell CM (2009) Increased anxiety-like behavior in mice lacking the inhibitory synapse cell adhesion molecule neuroligin 2. *Genes Brain Behav* 8:114-126.
- Blundell J, Blaiss CA, Ehterton MR, Espinosa F, Tabuchi K, Walz C, Bolliger MF, Sudhof TC, Powell CM (2010) Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J Neurosci* 30:2115-2129.
- Boeckers TM (2006) The postsynaptic density. *Cell Tissue Res* 326:409-422.

- Bolliger MF, Frei K, Winterhalter KH, Gloor SM (2001) Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. *Biochem J* 356:581-588.
- Bolton MM, Blanpied TA, Ehlers MD (2000) Localization and stabilization of ionotropic glutamate receptors at synapses. *Cell Mol Life Sci* 57:1517-1525.
- Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* 417:649-653.
- Boucard AA, Chubykin AA, Comoletti D, Taylor P, Sudhof TC (2005) A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron* 48:229-236.
- Bozdagi O, Valcin M, Poskanzer K, Tanaka H, Benson DL (2004) Temporally distinct demands for classic cadherins in synapse formation and maturation. *Mol Cell Neurosci* 27:509-521.
- Breillat C, Thoumine O, Choquet D (2007) Characterization of SynCAM surface trafficking using a SynCAM derived ligand with high homophilic binding affinity. *Biochem Biophys Res Commun* 359:655-659.
- Bresler T, Ramati Y, Zamorano PL, Zhai R, Garner CC, Ziv NE (2001) The dynamics of SAP90/PSD-95 recruitment to new synaptic junctions. *Mol Cell Neurosci* 18:149-167.
- Brose N (2009) Synaptogenic proteins and synaptic organizers: "many hands make light work". *Neuron* 61:650-652.
- Budreck EC, Scheiffele P (2007) Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *Eur J Neurosci* 26:1738-1748.
- Burns ME, Augustine GJ (1995) Synaptic structure and function: dynamic organization yields architectural precision. *Cell* 83:187-194.
- Cai C, Coleman SK, Niemi K, Keinänen K (2002) Selective binding of synapse-associated protein 97 to GluR-A alpha-amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit is determined by a novel sequence motif. *J Biol Chem* 277:31484-31490.
- Chavis P, Westbrook G (2001) Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411:317-321.
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408:936-943.
- Chen SX, Tari PK, She K, Haas K (2010) Neurexin-neuroligin cell adhesion complexes contribute to synaptotropic dendritogenesis via growth stabilization mechanisms in vivo. *Neuron* 67:967-983.
- Chen X, Liu H, Shim AH, Focia PJ, He X (2008) Structural basis for synaptic adhesion mediated by neuroligin-neurexin interactions. *Nat Struct Mol Biol* 15:50-56.
- Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307:1324-1328.
- Chih B, Gollan L, Scheiffele P (2006) Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron* 51:171-178.
- Chih B, Afridi SK, Clark L, Scheiffele P (2004) Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Hum Mol Genet* 13:1471-1477.
- Chocholska S, Rossier E, Barbi G, Kehrer-Sawatzki H (2006) Molecular cytogenetic analysis of a familial interstitial deletion Xp22.2-22.3 with a highly variable phenotype in female carriers. *Am J Med Genet A* 140:604-610.
- Choquet D, Triller A (2003) The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* 4:251-265.
- Chubykin AA, Atasoy D, Etherington MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR, Sudhof TC (2007) Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* 54:919-931.
- Comoletti D, De Jaco A, Jennings LL, Flynn RE, Gaietta G, Tsigelny I, Ellisman MH, Taylor P (2004) The Arg451Cys-neuroligin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing. *J Neurosci* 24:4889-4893.

- Comoletti D, Flynn RE, Boucard AA, Demeler B, Schirf V, Shi J, Jennings LL, Newlin HR, Sudhof TC, Taylor P (2006) Gene selection, alternative splicing, and post-translational processing regulate neuroligin selectivity for beta-neurexins. *Biochemistry* 45:12816-12827.
- Cottrell JR, Dube GR, Egles C, Liu G (2000) Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 84:1573-1587.
- Craig AM, Blackstone CD, Hugarir RL, Banker G (1993) The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* 10:1055-1068.
- Craig AM, Blackstone CD, Hugarir RL, Banker G (1994) Selective clustering of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding neurotransmitters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12373-12377.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103:945-956.
- De Jaco A, Comoletti D, Kovarik Z, Galetta G, Radic Z, Lockridge O, Ellisman MH, Taylor P (2006) A mutation linked with autism reveals a common mechanism of endoplasmic reticulum retention for the alpha,beta-hydrolase fold protein family. *J Biol Chem* 281:9667-9676.
- de Wit J, Sylwestrak E, O'Sullivan ML, Otto S, Tiglio K, Savas JN, Yates JR, 3rd, Comoletti D, Taylor P, Ghosh A (2009) LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. *Neuron* 64:799-806.
- Dean C, Scholl FG, Choih J, DeMaria S, Berger J, Isacoff E, Scheiffele P (2003) Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 6:708-716.
- Dev KK, Nishimune A, Henley JM, Nakanishi S (1999) The protein kinase C alpha binding protein PICK1 interacts with short but not long form alternative splice variants of AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology* 38:635-644.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dong H, O'Brien RJ, Fung ET, Lanahan AA, Worley PF, Hugarir RL (1997) GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature* 386:279-284.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Dresbach T, Qualmann B, Kessels MM, Garner CC, Gundelfinger ED (2001) The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol Life Sci* 58:94-116.
- Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R (1999) Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13438-13443.
- Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28:511-525.
- Ehrlich I, Malinow R (2004) Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci* 24:916-927.
- El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290:1364-1368.
- Elias GM, Nicoll RA (2007) Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends Cell Biol* 17:343-352.
- Elias GM, Funke L, Stein V, Grant SG, Brecht DS, Nicoll RA (2006) Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins. *Neuron* 52:307-320.
- Ethell IM, Pasquale EB (2005) Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* 75:161-205.

- Fannon AM, Colman DR (1996) A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron* 17:423-434.
- Feng J, Schroer R, Yan J, Song W, Yang C, Bockholt A, Cook EH, Jr., Skinner C, Schwartz CE, Sommer SS (2006) High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci Lett* 409:10-13.
- Fogel AI, Akins MR, Krupp AJ, Stagi M, Stein V, Biederer T (2007) SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion. *J Neurosci* 27:12516-12530.
- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* 27:57-69.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED (2009) Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 12:897-904.
- Fu Z, Washbourne P, Ortinski P, Vicini S (2003) Functional excitatory synapses in HEK293 cells expressing neuroligin and glutamate receptors. *J Neurophysiol* 90:3950-3957.
- Futai K, Kim MJ, Hashikawa T, Scheiffele P, Sheng M, Hayashi Y (2007) Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neuroligin. *Nat Neurosci* 10:186-195.
- Gallo V, Upson LM, Hayes WP, Vyklicky L, Jr., Winters CA, Buonanno A (1992) Molecular cloning and development analysis of a new glutamate receptor subunit isoform in cerebellum. *J Neurosci* 12:1010-1023.
- Garner CC, Kindler S, Gundelfinger ED (2000a) Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr Opin Neurobiol* 10:321-327.
- Garner CC, Nash J, Huganir RL (2000b) PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol* 10:274-280.
- Garner CC, Waites CL, Ziv NE (2006) Synapse development: still looking for the forest, still lost in the trees. *Cell Tissue Res* 326:249-262.
- Garner CC, Zhai RG, Gundelfinger ED, Ziv NE (2002) Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 25:243-251.
- Gauthier J, Bonnel A, St-Onge J, Karemera L, Laurent S, Motttron L, Fombonne E, Joobert R, Rouleau GA (2005) NLGN3/NLGN4 gene mutations are not responsible for autism in the Quebec population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132B:74-75.
- Gerrow K, Romorini S, Nabi SM, Colicos MA, Sala C, El-Husseini A (2006) A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron* 49:547-562.
- Giannone G, Sheetz MP (2006) Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol* 16:213-223.
- Gomperts SN, Rao A, Craig AM, Malenka RC, Nicoll RA (1998) Postsynaptically silent synapses in single neuron cultures. *Neuron* 21:1443-1451.
- Graf ER, Kang Y, Hauner AM, Craig AM (2006) Structure function and splice site analysis of the synaptogenic activity of the neurexin-1 beta LNS domain. *J Neurosci* 26:4256-4265.
- Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119:1013-1026.
- Gray NW, Weimer RM, Bureau I, Svoboda K (2006) Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex in vivo. *PLoS Biol* 4:e370.
- Greger IH, Khatir L, Ziff EB (2002) RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 34:759-772.
- Groc L, Gustafsson B, Hanse E (2002) Spontaneous unitary synaptic activity in CA1 pyramidal neurons during early postnatal development: constant contribution of AMPA and NMDA receptors. *J Neurosci* 22:5552-5562.
- Groc L, Gustafsson B, Hanse E (2006) AMPA signalling in nascent glutamatergic synapses: there and not there! *Trends Neurosci* 29:132-139.

- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7:695-696.
- Hall RA, Soderling TR (1997) Quantitation of AMPA receptor surface expression in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 78:361-371.
- Hanley JG (2008) PICK1: a multi-talented modulator of AMPA receptor trafficking. *Pharmacol Ther* 118:152-160.
- Hata Y, Butz S, Sudhof TC (1996) CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuroligins. *J Neurosci* 16:2488-2494.
- Heine M, Thoumine O, Mondin M, Tessier B, Giannone G, Choquet D (2008a) Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neuroligin/neurexin contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20947-20952.
- Heine M, Groc L, Frischknecht R, Beique JC, Lounis B, Rumbaugh G, Huganir RL, Cognet L, Choquet D (2008b) Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320:201-205.
- Higuchi M, Single FN, Kohler M, Sommer B, Sprengel R, Seeburg PH (1993) RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* 75:1361-1370.
- Hirao K, Hata Y, Ide N, Takeuchi M, Irie M, Yao I, Deguchi M, Toyoda A, Sudhof TC, Takai Y (1998) A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal cell adhesion proteins. *J Biol Chem* 273:21105-21110.
- Horton AC, Ehlers MD (2003) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40:277-295.
- Hoy JL, Constable JR, Vicini S, Fu Z, Washbourne P (2009) SynCAM1 recruits NMDA receptors via protein 4.1B. *Mol Cell Neurosci* 42:466-483.
- Ichtenko K, Nguyen T, Sudhof TC (1996) Structures, alternative splicing, and neuroligin binding of multiple neuroligins. *J Biol Chem* 271:2676-2682.
- Ichtenko K, Hata Y, Nguyen T, Ullrich B, Missler M, Moomaw C, Sudhof TC (1995) Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81:435-443.
- Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, Sudhof TC (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277:1511-1515.
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34:27-29.
- Jamain S, Radyushkin K, Hammerschmidt K, Granon S, Boretius S, Varoqueaux F, Ramanantsoa N, Gallego J, Ronnenberg A, Winter D, Frahm J, Fischer J, Bourgeron T, Ehrenreich H, Brose N (2008) Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1710-1715.
- Jedlicka P, Hoon M, Papadopoulos T, Vlachos A, Winkels R, Pouloupoulos A, Betz H, Deller T, Brose N, Varoqueaux F, Schwarzacher SW (2010) Increased Dentate Gyrus Excitability in Neuroligin-2-Deficient Mice in Vivo. *Cereb Cortex*.
- Jontes JD, Emond MR, Smith SJ (2004) In vivo trafficking and targeting of N-cadherin to nascent presynaptic terminals. *J Neurosci* 24:9027-9034.
- Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Garner CC, Tsien RY, Ellisman MH, Malenka RC (2004) Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci* 7:244-253.
- Kayser MS, Nolt MJ, Dalva MB (2008) EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron* 59:56-69.
- Kayser MS, McClelland AC, Hughes EG, Dalva MB (2006) Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. *J Neurosci* 26:12152-12164.

- Kennedy MJ, Davison IG, Robinson CG, Ehlers MD (2010) Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines. *Cell* 141:524-535.
- Kim CH, Lisman JE (2001) A labile component of AMPA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on microtubule motors, actin, and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J Neurosci* 21:4188-4194.
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771-781.
- Kim HG et al. (2008a) Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82:199-207.
- Kim J, Jung SY, Lee YK, Park S, Choi JS, Lee CJ, Kim HS, Choi YB, Scheiffele P, Bailey CH, Kandel ER, Kim JH (2008b) Neuroligin-1 is required for normal expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9087-9092.
- Kneussel M, Loeblich S (2007) Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol Cell* 99:297-309.
- Ko J, Fuccillo MV, Malenka RC, Sudhof TC (2009a) LRRTM2 functions as a neurexin ligand in promoting excitatory synapse formation. *Neuron* 64:791-798.
- Ko J, Zhang C, Arac D, Boucard AA, Brunker AT, Sudhof TC (2009b) Neuroligin-1 performs neurexin-dependent and neurexin-independent functions in synapse validation. *EMBO J* 28:3244-3255.
- Kobe B, Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11:725-732.
- Kobielak A, Fuchs E (2004) Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:614-625.
- Koehnke J, Jin X, Trbovic N, Katsamba PS, Brasch J, Ahlsen G, Scheiffele P, Honig B, Palmer AG, 3rd, Shapiro L (2008) Crystal structures of beta-neurexin 1 and beta-neurexin 2 ectodomains and dynamics of splice insertion sequence 4. *Structure* 16:410-421.
- Kohler M, Kornau HC, Seeburg PH (1994) The organization of the gene for the functionally dominant alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor subunit GluR-B. *J Biol Chem* 269:17367-17370.
- Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelemy C, Moraine C, Briault S (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* 74:552-557.
- Lauren J, Airaksinen MS, Saarma M, Timmusk T (2003) A novel gene family encoding leucine-rich repeat transmembrane proteins differentially expressed in the nervous system. *Genomics* 81:411-421.
- Lawson-Yuen A, Saldivar JS, Sommer S, Picker J (2008) Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet* 16:614-618.
- Lee H, Dean C, Isacoff E (2010) Alternative splicing of neuroligin regulates the rate of presynaptic differentiation. *J Neurosci* 30:11435-11446.
- Lee RC, Clandinin TR, Lee CH, Chen PL, Meinertzhagen IA, Zipursky SL (2003) The protocadherin Flamingo is required for axon target selection in the Drosophila visual system. *Nat Neurosci* 6:557-563.
- Leonard AS, Davare MA, Horne MC, Garner CC, Hell JW (1998) SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. *J Biol Chem* 273:19518-19524.
- Leone P, Comoletti D, Ferracci G, Conrod S, Garcia SU, Taylor P, Bourne Y, Marchot P (2010) Structural insights into the exquisite selectivity of neurexin/neuroligin synaptic interactions. *EMBO J* 29:2461-2471.
- Levinson JN, El-Husseini A (2005) Building excitatory and inhibitory synapses: balancing neuroligin partnerships. *Neuron* 48:171-174.

- Levinson JN, Li R, Kang R, Moukhles H, El-Husseini A, Bamji SX (2010) Postsynaptic scaffolding molecules modulate the localization of neuroligins. *Neuroscience* 165:782-793.
- Levinson JN, Chery N, Huang K, Wong TP, Gerrow K, Kang R, Prange O, Wang YT, El-Husseini A (2005) Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroligin-induced synaptic specificity. *J Biol Chem* 280:17312-17319.
- Lim SH, Kwon SK, Lee MK, Moon J, Jeong DG, Park E, Kim SJ, Park BC, Lee SC, Ryu SE, Yu DY, Chung BH, Kim E, Myung PK, Lee JR (2009) Synapse formation regulated by protein tyrosine phosphatase receptor T through interaction with cell adhesion molecules and Fyn. *EMBO J* 28:3564-3578.
- Lin DT, Makino Y, Sharma K, Hayashi T, Neve R, Takamiya K, Huganir RL (2009) Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nat Neurosci* 12:879-887.
- Linhoff MW, Lauren J, Cassidy RM, Dobie FA, Takahashi H, Nygaard HB, Airaksinen MS, Strittmatter SM, Craig AM (2009) An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron* 61:734-749.
- Lise MF, Wong TP, Trinh A, Hines RM, Liu L, Kang R, Hines DJ, Lu J, Goldenring JR, Wang YT, El-Husseini A (2006) Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking. *J Biol Chem* 281:3669-3678.
- Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T, Hoyer T, Geiger JR, Kuner T, Monyer H, Higuchi M, Bach A, Seeburg PH (1994) Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science* 266:1709-1713.
- Luscher C, Xia H, Beattie EC, Carroll RC, von Zastrow M, Malenka RC, Nicoll RA (1999) Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* 24:649-658.
- Macarov M, Zeigler M, Newman JP, Strich D, Sury V, Tennenbaum A, Meiner V (2007) Deletions of VCX-A and NLGN4: a variable phenotype including normal intellect. *J Intellect Disabil Res* 51:329-333.
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-126.
- Mammen AL, Huganir RL, O'Brien RJ (1997) Redistribution and stabilization of cell surface glutamate receptors during synapse formation. *J Neurosci* 17:7351-7358.
- Mansour M, Nagarajan N, Nehring RB, Clements JD, Rosenmund C (2001) Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement. *Neuron* 32:841-853.
- Marrs GS, Green SH, Dailey ME (2001) Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nat Neurosci* 4:1006-1013.
- Marshall CR et al. (2008) Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82:477-488.
- Maximov A, Bezprozvanny I (2002) Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons. *J Neurosci* 22:6939-6952.
- Maximov A, Sudhof TC, Bezprozvanny I (1999) Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins. *J Biol Chem* 274:24453-24456.
- Mendez P, De Roo M, Poglia L, Klausner P, Muller D (2010) N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization. *J Cell Biol* 189:589-600.
- Missler M, Sudhof TC (1998) Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet* 14:20-26.
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, Sudhof TC (2003) Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423:939-948.
- Moeller ML, Shi Y, Reichardt LF, Ethell IM (2006) EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation. *J Biol Chem* 281:1587-1598.

- Montgomery JM, Zamorano PL, Garner CC (2004) MAGUKs in synapse assembly and function: an emerging view. *Cell Mol Life Sci* 61:911-929.
- Mukherjee K, Sharma M, Urlaub H, Bourenkov GP, Jahn R, Sudhof TC, Wahl MC (2008) CASK Functions as a Mg²⁺-independent neurexin kinase. *Cell* 133:328-339.
- Nakagawa T, Futai K, Lashuel HA, Lo I, Okamoto K, Walz T, Hayashi Y, Sheng M (2004) Quaternary structure, protein dynamics, and synaptic function of SAP97 controlled by L27 domain interactions. *Neuron* 44:453-467.
- Nam CI, Chen L (2005) Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6137-6142.
- Nicoll RA (2003) Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:721-726.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-2163.
- Nishimura W, Yao I, Iida J, Tanaka N, Hata Y (2002) Interaction of synaptic scaffolding molecule and Beta-catenin. *J Neurosci* 22:757-765.
- Nuriya M, Haganir RL (2006) Regulation of AMPA receptor trafficking by N-cadherin. *J Neurochem* 97:652-661.
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21:545-559.
- Okabe S, Miwa A, Okado H (2001) Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci* 21:6105-6114.
- Okabe S, Kim HD, Miwa A, Kuriu T, Okado H (1999) Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nat Neurosci* 2:804-811.
- Okuda T, Yu LM, Cingolani LA, Kemler R, Goda Y (2007) beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13479-13484.
- Opazo P, Choquet D (2010) A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors. *Mol Cell Neurosci*.
- Osten P, Khatir L, Perez JL, Kohr G, Giese G, Daly C, Schulz TW, Wensky A, Lee LM, Ziff EB (2000) Mutagenesis reveals a role for ABP/GRIP binding to GluR2 in synaptic surface accumulation of the AMPA receptor. *Neuron* 27:313-325.
- Palay SL, Palade GE (1955) The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol* 1:69-88.
- Palmer CL, Cotton L, Henley JM (2005) The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev* 57:253-277.
- Paradis S, Harrar DB, Lin Y, Koon AC, Hauser JL, Griffith EC, Zhu L, Brass LF, Chen C, Greenberg ME (2007) An RNAi-based approach identifies molecules required for glutamatergic and GABAergic synapse development. *Neuron* 53:217-232.
- Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD (2006) Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52:817-830.
- Passafaro M, Piech V, Sheng M (2001) Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4:917-926.
- Perestenko PV, Henley JM (2003) Characterization of the intracellular transport of GluR1 and GluR2 alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 278:43525-43532.
- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ (2003) Internalization at glutamatergic synapses during development. *Eur J Neurosci* 18:3207-3217.
- Petralia RS, Sans N, Wang YX, Wenthold RJ (2005) Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 29:436-452.
- Petralia RS, Esteban JA, Wang YX, Partridge JG, Zhao HM, Wenthold RJ, Malinow R (1999) Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nat Neurosci* 2:31-36.

- Phillips GR, Huang JK, Wang Y, Tanaka H, Shapiro L, Zhang W, Shan WS, Arndt K, Frank M, Gordon RE, Gawinowicz MA, Zhao Y, Colman DR (2001) The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. *Neuron* 32:63-77.
- Pickard L, Noel J, Henley JM, Collingridge GL, Molnar E (2000) Developmental changes in synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor subunit composition in living hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:7922-7931.
- Pierce JP, Mayer T, McCarthy JB (2001) Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Curr Biol* 11:351-355.
- Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, Papadopoulos T, Zhang M, Paarmann I, Fuchs C, Harvey K, Jedlicka P, Schwarzacher SW, Betz H, Harvey RJ, Brose N, Zhang W, Varoqueaux F (2009) Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63:628-642.
- Prange O, Wong TP, Gerrow K, Wang YT, El-Husseini A (2004) A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13915-13920.
- Rao A, Kim E, Sheng M, Craig AM (1998) Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 18:1217-1229.
- Regalado MP, Terry-Lorenzo RT, Waites CL, Garner CC, Malenka RC (2006) Transsynaptic signaling by postsynaptic synapse-associated protein 97. *J Neurosci* 26:2343-2357.
- Rogers SW, Hughes TE, Hollmann M, Gasic GP, Deneris ES, Heinemann S (1991) The characterization and localization of the glutamate receptor subunit GluR1 in the rat brain. *J Neurosci* 11:2713-2724.
- Rumbaugh G, Sia GM, Garner CC, Huganir RL (2003) Synapse-associated protein-97 isoform-specific regulation of surface AMPA receptors and synaptic function in cultured neurons. *J Neurosci* 23:4567-4576.
- Saglietti L, Dequidt C, Kamieniarz K, Rousset MC, Valnegri P, Thoumine O, Beretta F, Fagni L, Choquet D, Sala C, Sheng M, Passafaro M (2007) Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron* 54:461-477.
- Samuels BA, Hsueh YP, Shu T, Liang H, Tseng HC, Hong CJ, Su SC, Volker J, Neve RL, Yue DT, Tsai LH (2007) Cdk5 promotes synaptogenesis by regulating the subcellular distribution of the MAGUK family member CASK. *Neuron* 56:823-837.
- Sanes JR, Yamagata M (2009) Many paths to synaptic specificity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:161-195.
- Sans N, Racca C, Petralia RS, Wang YX, McCallum J, Wenthold RJ (2001) Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J Neurosci* 21:7506-7516.
- Sara Y, Biederer T, Atasoy D, Chubykin A, Mozhayeva MG, Sudhof TC, Kavalali ET (2005) Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *J Neurosci* 25:260-270.
- Sato K, Momose-Sato Y (2008) Optical imaging analysis of neural circuit formation in the embryonic brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:706-713.
- Scannevin RH, Huganir RL (2000) Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 1:133-141.
- Scheiffele P, Fan J, Choeh J, Fetter R, Serafini T (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657-669.
- Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 17:5858-5867.
- Schluter OM, Xu W, Malenka RC (2006) Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. *Neuron* 51:99-111.
- Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Bredt DS, Nicoll RA (2002) Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13902-13907.

- Setou M, Seog DH, Tanaka Y, Kanai Y, Takei Y, Kawagishi M, Hirokawa N (2002) Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* 417:83-87.
- Shan W, Yagita Y, Wang Z, Koch A, Fex Svenningsen A, Gruzglin E, Pedraza L, Colman DR (2004) The minimal essential unit for cadherin-mediated intercellular adhesion comprises extracellular domains 1 and 2. *J Biol Chem* 279:55914-55923.
- Shapira M, Zhai RG, Dresbach T, Bresler T, Torres VI, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2003) Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. *Neuron* 38:237-252.
- Sharma K, Fong DK, Craig AM (2006) Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Mol Cell Neurosci* 31:702-712.
- Sheng M, Pak DT (1999) Glutamate receptor anchoring proteins and the molecular organization of excitatory synapses. *Ann N Y Acad Sci* 868:483-493.
- Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R (2001) Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105:331-343.
- Siddiqui TJ, Pancaroglu R, Kang Y, Rooyackers A, Craig AM (2010) LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. *J Neurosci* 30:7495-7506.
- Silverman JB, Restituto S, Lu W, Lee-Edwards L, Khatri L, Ziff EB (2007) Synaptic anchorage of AMPA receptors by cadherins through neural plakophilin-related arm protein AMPA receptor-binding protein complexes. *J Neurosci* 27:8505-8516.
- Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11-19.
- Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249:1580-1585.
- Song JY, Ichtchenko K, Sudhof TC, Brose N (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1100-1105.
- Stan A, Pielarski KN, Brigadski T, Wittenmayer N, Fedorchenko O, Gohla A, Lessmann V, Dresbach T, Gottmann K (2010) Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11116-11121.
- Stein V, House DR, Brecht DS, Nicoll RA (2003) Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression. *J Neurosci* 23:5503-5506.
- Sugita S, Khvochev M, Sudhof TC (1999) Neurexins are functional alpha-latrotoxin receptors. *Neuron* 22:489-496.
- Sumita K, Sato Y, Iida J, Kawata A, Hamano M, Hirabayashi S, Ohno K, Peles E, Hata Y (2007) Synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) membrane-associated guanylate kinase with inverted organization (MAGI)-2 is associated with cell adhesion molecules at inhibitory synapses in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 100:154-166.
- Sutton MA, Ito HT, Cressy P, Kempf C, Woo JC, Schuman EM (2006) Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell* 125:785-799.
- Szatmari P et al. (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 39:319-328.
- Tabuchi K, Sudhof TC (2002) Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics* 79:849-859.
- Tabuchi K, Blundell J, Ebert MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Sudhof TC (2007) A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318:71-76.
- Tada T, Sheng M (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:95-101.

- Talebizadeh Z, Lam DY, Theodoro MF, Bittel DC, Lushington GH, Butler MG (2006) Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in autism. *J Med Genet* 43:e21.
- Taniguchi H, Gollan L, Scholl FG, Mahadomrongkul V, Dobler E, Limthong N, Peck M, Aoki C, Scheiffele P (2007) Silencing of neuroligin function by postsynaptic neurexins. *J Neurosci* 27:2815-2824.
- Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D (2003) Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J* 22:4656-4665.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.
- Thomas LA, Akins MR, Biederer T (2008) Expression and adhesion profiles of SynCAM molecules indicate distinct neuronal functions. *J Comp Neurol* 510:47-67.
- Thoumine O, Ewers H, Heine M, Groc L, Frischknecht R, Giannone G, Pujol C, Legros P, Lounis B, Cognet L, Choquet D (2008) Probing the dynamics of protein-protein interactions at neuronal contacts by optical imaging. *Chem Rev* 108:1565-1587.
- Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M (2002) Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 35:77-89.
- Tolias KF, Bikoff JB, Kane CG, Tolias CS, Hu L, Greenberg ME (2007) The Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 mediates EphB receptor-dependent dendritic spine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7265-7270.
- Tomita S (2010) Regulation of ionotropic glutamate receptors by their auxiliary subunits. *Physiology (Bethesda)* 25:41-49.
- Torres R, Firestein BL, Dong H, Staudinger J, Olson EN, Huganir RL, Bredt DS, Gale NW, Yancopoulos GD (1998) PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* 21:1453-1463.
- Tretter V, Jacob TC, Mukherjee J, Fritschy JM, Pangalos MN, Moss SJ (2008) The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J Neurosci* 28:1356-1365.
- Turrigiano GG (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135:422-435.
- Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol* 135:767-779.
- Ullrich B, Ushkaryov YA, Sudhof TC (1995) Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron* 14:497-507.
- Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M, Sudhof TC (1992) Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science* 257:50-56.
- van Zundert B, Yoshii A, Constantine-Paton M (2004) Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci* 27:428-437.
- Varoqueaux F, Jamain S, Brose N (2004) Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol* 83:449-456.
- Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Sudhof TC, Brose N (2006) Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51:741-754.
- Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Sudhof TC (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287:864-869.
- Vincent JB, Kolozsvari D, Roberts WS, Bolton PF, Gurling HM, Scherer SW (2004) Mutation screening of X-chromosomal neuroligin genes: no mutations in 196 autism probands. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129B:82-84.

- Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Jr., Karcher R, Li XD, Davison IG, Ikebe M, Mercer JA, Kauer JA, Ehlers MD (2008) Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* 135:535-548.
- Washbourne P, Bennett JE, McAllister AK (2002) Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nat Neurosci* 5:751-759.
- Wentholt RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS (1996) Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16:1982-1989.
- Wittenmayer N, Korber C, Liu H, Kremer T, Varoqueaux F, Chapman ER, Brose N, Kuner T, Dresbach T (2009) Postsynaptic Neuroligin1 regulates presynaptic maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13564-13569.
- Wu H, Nash JE, Zamorano P, Garner CC (2002) Interaction of SAP97 with minus-end-directed actin motor myosin VI. Implications for AMPA receptor trafficking. *J Biol Chem* 277:30928-30934.
- Yagi T, Takeichi M (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14:1169-1180.
- Yamaguchi Y, Pasquale EB (2004) Eph receptors in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 14:288-296.
- Yan J, Noltner K, Feng J, Li W, Schroer R, Skinner C, Zeng W, Schwartz CE, Sommer SS (2008) Neurexin 1alpha structural variants associated with autism. *Neurosci Lett* 438:368-370.
- Yan J, Oliveira G, Coutinho A, Yang C, Feng J, Katz C, Sram J, Bockholt A, Jones IR, Craddock N, Cook EH, Jr., Vicente A, Sommer SS (2005) Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients. *Mol Psychiatry* 10:329-332.
- Yudowski GA, Puthenveedu MA, Leonoudakis D, Panicker S, Thorn KS, Beattie EC, von Zastrow M (2007) Real-time imaging of discrete exocytic events mediating surface delivery of AMPA receptors. *J Neurosci* 27:11112-11121.
- Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2001) Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron* 29:131-143.
- Zhang W, Benson DL (2001) Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J Neurosci* 21:5169-5181.
- Zhang W, Rohlmann A, Sargsyan V, Aramuni G, Hammer RE, Sudhof TC, Missler M (2005) Extracellular domains of alpha-neurexins participate in regulating synaptic transmission by selectively affecting N- and P/Q-type Ca²⁺ channels. *J Neurosci* 25:4330-4342.
- Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y, Malinow R (2000) Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3:1098-1106.
- Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.
- Ziv NE, Garner CC (2004) Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci* 5:385-399.