

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DE L'INTER-RELATION ENTRE L'ACTIVITÉ DE LA
PROTÉINE KINASE C ET L'UBIQUITINATION DE LA SOUS UNITÉ GLUA2
DES RÉCEPTEURS DU GLUTAMATE DU TYPE AMPA

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
LAYAL EL CHEIKH-HUSSEIN

AVRIL 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

DÉDICACE

J'aimerais dédier ce travail à ma famille,
mes amis et mes collègues de travail qui m'ont supporté
le long de ces deux dernières années.

REMERCIEMENTS

Je tiens principalement à remercier mon directeur de recherche Pr. Marc Lussier de m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche et pour son énorme support académique et psychologique tout au long de mon expérience.

J'aimerais remercier mes parents, mes sœurs et mon frère pour leur support, soutien et encouragements inconditionnels depuis le début de mon cursus universitaire. C'est aussi grâce à vous que j'en suis ici aujourd'hui.

J'aimerais aussi remercier mes collègues de travail, Kim, Hou et Valérie, avec qui j'ai passé de bons moments au laboratoire. Je les remercie aussi de m'avoir aidé et renseigné sur plusieurs techniques et installations dans le laboratoire. Je tiens à remercier aussi mes amies Rym, Mirna, Martine et Hassana et mes colocataires Elizabeth et Mathilde pour leur présence à toute épreuve.

Un grand merci à mes amis Lolwa et Mahmoud pour m'avoir accueilli chez eux pendant la période de rédaction de ce mémoire. Je les remercie énormément pour tous leurs support, motivation et encouragements inestimables.

J'aimerais remercier les centres de recherche Pharmaqam et CERMO pour leur soutien financier.

J'aimerais remercier Pr. Nicolas Pilon et Pr. Saïd Kourrich d'avoir pris le temps de lire et de corriger ce travail.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	viii
RÉSUMÉ	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Le système nerveux	1
1.1.1 L'hippocampe	1
1.1.2 Le cortex cerebral	2
1.1.3 Les neurones	3
1.1.4 Les synapses.....	4
1.1.5 Le glutamate.....	5
1.2 Les récepteurs du glutamate	6
1.3 La plasticité synaptique	9
1.4 Le routage cellulaire des récepteurs AMPA.....	11
1.5 Les protéines d'interaction	12
1.5.1 La protéine interacting with C kinase-1	12
1.5.2 La adaptatrice AP-2	13
1.6 Les modifications post-traductionnelles.....	14
1.6.1 La phosphorylation	14
1.6.2 L'ubiquitination	17
1.7 Les déubiquitinases	23
1.8 La dégradation lysosomale	23
1.9 La problématique.....	24
1.10 Les hypothèses et les objectifs de l'étude.....	24
CHAPITRE II MATHÉRIELS ET MÉTHODES	27
2.1 Construction de l'ADN plasmidique	27
2.2 Anticorps primaires et secondaires.....	27

2.3	Transformation bactérienne et préparation d'ADN plasmidique	29
2.4	Expression et purification de protéine GST-GluA2	29
2.5	Transformation bactérienne et préparation d'ADN plasmidique	30
2.6	Essaie de liaison in vitro par GST pulldown	31
2.7	Culture neuronale et transfection.....	32
2.8	Traitement cellulaire.....	33
2.9	Lyse cellulaire	33
2.10	Immunoprécipitation	34
2.11	Immunobuvardage et analyses quantitatives	35
2.12	Immunofluorescence	35
2.12.1	Cellules HEK293T/17.....	35
2.12.2	Neurones	37
2.12.3	Acquisition des images et analyses quantitatives	37
	CHAPITRE III RÉSULTATS	39
3.1	La PMA augmente l'ubiquitination induite par la bicuculline de GluA2 dans les neurones de cortex en culture primaire	39
3.2	La bicuculline augmente l'internalisation des GluA2 dans les neurones de cortex en culture primaire.....	42
3.3	L'activation de la PKC par la PMA augmente l'ubiquitination et la phosphorylation de la sous unité GluA2 dans les cellules HEK293T.	42
3.4	La protéine PICK1 WT interfère avec la possibilité de modifications par ubiquitination à GluA2 dans les cellules HEK293.	46
3.5	L'inhibition de PICK1 n'affecte pas l'ubiquitination de GluA2 au niveau des neurones.....	51
3.6	L'ubiquitination de GluA2 induite par la PKC active est médiée par RNF167.	51
3.7	L'inhibition du lysosome par la chloroquine augmente l'ubiquitination de GluA2.....	55
	CHAPITRE IV DISCUSSION	59
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	68
	BIBLIOGRAPHIE.....	69

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure des sous unités GluA1-4 des récepteurs AMPA	9
1.2 Structure de la protéine d'ubiquitine	18
1.3 Cascade enzymatique de la voie d'ubiquitination.....	20
3.1 L'ubiquitination de GluA2 est augmentée par l'activation de la PKC par la PMA mais aussi par la bicuculline	41
3.2 La bicuculline augmente l'internalisation des GluA2 dans les neurones de cortex en culture primaire.....	43
3.3 L'activation de la PKC par la PMA augmente l'ubiquitination et la phosphorylation de la sous unité GluA2 dans les cellules HEK293T	45
3.4 La PMA augmente l'ubiquitination et la phosphorylation de GluA2 au niveau de Lys-850 dans les cellules HEK293T.....	47
3.5 La protéine PICK1 WT diminue l'ubiquitination et la phosphorylation de GluA2 WT dans les cellules HEK293T	49
3.6 La liaison de PICK1 nécessite que le domaine PDZ de GluA2 soit intact pour réduire l'ubiquitination de GluA2 dans les cellules HEK293.....	50
3.7 L'inhibition de PICK1 diminue l'ubiquitination et l'internalisation de GluA2 au niveau des neurones.	52
3.8 L'ubiquitination de GluA2 WT induite par la PMA est médiée par RNF167. 54	
3.9 L'inhibition du lysosome par la chloroquine augmente l'accumulation de GluA2 ubiquitinée	56
3.10 La chloroquine n'altère pas l'internalisation des GluA2 dans les neurones de cortex en culture primaire.....	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Tableau des anticorps primaires utilisés pour les essais d'IF et d'IB.....	28
2.2 Tableau des anticorps secondaires fluorescents utilisés pour les essais d'IF	28

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Amp	Ampicilline
AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMPAR	Récepteurs acide α amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AP-2	<i>Adaptor Protein-2</i>
ATP	Adénosine-tri-phosphate
Bic	Bicuculline
CamKII	Protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline dépendante
CHE	Chelerythrine
CMV	Corps multivésiculaire
CQ	Chloroquine
DAG	Diacylglycérol
DCT	Domaine C-terminal
DLL	Domaine de liaison au ligand
DLT	Dépression à long terme
DMEM	Milieu Dulbecco's Modified Eagle
DNT	Domaine N-terminal
DPS	Densité post-synaptique
DTM	Domaine transmembranaire
E. coli	Escherichia coli
eDUB	Enzyme déubiquitinase
GFP	Protéine fluorescence verte
Glu	Glutamate
GluA1-4	Sous unité du récepteur du glutamate 1-4
GluR1-4	Sous unité du récepteur du glutamate 1-4

GRIP1-2	<i>Glutamate receptor-interacting proteins 1 and 2</i>
GST	Glutathione S-transférase
HECT	<i>Homologous to E6-AP C-terminus</i>
IB	Immunobuvardage
IF	Immunofluorescence
LB	Lysogeny broth
MA	Maladie d'Alzheimer
mGluRs	Récepteurs métabotropiques du glutamate
MPT	Modification post-traductionnelle
NB	Neurobasal
NEDD4	<i>Neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene</i>
NMDAR	Récepteurs acide N-méthyl-D-aspartique
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
NT	Neurotransmetteurs
PA	Potentiel d'action
PDZ	PSD-95/DlgA/ZO-1
PICK1	Protein interacting with C kinase
PKC	Protéine kinase C
PLT	Potentialisation à long terme
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RE	Réticulum endoplasmique
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNF167	<i>Ring Finger Protein 167</i>
rpm	Rotation par minute
SN	Système nerveux
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
Ub	Ubiquitine
UBE1	Enzyme d'activation de l'ubiquitine E1

UBE2	Enzyme conjugatrice de l'ubiquitine E2
UBE3	Enzyme ligase de l'ubiquitine E3
UFD	<i>Ubiquitin fold domain</i>
WT	<i>Wild Type</i> , forme sauvage

RÉSUMÉ

Les récepteurs du glutamate de type Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) sont des récepteurs ionotropiques qui médient la majorité de la neurotransmission excitatrice rapide dans le système nerveux central. Plusieurs études récentes ont montré l'importance des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation et l'ubiquitination, dans la régulation synaptique de ces récepteurs. L'ubiquitination est un processus enzymatique entraînant l'ajout covalent d'une petite molécule l'ubiquitine sur un substrat telle que les AMPARs. Cette modification peut être médiée par des ubiquitine ligases comme Ring Finger Protein 167 (RNF167) et *Neural precursor cell- expressed developmentally downregulated gene 4-1*. De plus, les sous unités GluA1- 4 des AMPARs peuvent être phosphorylées par différentes kinases comme la protéine kinase C (PKC). L'objectif de ce projet est de décortiquer l'inter-relation entre la phosphorylation de la sérine 880 et l'ubiquitination de la sous unité GluA2 afin de mieux comprendre leurs rôles dans la régulation des AMPARs. Pour se faire, des tests biochimiques en utilisant le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) comme activateur de la PKC, la bicuculline comme activateur synaptique et d'autres drogues ont été utilisées sur la lignée cellulaire HEK293T et des neurones en culture primaire. L'effet de ces agents pharmacologiques sur l'ubiquitination et la phosphorylation de GluA2 a été analysé par immunobuvardage. De plus, des tests d'immunofluorescence ont étudié la localisation subcellulaire et l'expression membranaire des AMPARs. L'activation de la PKC par la PMA augmente la phosphorylation S880 et l'ubiquitination des lysines 850 et 882 de GluA2. La PMA semble activer RNF167 augmentant ainsi l'ubiquitination de GluA2 dans les deux types cellulaires. Une grande partie de ces récepteurs ubiquitinés seront envoyés pour dégradation lysosomale. Ensemble nos résultats montrent que la voie de signalisation dépendante de la PKC est impliquée dans la régulation de l'ubiquitination de la sous unité GluA2 des AMPARs en modifiant l'activité de RNF167.

Mots-clés : AMPARs, Ubiquitination, Phosphorylation, PKC, RNF167.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le système nerveux

Le système nerveux (SN) est l'ensemble d'organes responsable de l'envoi, de la réception et de l'interprétation de l'information provenant de toutes les parties du corps. Il permet ainsi la coordination, la régulation et la surveillance des différentes fonctions internes des organes et réagit aux changements dans l'environnement externe. Le SN comprend le cerveau, la moelle épinière et un réseau complexe de nerfs. Il se divise en deux parties : le système nerveux périphérique (SNP) et le système nerveux central (SNC) (Baulieu, 1997). Le SNC est considéré comme le centre de traitement des informations chez les mammifères. Il consiste à recevoir et analyser l'information envoyée par les systèmes sensoriels afin de créer des messages moteurs. Ces signaux seront par la suite envoyés vers le SNP. Le SNC est formé par la moelle épinière et l'encéphale qui comporte le cerveau (incluant l'hippocampe), le cervelet ainsi que le tronc cérébral. Une structure crânienne solide permet une protection mécanique (Bories, 1996).

1.1.1 L'hippocampe

L'hippocampe est la partie du cerveau appartenant au système limbique chez les

mammifères. Ce système se constitue d'un ensemble de structures et organites important pour la formation de l'émotion et de la mémoire (Roxo et al., 2011). Sous sa structure bilatérale en forme de C proéminente bombée, l'hippocampe prend place dans le lobe temporal (Bertram, 1997). Transversalement, l'hippocampe est séparé en deux structures: le gyrus denté et la corne d'Ammon (CA). Cette dernière se divise en trois principaux sous-champs appelées (CA1-CA2-CA3) (Chronister and White, 1975) entourées par le cortex cérébral. Un circuit tri-synaptique permet la communication neuronale de ces trois parties entre elles. L'apprentissage et la formation de la mémoire sont les rôles les plus importants et les plus étudiés de l'hippocampe (Redini-Del Negro, 1992). L'hippocampe est également impliqué dans la régulation de l'émotion, du stress (Redini-Del Negro, 1992), de la navigation et de la cognition (Sutherland and Rudy, 1989). Des lésions ou des changements neurodégénératifs dans l'hippocampe peuvent mener à des troubles graves au niveau du cerveau. Cela peut aussi être traduit en un affaiblissement de la mémoire vu dans la maladie d'Alzheimer (MA) (Smith, 1998).

1.1.2 Le cortex cérébral

Le cortex est un terme utilisé pour définir les couches externes d'une structure ou d'un organe biologique. Le cortex cérébral est alors la couche couvrante des hémisphères cérébraux. Il présente une structure importante et complexe qui occupe plus que la moitié du volume du cerveau humain (Molnár et al., 2019). Ce tissu cérébral est le résultat d'un système de développement hautement spécifique qui implique la prolifération extensive des cellules souches. Sous l'action de stimuli spécifiques, les cellules souches peuvent se différencier en neurones et en cellules de soutien gliales formant ainsi un tissu neuronal (Okabe et al., 1996). Environ 10 milliards de neurones corticaux (Sur and Rubenstein, 2005) subissent alors une migration radiale vers leur emplacement final près de la surface du cerveau (Ross and Walsh, 2001). Le cortex cérébral humain présente des caractéristiques cellulaires,

anatomiques, génétiques et moléculaires uniques qui diffèrent de celles retrouvées chez les autres mammifères (Rakic, 2009). Des perturbations durant le développement cortical peuvent entraîner des anomalies graves comme les déficits d'apprentissage, les déficiences cognitives qui peut même atteindre l'épilepsie intractable (Barkovich et al., 2012).

1.1.3 Les neurones

Les neurones sont les unités de base du tissu nerveux et du SN. Ils sont composés d'un corps cellulaire qui s'allongent d'une extrémité en plusieurs petites ramifications appelées dendrites et d'une autre structure cylindrique appelé axone. Le corps cellulaire des neurones contient le noyau et alors l'ensemble de l'information génétique. Plusieurs organites baignent dans le cytoplasme comme l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique (RE), les microsomes, les ribosomes, les lysosomes et beaucoup d'autres. Le cytoplasme est l'usine de production des protéines et des substances importantes pour la machinerie cellulaire et neuronale. Les dendrites transportent les messages neuronaux ou influx nerveux vers le corps cellulaire (Banchereau et al., 2000). L'axone est la prolongation du corps cellulaire des neurones. Les bouts des axones se terminent par de petites ramifications, connues sous le nom de terminaisons axonales, qui permettent la connections avec les neurones voisins (Cochilla and Alford, 1999). Le cytosquelette axonal se repose sur un grand réseau de filaments d'actines, de microfilaments et de microtubules (Menon and Gupton, 2016). L'axone contient aussi une grande population de mitochondries qui sont des sources énergétiques essentielles pour le transport axonal de biomolécules (Ahmed et al., 2000). Les voies respiratoires des mitochondries le long de l'axone génèrent de l'adénosine-tri-phosphate (ATP). Ces molécules d'ATP sont ainsi utilisées par les familles de protéines motrices de transport soit les kinésines et les dynéines. Ces dernières s'associent aux microtubules contribuant aux mécanismes de transports des vésicules et autres substances cellulaires par voies

antérogrades et rétrogrades, respectivement (Julien, 2000). Contrairement aux dendrites, les axones transmettent les signaux loin du soma. Les axones sont généralement entourés par des cellules productrices de myéline, les cellules de Schwann et les oligodendrocytes. La myéline rajoute une couche isolante sur les axones permettant ainsi une accélération de la conduction des impulsions neuronales (Johns and Bernard, 1999).

1.1.4 Les synapses

Les synapses sont des structures complexes qui permettent à deux cellules ou plus de se communiquer entre elles. Les synapses sont constituées d'une partie présynaptique qui appartient à la cellule effectrice avec sa terminaison axonale, une fente synaptique et une partie post synaptique propre à la cellule receveuse (Bromley et al., 2001). La communication entre les différentes composantes du système nerveux se fait par le biais de signaux nerveux. Les nerfs communiquent l'information entre le SNC et le reste des organes du corps. Pour se faire, il est nécessaire que la stimulation de la membrane plasmique des neurones dépasse le seuil de repos qui avoisine les -70 millivolts. Les impulsions nerveuses sont des signaux électrochimiques qui induisent un changement dans les concentrations ioniques au niveau de la membrane plasmique. Ces changements causent le déclenchement d'un potentiel d'action (PA) (Stuart et al., 1997). Plus particulièrement, au repos la membrane plasmique des cellules est sélectivement perméable pour certains ions. La concentration en ions sodiques (Na^+) est élevée dans le milieu extracellulaire. Le milieu intracellulaire contient une concentration en ions chloriques (Cl^-) plus importante que celle des ions potassiques (K^+), ce qui rend le potentiel transmembranaire chargé négativement (-70 mV). Une stimulation de la membrane plasmique qui dépasse le seuil de déclenchement, va entraîner l'ouverture des canaux ioniques provoquant l'entrée des ions cationiques à l'intérieur de la cellule augmentant ainsi son potentiel à 30 mV. Un rétablissement de la concentration ionique entre les milieux intra et extracellulaires

mènent à une phase de repolarisation de la membrane. La désensibilisation des canaux ioniques de K^+ est plus lente que celles des autres ions. Cela engendre une sortie plus prolongée des ions K^+ à l'extérieur de la cellule et rend le potentiel intracellulaire proche de -80 mV.

1.1.5 Le glutamate

Les neurotransmetteurs (NT) sont des messagers chimiques endogènes, impliqués dans la neurotransmission neuronale. Ils sont synthétisés à partir des acides aminés comme le glutamate et la glycine (Fagg and Foster, 1983). Les NT sont généralement stockés dans des vésicules au niveau des régions présynaptiques des neurones (Nelson, 1993). À la suite d'une stimulation du neurone par le PA, les NT emmagasinés dans les vésicules synaptiques sont libérés dans la fente synaptique par voie d'exocytose au niveau de la membrane axonale présynaptique (van der Sluijs and Hoogenraad, 2011). La membrane post-synaptique qui se retrouve de l'autre côté de la fente contient une région complexe appelée densité post-synaptique (DPS) (Kennedy, 1997) où se regroupent des récepteurs spécifiques aux NT libérés. La liaison des NT excitateurs sur leurs récepteurs, comme par exemple le glutamate (Glu) sur ses récepteurs ionotropiques, entraîne un changement de conformation responsable de l'ouverture des canaux ioniques. La diffusion des ions à travers ces canaux ioniques entraîne la dépolarisation de la membrane et alors l'excitation du neurone. Cependant, l'effet excitateur du glutamate est inversé suite à la liaison des NT inhibiteurs comme l'acide gamma-aminobutyrique sur leurs récepteurs qui va donc entraîner le blocage ou l'inhibition de la transmission de l'influx nerveux (McCormick, 1989). Le glutamate est une substance biochimique de grande importance puisqu'il est le NT excitateur le plus important du SNC (Meldrum, 2000). L'enzyme glutaminase catalyse la désamination oxydative de la glutamine formant ainsi le Glu. Les contenus endogènes en Glu sont synthétisés par les cellules gliales (Pow and Robinson, 1994). Le relargage du Glu au niveau synaptique est médié par

des voies dépendantes du Ca^{2+} . Comme NT, le Glu s'implique dans un grand nombre de processus synaptiques comme la migration neuronale et la transmission excitatrice du SNC (Woodman and McIlwain, 1961). Cette dernière fonction entraîne divers mécanismes cellulaires de plasticité synaptique, notamment la dépression à long terme (DLT) et la potentialisation à long terme (PLT) (Bashir et al., 1993).

1.2 Les récepteurs du glutamate

Les récepteurs sont des structures protéiques présentes principalement au niveau des membranes cytoplasmiques ou nucléaires. La plupart des récepteurs présentent un ou plusieurs domaines transmembranaires hydrophobes. Les extrémités hydrophiles se présentent de part et d'autre de la membrane. Le rôle principal des récepteurs est de lier un ligand spécifique afin de provoquer une réponse cellulaire. Jusqu'à ces jours, un très grand nombre de récepteurs a été identifié. Il est possible de les classer en trois familles selon le mécanisme de traduction de leur activation en réponse cellulaire. La première famille regroupe les récepteurs ionotropes qui sont exprimés au niveau des membranes sous forme de canaux. La liaison du ligand, généralement un NT, induit un flux d'ions comme le Ca^{2+} , le K^+ , le Na^+ et le Cl^- entre les parties intra- et extracellulaire (Gukovskaya and Zinchenko, 1990). La deuxième famille est celles des récepteurs couplés à une enzyme. Les membres de cette famille ont des activités kinases qui, par phosphorylation, modifient les fonctions physiologiques de certaines protéines des voies de signalisations cellulaires. Les récepteurs tyrosine kinases sont un bel exemple de cette catégorie de récepteurs (Gaits-Iacovoni, 1995). Finalement les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G comme par exemple la famille des récepteurs métabotropes de glutamate (mGluR-1) (Bernard et al., 2014). La liaison du ligand se traduit par activation enzymatique d'une protéine GTPase intracellulaire qui résulte en une transmission du message dans la cellule. Les récepteurs du glutamate sont les récepteurs les plus abondants au niveau du SNC. Ils médient ainsi la majorité de la transmission excitatrice au niveau du cerveau (Koh et

al., 1995). Ces récepteurs se regroupent dans deux grandes familles : les récepteurs du glutamate ionotrope exemple les récepteurs alpha -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate (AMPARs) et les mGluRs comme les mGluR1-5. Une co- expression de ces deux familles de récepteurs au sein d'une synapse permet une meilleure modulation de la transmission excitatrice et de la plasticité synaptique (Sengmany and Gregory, 2016). Les AMPARs représentent les principaux récepteurs ionotropes qui médient la neurotransmission excitatrice au niveau des synapses (Jonas and Burnashev, 1995). Les AMPARs sont synthétisés au sein du corps cellulaire des neurones (Kessels et al., 2009). Suite à leur synthèse, les quatre sous unités des récepteurs AMPA GluR1-4, aussi nommées GluA1-4, se regroupent pour former des hétérotétramères qui seront exprimées à la surface post-synaptique (Kessels et al., 2009). Chaque sous unité possède environ 900 acides aminés pour un poids moléculaires avoisinant 105 KDa (Henley and Wilkinson, 2016). Tel que présenté à la Figure 1.1 chaque sous unité des AMPARs possède quatre domaines : le domaine N-terminal (DNT), le domaine de liaison au ligand (DLL), le domaine transmembranaire (DTM) et le domaine C- terminal (DCT) (Bassani et al., 2013). Sous une forme bi-lobale, le DNT donne sur la région extracellulaire qui joue un rôle important dans l'ancrage synaptique des AMPARs (Watson et al., 2017). Le DLL permet l'interaction avec le ligand notamment le Glu et l'AMPA. Le DTM est composé de trois segments transmembranaires (TM1, TM3 et TM4) et un quatrième segment amphipathique intracellulaire (TM2). Le canal ionique des récepteurs se forme par le DTM. La structure des AMPARs se termine par le domaine cytosolique DCT (Robert and Howe, 2003). Ce dernier permet une espace d'interaction entre les sous unités des AMPARs et nombreuses protéines de signalisation comme par exemple les protéines kinases C (PKC) (Boehm et al., 2006). On retrouve jusqu'à 80% des AMPARs sous la forme hétérodimérique de sous unités GluA1 et GluA2 (Henley and Wilkinson, 2016). Il est aussi possible de retrouver des complexes formés de sous unités GluA2 et GluA3 (Bassani et al., 2013). Les AMPARs permettent le passage des ions K^+ et Na^+ entre les parties intra et extracellulaire

(Bowie, 2012). La grande majorité des AMPARs contiennent la sous unité GluA2 (Isaac et al., 2007). Cette dernière est codée par le gène *GLUR2* sous le contrôle de facteurs de transcriptions spécifiques de l'élément RE1 (Tanaka et al., 2000). L'expression relative de l'ARNm et de la protéine de la sous-unité GluA2 est spécifiquement régulée au cours du développement. Dans la phase précoce du développement prénatal, le taux d'expression de la GluA2 est faible. Ce taux augmente rapidement durant les premières semaines suivant la naissance (Tanaka et al., 2000). La perméabilité des AMPARs est dictée par la présence de la sous unité GluA2. Le filtre de sélectivité ionique de cette sous unité, surtout aux ions Ca^{2+} , est dû à la présence d'un résidu arginine (R) à la position 607 (Bassani et al., 2013) chargé positivement à la place d'un résidu de glutamine (Q) au niveau du segment amphipathique TM2 (Greger et al., 2003).

La présence de cette charge positive dans le segment formant le canal ionique des AMPARs bloque l'entrée des ions Ca^{2+} et affecte à la baisse la conductivité des AMPARs contenant la sous unité GluA2 (Bowie and Mayer, 1995). Ainsi, GluA2 est cruciale dans la détermination des rôles des AMPARs. En effet, en plus de son rôle dans la régulation de la perméabilité calcique et la conductivité (Henley and Wilkinson, 2016), GluA2 dicte les propriétés biophysiques critiques des AMPARs. La présence de GluA2 influence entre autres la synaptogenèse, l'assemblage et le routage intracellulaire des AMPARs (Cull-Candy et al., 2006), ce qui joue un rôle majeur dans la plasticité synaptique surtout au niveau de la PLT et la DLT, deux processus du développement de l'apprentissage et la mémoire (Kessels et al., 2009; Lee et al., 2004; Nayak et al., 1998).

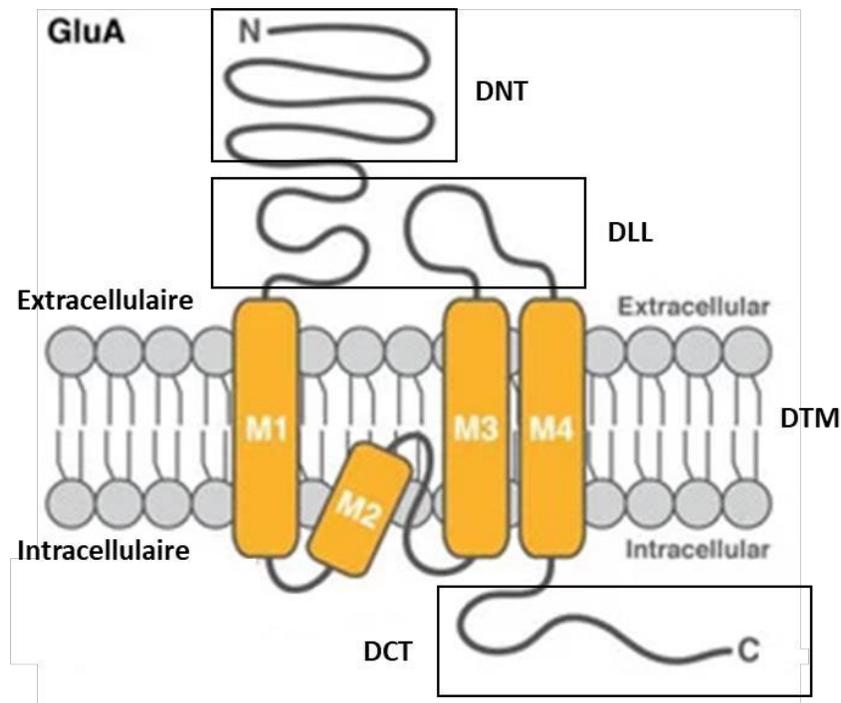


Figure 1.1: Structure des sous unités GluA1-4 des récepteurs AMPA. Les sous unités GluA1-4 des récepteurs AMPA sont formées de quatre domaines. Le domaine N terminal (DNT) et le domaine de liaison au ligand donnent sur la partie extracellulaire. Quatre séquences transmembranaires MT1-4 composent le domaine transmembranaire (DTM). Le domaine C-terminal (DCT) donne sur la partie cytosolique intracellulaire. Figure tirée et adaptée de (Park, 2018).

1.3 La plasticité synaptique

La plasticité synaptique se définit au sens large par l'ensemble des mécanismes permettant aux neurones de réguler la force synaptique du SNC (Abbott and Nelson, 2000). C'est un processus crucial pour le maintien de l'activité neuronale ainsi que le dynamisme synaptique (Turrigiano, 2008). En effet, la potentialisation et la dépression des fonctions synaptiques sont étroitement liées à la fréquence de l'activité de la synapse. Ainsi, les phénomènes de PLT et DLT sont à la base de l'apprentissage et la formation de la mémoire (Stevens and Sullivan, 1998). Le

contrôle du nombre, de la disposition, de la composition et des propriétés biophysiques des récepteurs du Glu, surtout ceux de types AMPARs est hautement important pour le maintien de la plasticité synaptique (Malinow, 2003). La PLT est caractérisée par un renforcement de l'activité synaptique du neurone médié principalement par les récepteurs du Glu (Widagdo et al., 2015). Dans la phase initiale de la PLT les AMPARs contenant la sous unité GluA1 sont recrutés au niveau de la synapse (Shi et al., 1999). Les derniers stades se caractérisent par une production de nouveaux AMPARs (Squire and Barondes, 1973) ainsi qu'une exocytose accélérée du contenu cellulaire, augmentant ainsi l'expression synaptique de ces récepteurs. Ceci s'illustre en une augmentation de la neurotransmission excitatrice au niveau du SN (Turrigiano, 2008). Or, une des caractéristiques de la DLT est une perte constante des AMPARs synaptiques (Huganir and Nicoll, 2013a) menant à la répression de la transmission excitatrice. Les sous unités des AMPARs subissent des modifications post-traductionnelles (MPT) comme la phosphorylation (Purkey and Dell'Acqua, 2020) et l'ubiquitination pendant la PLT et la DLT (Diering and Huganir, 2018; Lussier et al., 2015; Widagdo et al., 2015; Widagdo et al., 2017). La sous unité GluA2, entre autres, a été décrite comme un facteur important dans la DLT (Diering and Huganir, 2018). En effet, la phosphorylation de la sérine S880 de GluA2 est décrite comme médiateur dans la régulation de la DLT au niveau de l'hippocampe (Steinberg et al., 2006). D'autres processus comme le réarrangement des complexes protéiques dans la DPS, le routage des récepteurs, des canaux ioniques et la synthèse de nouvelles protéines sont aussi impliqués dans la bonne fonctionnalité des synapses (Clifton et al., 2019). Des dysfonctionnements ou des changements de la plasticité synaptique ont été associés à plusieurs maladies neuropsychiatriques telles que la MA et la schizophrénie (Henley and Wilkinson, 2013).

La bicuculline (bic), un antagoniste des récepteurs GABA_A (Behrends, 2000) permet le relargage du NT excitateur, le Glu, à partir des vésicules contenues dans les boutons

synaptiques. Le Glu lie des récepteurs spécifiques comme les AMPARs et les récepteurs de l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDARs) au niveau post-synaptique (Clark and Cull-Candy, 2002). L'affinité des NMDARs est beaucoup plus élevée pour le Glu que les AMPARs (Blanke and VanDongen, 2008). Ainsi, la liaison du Glu sur ces récepteurs permettent l'activation de récepteurs NMDA et alors une diffusion importante des ions Ca^{2+} dans la cellule. Ce qu'on appelle la formation d'un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE). Cette activité synaptique résulte en une des modifications de plusieurs protéines au niveau du DPS.

1.4 Le routage cellulaire des récepteurs AMPA

Différentes voies de signalisation régulent la synthèse, l'expression membranaire, le routage ainsi que le recyclage et la dégradation des AMPARs. Ces mécanismes sont hautement régulés afin de maintenir la formation de la mémoire (Henley and Wilkinson, 2013). À la suite de la synthèse au niveau du RE, la famille des protéines Transmembrane AMPAR regulatory proteins (TARP) facilite l'exocytose des récepteurs vers la membrane plasmique (Henley and Wilkinson, 2013; Ziff, 2007). L'ancrage et la stabilité des AMPARs dans la partie latérale de la membrane sont médiés par liaison à des protéines comme GRIP1 et NSF. Durant la PLT, les récepteurs AMPA sont recrutés d'abondance vers la zone active et la DPS. Par conséquent, l'augmentation de concentration synaptique en récepteurs actifs au niveau de la région DPS permet d'accroître la transmission synaptique (Henley and Wilkinson, 2013). La liaison du ligand comme par exemple le Glu ou l'AMPA stimule l'activation des récepteurs qui résulte par leurs internalisations dans la cellule par voies d'endocytose. La protéine PICK1 joue un rôle majeur dans la voie d'internalisation des AMPARs contenant la sous unité GluA2 (Anggono et al., 2013). La phosphorylation de la S880 par la PKC affaiblie l'affinité de GluA2 à la protéine d'ancrage GRIP1 ce qui favorise la liaison de PICK1 (Bredt and Nicoll, 2003; Chung et al., 2000). En réponse à cette sensibilisation, les AMPARs sont internalisés dans la

cellule par voie d'endocytose dépendante de la clathrine et de la protéine AP-2 (Prybylowski et al., 2005). Une fois internalisés dans les vésicules appelées endosomes précoces, les AMPARs peuvent subir différentes voies de régulation (Park et al., 2004). Les récepteurs ubiquitinés seront regroupés dans des vésicules appelées endosomes tardifs pour être dégradés au niveau des lysosomes ou des protéasomes (Huber and Teis, 2016). Or, les récepteurs non ubiquitinés sont recyclés à la membrane plasmique par les endosomes de recyclages pour être de nouveau actifs (van der Sluijs and Hoogenraad, 2011).

1.5 Les protéines d'interaction

Le DCT de la sous unité GluA2 présente une séquence de 4 résidus (-SVKI) permettant l'interaction avec des protéines à domaine PSD-95/DlgA/ZO-1 (PDZ) comme la protéine glutamate receptor-interacting proteins 1 and 2 (GRIP1-2) (Dong et al., 1997) et la Protein Interacting with C kinase-1 (PICK1) (Bassani et al., 2013). On retrouve aussi un domaine de 10 acides aminés (AKRMKVAKNP) qui chevauche les sites de liaison de deux protéines de signalisation, soit la protéine N-ethylmaleimide-Sensitive Factor (NSF) et le complexe de protéines adaptatrice de type 2 (AP-2) (Lee et al., 2002).

1.5.1 La Protein Interacting with C Kinase-1

PICK1 est une protéine codée par le gène PICK1. Elle est répartie dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et se trouve autour de la région périnucléaire (Li et al., 2016). PICK1 est une des rares protéines contenant les deux domaines PDZ et Bin-Amphiphysin-Rvs (Xu et al., 2014). Ces deux domaines permettent de lier un grand nombre de protéines et lipides membranaires. Au niveau du SNC, PICK1 s'implique dans multiples voies de signalisations et de régulations cellulaires. Au niveau des neurones, PICK1 est exprimée dans les deux parties pré et post-synaptiques

(Haglerød et al., 2009). Elle régule l'endocytose des AMPARs et est impliquée dans la rétention intracellulaire des récepteurs internalisés (Citri et al., 2010). De plus, PICK1 joue un rôle dans la régulation du recyclage membranaire des AMPARs (Lin et al., 2009). Cette régulation est dépendante du calcium (Citri et al., 2010b). PICK1 peut aussi réguler le routage intracellulaire de certaines protéines en interagissant avec plusieurs protéines telles que l'enzyme GTPase Rab-11, la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline- dépendante (CamKII) (Xu et al., 2014) et la protéine Arp 2/3 (Rocca et al., 2008). Plusieurs MPT peuvent s'impliquer dans la régulation de PICK1 comme par exemple la phosphorylation par la kinase GSK-3 β qui est un facteur régulateur de la plasticité synaptique, plus particulièrement durant la DLT (Yagishita et al., 2015).

1.5.2 La protéine adaptatrice AP-2

La protéine Adaptor-Protein-2 (AP-2) est une des cinq membres de la famille des protéines adaptatives. Elle existe sous deux isoformes: αA et αC (Park and Guo, 2014). La protéine AP-2 se localise à la membrane plasmique (Jackson et al., 2010). Au cours des étapes initiales de l'endocytose médiées par les protéines clathrines, l'AP-2 interagit avec diverses protéines afin de coordonner la polymérisation de la couche de clathrine menant à la déformation de la membrane afin de s'internaliser complètement sous forme d'une vésicule (Rodemer and Haucke, 2008). Le recrutement de l'AP-2 à la membrane implique aussi sa liaison avec le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (Gaidarov and Keen, 1999; Jackson et al., 2010) et/ou le facteur ADP-ribosylation (Arf) (Paleotti et al., 2005). La protéine AP-2 facilite ainsi l'internalisation rapide (Ohno, 2006) d'un grand nombre de protéines y compris les récepteurs synaptiques comme les AMPARs (Kastning et al., 2007) et les molécules d'adhésion (Kamiguchi et al., 1998).

1.6 Les modifications post traductionnelles

Les modifications post traductionnelles (MPT) sont l'ensemble de changement que les protéines peuvent subir (Kia-Ki and Martinage, 1992). Ces modifications peuvent se faire sur les protéines à tout moment de leur vie, pendant ou après la synthèse. Ainsi, les MPT augmentent considérablement la diversité et la complexité du protéome. La majorité des MPT sont réversibles, où des enzymes à fonctions opposées permettent d'ajouter et d'enlever les modifications apportées aux protéines cibles. Les MPT présentent un outil puissant qui peut modifier l'activité de la protéine cible, sa localisation subcellulaire et sa capacité de lier un partenaire d'interaction. Parmi les MPT les plus étudiées sont la phosphorylation, l'ubiquitination et l'acétylation.

1.6.1 La phosphorylation

La phosphorylation est une des MPT les plus connues. Elle est médiée par les protéines kinases qui représentent une classe clé des enzymes catalytiques (Martin et al., 2010). Presque 2 % des protéines codées par le génome chez les eucaryotes sont en effet des kinases (Martin et al., 2010). Les kinases possèdent un site de liaison à l'ATP important pour leurs mécanismes d'action. La réaction d'hydrolyse de la molécule d'ATP en adénosine-di-phosphate permet de libérer une molécule de phosphate qui sera ajoutée sur un groupement hydroxyle libre des acides aminés sérines, thréonines et tyrosines du substrat (KREPS, 1972). Jusqu'à maintenant, plus que 500 kinases différentes ont été découvertes chez les mammifères (Yang and Qian, 2017). De ces kinases, environ 400 sont des kinases à sérine/thréonine et 90 sont des kinases à tyrosines. Bien que la plupart des protéines sont modifiées par les enzymes kinases, la phosphorylation n'est pas restreinte qu'aux protéines (Lee et al., 2017) puisque les lipides et les nucléotides peuvent aussi être modifiés par ajout de groupement phosphate (Martin et al., 2010). La phosphorylation permet l'activation

ou la désactivation des biomolécules (Cohen, 2002; Martin et al., 2010). De plus, les kinases sont importantes pour la stabilité et la localisation subcellulaire des protéines (Endicott et al., 2012; Kikuchi et al., 2014; Rudge and Wakelam, 2013) ainsi que la régulation des interactions entre les protéines (Pawson and Nash, 2000).

1.6.1.1 La protéine kinase C

La PKC est une protéine kinase à sérine/thréonine (Newton, 2018) faisant partie de la sous famille des protéines kinases AGC. Chez les mammifères, les PKC peuvent être divisés en trois sous-familles : les PKC classiques (PKCc), les nouvelles PKC (PKCn) et les PKC atypiques (PKCa). Les différentes isoformes de la PKC se ressemblent dans des caractéristiques structurales communes (Pappa et al., 1998). La structure moléculaire des PKC se constitue en un domaine catalytique au niveau du DCT et d'un domaine activateur du côté DNT. Les PKC contiennent une seule copie de chacun des domaines catalytiques et régulateurs mais elles se distinguent par le domaine de régulation situé au niveau du DNT (Steinberg, 2008). Ce dernier possède un domaine C1 qui joue le rôle de motif de liaison au diacylglycérol (DAG) et autres activateurs de PKC. Dans le DCT se trouve deux sites importants pour l'activité catalytique de la PKC : le site de liaison à l'ATP et celle de la liaison au substrat. La PKC est synthétisée sous forme inactive. Ce statut inactif de base est principalement dû à la liaison d'une petite séquence de vingtaine d'acides aminés, appelée un pseudo-substrat, dans la cavité de liaison au substrat. Cette cavité fait partie du domaine catalytique de l'enzyme ce qui rend la PKC inactive. La présence de concentrations efficaces en Ca^{2+} ou en DAG dans le microenvironnement permet le relargage du pseudo-substrat et l'activation de la PKC (Huang, 1989). Étant donné que les kinases sont dispersées dans la cellule, il n'est pas surprenant que les PKC seront impliquées dans la majorité des voies de signalisation et de régulation cellulaires. Elles présentent alors des rôles régulateurs majeurs au niveau de la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Les PKC peuvent être

activées par certains agents pharmacologiques comme le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Au niveau du DNT des différents isoformes de la PKC se trouve un domaine C1 constitué d'une cinquantaine d'acide aminés riche en histidine et cystéines. Ce domaine fonctionne comme motif de liaison à son ligand physiologique, le DAG. La PMA, un phorbol ester promoteur de tumeur peut mimer l'action du DAG en se liant au site réactif des PKC permettant ainsi son activation. La durée de vie des phorbol ester comme la PMA est plus longue que celle des DAG ce qui rends ces esters des puissants activateurs de la PKC. La PMA permet aussi la translocation des PKC de la partie cytoplasmique vers les membranes cellulaires où ils peuvent jouer leurs rôles de kinases (Steinberg, 2008). Au niveau du SN, certaines PKC classiques catalysent la phosphorylation d'un grand nombre de protéines comme PICK1 (Ammendrup-Johnsen et al., 2012), les protéines TARP (Coombs and Cull-Candy, 2009), les NMDAR (O'Connor et al., 1995) et les AMPARs (Kennedy and Ehlers, 2011).

1.6.1.2 La phosphorylation des AMPARs

Les quatre sous-unités des récepteurs AMPA présentent des sites de phosphorylation par les kinases comme la CaMKII (Herring and Nicoll, 2016), la PKA (Patriarchi et al., 2018) et la PKC (Mao et al., 2015) dont les plus étudiées sont au niveau des GluA1 et A2. Des études ont montré que le flux des ions Ca^{2+} recrute la CaMKII au niveau de la région DPS comme étant une molécule importante dans la régulation synaptique (Barria and Malinow, 2005, Halt et al., 2012, Zhou et al., 2007). La phosphorylation de la sous unité GluA1 par la PKC au niveau des sérines 831 et 845 est importante dans la régulation de la plasticité synaptique, le développement, l'apprentissage et de la mémoire (Mao et al., 2015). De même, la phosphorylation de la S880 de GluA2 est grandement impliquée dans la régulation de l'expression membranaire et le routage synaptique des AMPARs (Widagdo et al., 2020).

1.6.2 L'ubiquitination

L'ubiquitination est une MPT qui décorent les protéines à la suite à leur synthèse. Elle est caractérisée par l'ajout d'une petite molécule d'ubiquitine (Ub) sur un substrat (Pickart, 2001a). L'attachement de cette Ub se fait par le biais d'une liaison iso-peptidique entre le groupement carboxyle de la glycine terminale (Gly76) de l'Ub et le groupement ϵ -amino d'un résidu spécifique au sein du substrat (Lee et al., 2019). La liaison covalente créée entre les deux biomolécules nécessite de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP (Haas et al., 1982).

1.6.2.1 L'ubiquitine

L'Ub est une petite protéine hautement conservée chez les eucaryotes (Dubiel and Gordon, 1999). Elle est formée de 76 acides aminés. Ce petit polypeptide fait environ 8 à 8.6 KDa (Hurley et al., 2006). La structure de l'Ub constitue en une hélice alpha amphipathique et quatre feuillets β (Muller, 1992). La structure tridimensionnelle de l'Ub, Figure 1.2, est hautement thermostable étant donné la disposition des acides aminés hydrophobes sous forme d'un grand noyau et grâce aux liaisons hydrogènes intramoléculaires (Vijay-Kumar et al., 1987). Six résidus lysines (Lys6, Lys11, Lys29, Lys33, Lys 48 et Lys 63) et une méthionine-1 permettent la liaison d'autres ubiquitine formant ainsi des chaînes d'ubiquitine (Dikic et al., 2009).

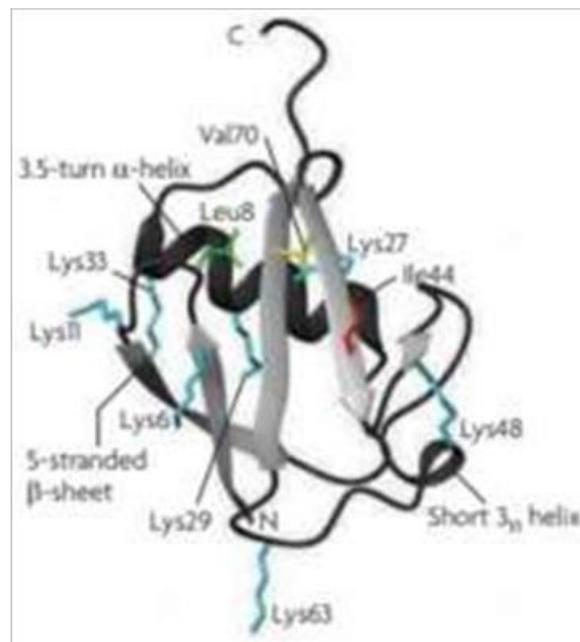


Figure 1.2: Structure de la protéine d'ubiquitine. La structure tridimensionnelle de la protéine ubiquitine contient une hélice α et un feuillet β . Six résidus lysines (Lys6, Lys11, Lys29, Lys33, Lys 48 et Lys 63) et une méthionine-1 permettent la liaison d'autres ubiquitine formant ainsi des chaînes d'ubiquitine. Figure tirée et adaptée de (Dikic et al., 2009).

1.6.2.2 La cascade enzymatique

La fixation de l'Ub sur le substrat nécessite l'intervention séquentielle de trois enzymes : les enzymes d'activation de l'Ub 1 (UBE1), les enzymes de conjugaison de l'Ub (UBE2) et les enzymes ubiquitine ligases (UBE3) (Dubiel and Gordon, 1999). La première étape du mécanisme d'ubiquitination présenté à la Figure 3 est médiée par les enzymes UBE1 (Pickart, 2001b). Ces enzymes permettent l'activation de l'Ub. Les UBE1 sont des structures à trois domaines. Un domaine pseudo-dimérique d'adénylation important pour l'activation de l'Ub. Un domaine Cys, et comme son nom le dit, il héberge la cystéine catalytique importante dans pour la formation de la liaison thio-ester entre l'Ub et la UBE1. Finalement, un domaine

d'Ub-fold (UFD) impliqué dans le recrutement de l'enzyme UBE2 (Lv et al., 2017). Pour être capable de catalyser la réaction enzymatique, les UBE1 doivent subir des changements de conformations. En premier lieu, les UBE1 ont peu d'affinité pour la molécule d'Ub (Pickart, 2001b). Ceci nécessite alors l'intervention de l'ATP pour adényler l'Ub (Schulman and Harper, 2009). Suite à la formation du complexe Ub-ATP-UBE1, l'Ub est adénylée. Le domaine Cys de l'UBE1 subit une rotation de 130°. Cette rotation est importante pour rapprocher la cystéine catalytique de l'UBE1 du groupement carboxyle de la Gly76 de l'Ub. Ce phénomène est appelé le « remodelage du site actif ». Après la formation de la liaison thioester entre l'UBE1 et l'Ub, l'AMP se libère du complexe permettant au domaine Cys de la UBE1 de retourner à sa formation native ouverte afin de produire d'autres cycles d'adénylation de l'Ub (Huang et al., 2007). Les premières enzymes UBE2 ont été caractérisés en 1985 à partir de lysats de réticulocytes de lapin (Pickart and Rose, 1985). Chez les eucaryotes simples, comme les levures, les enzymes UBE2 sont codées par un petit nombre de gènes. Chez les humains, le génome code pour environ 40 enzymes UBE2 impliquées dans les mécanismes de régulations cellulaires (Stewart et al., 2016).

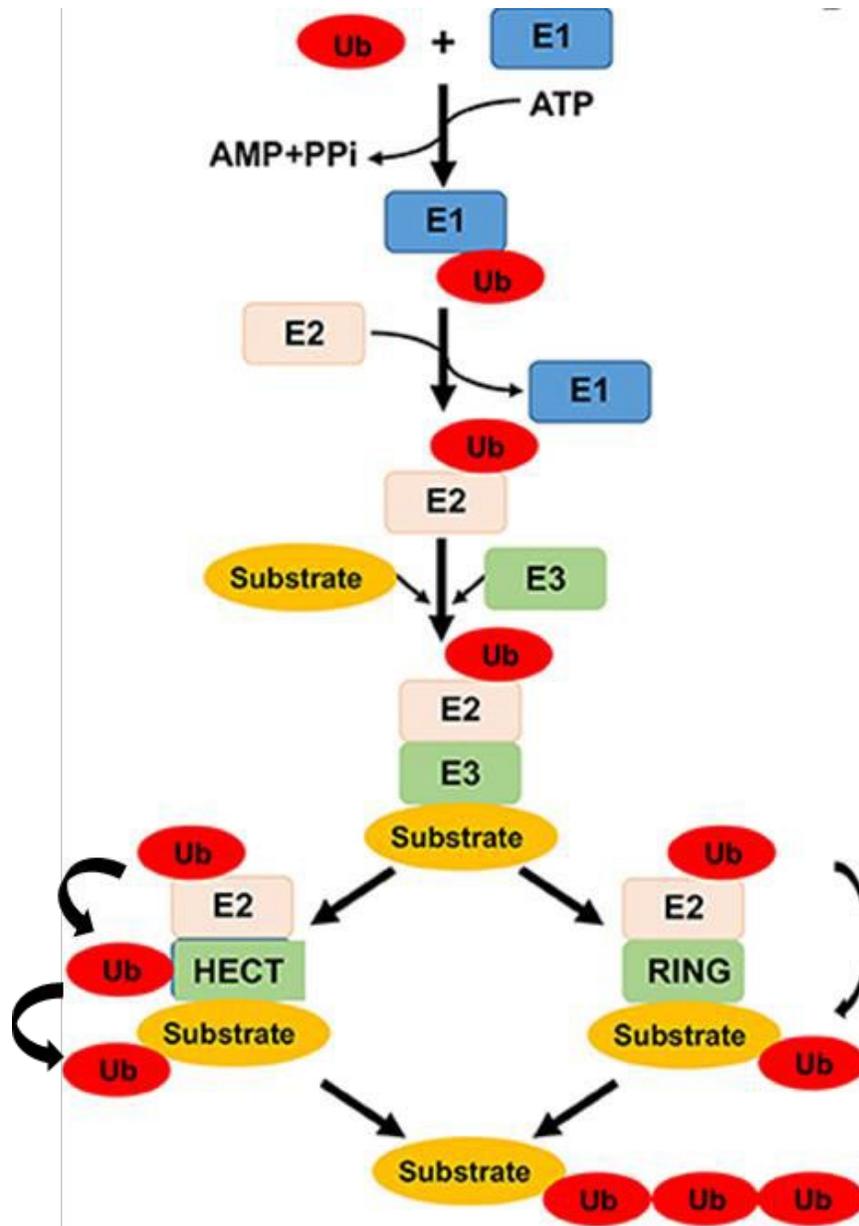


Figure 1.3: Cascade enzymatique de la voie d'ubiquitination. L'enzyme E1 utilise une molécule d'ATP pour activer la molécule d'ubiquitine. L'ubiquitine activée est par la suite transférée sur l'enzyme de conjugaison E2. Les enzymes E2 et les protéines ligases Ub (E3) médient la fixation de l'ubiquitine sur un résidu lysine des protéines substrats. D'autres molécules d'ubiquitine peuvent être attachées pour former des chaînes d'ubiquitine. Figure tirée et adaptée de (Qiu and Luo, 2017).

Comme les enzymes UBE1, les UBE2 vont porter l'Ub sur un résidu cystéine active. Ce résidu est situé dans une région hautement conservée formée d'environ 140-220 acides aminés et appelée domaine de conjugaison de l'Ub (UBC) (Callis, 2014). Certaines enzymes UBE2 nécessitent un changement de conformation pour pouvoir interagir avec l'UBE1. Le domaine UFD de l'UBE1 est responsable du recrutement de l'UBE2. Par une rotation de 120°, le domaine UFD de la UBE1 peut faire face au domaine actif de l'UBE2 (Huang et al., 2007). Le transfert de l'Ub peut alors avoir lieu par une liaison thioester avec la Cys active de l'UBE2. Cette réaction est aussi appelée trans-thiolation (Stewart et al., 2016). Les UBE3 médient la troisième et dernière étape dans la voie de l'ubiquitination. Le génome humain code pour plus que 650 UBE3s différentes (de Bie and Ciechanover, 2011). Il n'est pas surprenant que les UBE3 soient responsables de la spécificité du substrat dans le processus d'ubiquitination. Les UBE3 sont exprimées sous une forme latente. Elles peuvent subir des MPT apportant des changements de conformations qui sont importants pour l'activation ou l'inhibition des UBE3 (Zheng and Shabek, 2017). L'ensemble des UBE3 se regroupent dans trois familles de protéines : les UFD2 homologue (U-box), les UBE3 à domaine homologous to E6-AP C-terminus (HECT) et les UBE3 à domaine Really interesting new gene (RING) (Suo et al., 2014). Les enzymes des deux premières familles sont de plus petite taille en comparaison avec celles de la famille RING. Les UBE3 à domaine RING médient un transfert direct de l'Ub vers le substrat. Par contre, les UBE3 à domaine HECT lient la molécule d'Ub au niveau du leur site active avant de la transférer vers le substrat. Le protéome humain regroupe plus de 600 UBE3s de type RING (Metzger et al., 2012). Le domaine RING est constitué d'un segment de 40 à 60 acides aminés (Callis, 2014). La stabilité de la structure des UBE3 à domaine RING et leur liaison aux UBE2 sont coordonnées par 2 ions zinc en arrangement croisé (Metzger et al., 2014). Les UBE3 à domaine RING sont alors considérées comme des molécules d'échafaudages (Ebner et al., 2017) qui jouent un rôle d'activateur allostérique affaiblissant la liaison de l'Ub sur l'UBE2. Les UBE3s à domaine RING favorisent un positionnement adéquat de la UBE2

permettant un transfert direct de l'Ub sur la Lys ciblé du substrat (Metzger et al., 2014). L'enzyme Ring Finger Protein 167 (RNF167) fait partie de la famille des UBE3 ligases à domaine RING. Elle est formée d'un domaine associé à la protéase (PA), un DTM et un domaine RING (Lussier et al., 2012; Theurillat et al., 2014). Ce dernier se projette dans le cytoplasme cellulaire (Lussier et al., 2012). RNF167 est exprimée dans l'hippocampe et le cortex chez les rats adulte. Elle peut se retrouver à la surface des neurones, dans les endosomes et au niveau des lysosomes (Lussier et al., 2012). L'étude de Lussier et al. a démontré l'implication de RNF167 dans la voie dépendante de l'Ub menant à la régulation de l'expression synaptique des AMPARs (Lussier et al., 2012). De plus, RNF167 permet l'ubiquitination de plusieurs autres substrats comme la protéine Arl8B et les vesicle-associated membrane protein-3 (VAMP-3) (Deshar et al., 2016). Les enzymes neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4 (Nedd4) sont des enzymes E3 ligases à domaine HECT (Boase and Kumar, 2015). L'UBE3 Nedd4 de type 1 (Nedd4-1) est enrichie au niveau de la synapse. Elle s'implique dans la régulation neuronale par l'ubiquitination, entre autres, des AMPARs (Lin et al., 2011a). Par ailleurs, Nedd4-2 catalyse l'ubiquitination de la sous-unité GluA1 des AMPARs ce qui entraîne une réduction de l'excitabilité neuronale. Ce phénomène est dû à la réduction de la population de récepteurs AMPA à la surface neuronale (Lin et al., 2011b).

1.6.2.3 Les chaînes d'ubiquitines

Comme déjà mentionné ci-dessus, l'Ub s'attache au substrat via une Gly en position 76. D'une part, les UBE3 peuvent attacher une seule molécule d'Ub sur le substrat pour former une mono-ubiquitination. Or, de multiples ubiquitines peuvent lier différents résidus au niveau du substrat pour former une poly-mono-ubiquitination (Hicke, 2001). D'autre part, la molécule d'Ub, elle-même, contient sept Lys intrinsèques à différentes positions (Lys 6, Lys 11, Lys 27, Lys 29, Lys 33, Lys 48,

Lys 63), ainsi que le résidu méthionine1 (Met-1) (Kirisako et al., 2006). Ces résidus peuvent à leur tour devenir des cibles d'ubiquitination. Ce phénomène est à la base de la formation des chaînes poly-Ub homotypiques par l'ajout séquentiel de plusieurs molécules d'Ub. Les chaînes ainsi formées sont appelées par la position de la première Lys porteuse de l'Ub. Les chaînes d'Ub formées par l'attachement de l'Ub sur la méthionine en position 1 portent le nom de chaîne linéaire (Kirisako et al., 2006). La complexité de formes des chaînes d'Ub entraîne une grande variété de résultats fonctionnels différents. La modification des protéines par des chaînes Lys 6 par exemple, a été identifiée suite à des dérégulations mitochondriales ou un stress cellulaire causé par les rayons ultraviolets (Swatek and Komander, 2016). Les chaînes de type Lys 11 sont impliquées dans la régulation des protéines vers une dégradation protéasomale (Akutsu et al., 2016). Certaines protéines de la voie de routage post-Golgi sont ubiquitinées par des chaînes Lys 33 (Yuan et al., 2014) alors que des chaînes Lys 27 sont principalement impliquées dans les voies de régulations suite à un dommage à l'ADN et dans les réponses immunitaires (Swatek and Komander, 2016). L'enzyme KIAA10/UBE3C ligase à domaine HECT est responsable de la formation des chaînes d'Ub de type Lys 29 et Lys 48 (You and Pickart, 2001). Ces chaînes sont importantes dans la dégradation protéasomale de leurs substrats (Swatek and Komander, 2016). Les chaînes Lys 63 sont les deuxièmes chaînes d'Ub les plus abondantes. Contrairement aux chaînes Lys 48, les chaînes Lys 63 ne présentent pas de rôles dans la dégradation associée avec le protéasome mais elles sont plutôt impliquées dans la régulation de la voie de dégradation lysosomale et autophagique. De plus, les chaînes Lys 63 ont des rôles dans les processus de transport des protéines, la réparation de l'ADN et l'activation de différentes protéines kinases (Grice and Nathan, 2016). Il existe aussi les chaînes mixtes sous forme hybrides ou ramifiées (Kim et al., 2013). Un bel exemple de chaînes hybrides est celle qui implique l'UBE3 *Ubiquitin Fusion Degradation protein* (Ufd4p). Cette enzyme catalyse la liaison des chaînes Lys 29 aux chaînes Lys 48 pour former des chaînes hybrides Lys 29 / Lys 48. Cette modification entraîne la dégradation du substrat au niveau du

protéasome (Liu et al. 2017).

1.7 Les déubiquitinases

L'ubiquitination est une MPT réversible. Les molécules d'Ub ainsi que les chaînes d'Ub formées peuvent être retirées de la protéine substrat. Les enzymes responsables de cette modification appartiennent à la famille d'enzymes déubiquitinases (eDUB). Le génome humain code pour près de 100 eDUBs (Nijman et al., 2005) qui peuvent être regroupées en cinq sous-familles. Quatre familles de ces eDUBs sont des protéases à cystéine et la dernière famille contient les métalloprotéases (Goo et al., 2015).

1.8 La dégradation lysosomale

Les lysosomes sont des organites dynamiques essentiels chez les eucaryotes. Ils subissent régulièrement des cycles de fission et de fusion avec d'autres vésicules et organites cellulaires (McNally et al., 2017). Ces phénomènes sont médiés par plusieurs protéines et molécules de signalisation comme les Rab-GTPase et les protéines Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor (SNARE) (McNally et al., 2017). Les lysosomes maintiennent un pH acide par rapport au cytoplasme. Ils représentent l'organite de digestion primordiale qui dégrade le matériel intra- ou extracellulaire suite à l'endocytose ou la phagocytose. Suite à l'internalisation dans la cellule, les protéines membranaires sont regroupées dans des vésicules appelées endosomes. Elles sont ensuite destinées à une régulation négative par la voie menant aux corps multivésiculaires (CVM). Le système endosomal utilise ces structures CVM pour livrer les protéines membranaires ubiquitinées vers les lysosomes (Huber and Teis, 2016). Bien que les protéines ubiquitinées par des chaînes tétramériques Lys 48 soient dégradées au niveau du protéasome, les lysosomes sont responsables de la dégradation des biomolécules

modifiées par des mono- et courtes chaînes d'Ub après leur internalisation (Clague and Urbé, 2010). La présence de protéines ubiquitinées initie le recrutement de la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for sorting) (MacDonald et al., 2012) dans l'endosome. Les CVM contiennent une machinerie de triage ainsi que des vésicules intraluminales chargées en protéines. Suite au triage des protéines ubiquitinées, la fusion des CVM avec les lysosomes mènent au relargage du contenu protéique des vésicules dans la lumière lysosomale pour être exposé à des hydrolases acides entraînant leur dégradation (Shields and Piper, 2011).

1.9 La problématique

Les récepteurs du glutamate de type AMPA sont des protéines exprimées au niveau de la partie post-synaptique des neurones. Ce sont des hétérotétramères formés de quatre sous unités GluA1-4. Les études des voies de signalisation ont montré la possibilité de MPT au niveau des différentes sous unités. La modification des AMPARs par la phosphorylation et l'ubiquitination ont alors été une cible d'investigation pendant les deux dernières décennies. La plupart des études se sont intéressées aux effets de ces deux MPT séparément sur les voies de régulations des AMPARs et d'autres protéines de signalisations. Une étude récente (Guntupalli et al., 2017) a montré la présence d'une inter-relation entre la phosphorylation et l'ubiquitination au sein de la sous unité GluA1. En fait, la phosphorylation de la sérine 845 par la PKC régule à la baisse l'ubiquitination de la sous-unité GluA1. Au niveau de sous unité GluA2, la sérine en position 880 a été identifié comme site de phosphorylation par la PKC. En outre, RNF167, une UBE3 ligase a été caractérisée comme enzyme responsable de l'ubiquitination des AMPARs notamment au niveau de la sous unité GluA2. Or, la possibilité d'interrelation entre la phosphorylation et l'ubiquitination de GluA2 est encore inconnue. Ce qui nous porte à étudier la voie de régulation de GluA2 par phosphorylation et ubiquitination.

1.10 Les hypothèses et les objectifs de l'étude

Notre hypothèse d'étude était que la phosphorylation de la sérine S880 par la PKC peut réguler l'état d'ubiquitination de la sous unité GluA2. Pour se faire plusieurs objectifs ont été abordés.

Objectif 1: Déterminer l'effet de la stimulation de la PKC par la PMA sur l'ubiquitination et la phosphorylation S880 de GluA2 dans les neurones.

Objectif 2: Déterminer le site d'ubiquitination de GluA2 induit par la PKC.

Objectif 3: Étudier l'implication de la protéine PICK1 dans la régulation des modifications et de l'expression de surface des GluA2.

Objectif 4: Déterminer si RNF167 est impliqué dans la voie de régulation de GluA2 dépendante de la PKC.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Construction de l'ADN plasmidique

Pour l'expression en cellules de mammifères, les séquences d'ADNc codantes pour les sous-unités GluA2 WT ou mutantes ayant l'épitope FLAG ont été insérées dans le vecteur pRK5. Aussi, l'ADNc encodant pour la protéine fluorescente verte sensible au pH (pHluorine super-écliptique, Sep) qui forme une protéine de fusion avec la sous-unité GluA2 WT cloné dans le vecteur d'expression pCAG a été obtenu du Dr Victor Anggono (Queensland Brain Institute, Australie). La séquence d'ADNc codante pour RNF167-HA a été insérée dans le vecteur pcDNA3.1D/V5-His TOPO tel que précédemment décrit dans (Lussier et al., 2012). Pour l'expression en bactérie : le plasmide pGEX-4T-1 a été utilisé comme vecteur pour l'insertion des séquences codantes du DCT des sous-unités GluA2 WT ou mutantes.

2.2 Anticorps primaires et secondaires

Plusieurs anticorps (AC) primaires et secondaires ont été utilisés pour le marquage des protéines par immuno-buvardage (IB) ou par immunofluorescence (IF). Les anticorps utilisés proviennent de deux espèces : lapin (Lp) et de souris (Sr).

Tableau 2.1 : Tableau des anticorps primaires utilisés pour les essais d'IF et d'IB.

Anticorps	Espèce	Dilution	Épitope	Fournisseur
Anti-Flag M2	Souris	1 :500-1000	Étiquette Flag	Sigma F3165
Anti-V5	Lapin	1 :1000	Étiquette V5	Cell Signaling Technology 13202S
Anti-GFP	Lapin	1 :500	Étiquette GFP	ThermoFisher Scientific A-6455
Anti-GFP	Souris	1 :500	Étiquette GFP	Cell Signaling Technology 2955S
Anti-FK2	Souris	1 :750-1000	Protéines mono et poly ubiquitinées	Enzo Life Science BML-PW8810
Anti-P4D1	Souris	1 :750-1000	Molécule d'Ub, chaîne polyubiquitine, protéines mono et poly ubiquitinées	Santa Cruz Biotechnoloy Sc-8017
Anti-p-S880	Lapin	1 :500	Groupement phosphate Serine 880	Millipore 07-294-I

Tableau 2.2 : Tableau des anticorps secondaires fluorescents utilisés pour les essais d'IF.

Anticorps	Espèce	Dilution	Fournisseur
Alexa 488	Souris	1 :1000	ThermoFisher Scientific A11017
Alexa 568	Lapin	1 :1000	ThermoFisher Scientific A21069
Alexa 647	Lapin	1 :1000	ThermoFisher Scientific A31634

2.3 Transformation bactérienne et préparation d'ADN plasmidique

Les bactéries compétentes *Escherichia coli* (*E. coli*) de type DH5 α (ThermoFisher Scientific) ont été utilisées pour l'amplification de l'ADN plasmides alors que celles de types BL21 (DE3) gold (Agilent Technologies) ont été utilisées pour l'expression protéique. Les différentes constructions plasmidiques ont été introduites dans les bactéries chimio-compétentes par choc thermique. Les bactéries ont été incubées sur glace pendant 30 min en présence de 1/10 de volume en ADN plasmidique. Le choc thermique a été fait à 42°C pendant 45 secs suivis d'une incubation de 2 min sur glace. Un volume de milieu Luria-Bertani (LB) stérile (5 g/L extrait de levure, 10 g/L peptone, 10 g/L NaCl) a été utilisé pour faciliter l'ensemencement sur pétri LB-Agar- Ampicilline (Amp) (5 g/L extrait de levure, 10 g/L peptone, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar et 100 μ g/ml Ampicilline). Un volume suffisant de culture bactérienne a été mis sur pétri en condition stérile suivi d'une incubation à 37°C pendant 16h. Les plaques ont été conservées jusqu'à une semaine à 4°C. Une colonie bactérienne DH5 α transformée avec la construction plasmidique d'intérêt a été sélectionnée et incubée dans 100ml de milieu LB-Amp stérile pendant 16-18h sous agitation constante à 200 rotations par minute (rpm) à 37°C. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait par lyse alcaline selon le protocole du Kit (Presto plasmid MIDIprep kit de Geneaid, cat# PIF025, distribué par Froggabio) puis solubilisé dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). La concentration plasmidique a été mesurée par NanoDrop-2000 (Thermo Scientific) pour être utilisé dans les transfections cellulaires.

2.4 Expression et purification de protéine GST-GluA2

Une colonie bactérienne BL21 (DE3) gold exprimant chacune des constructions plasmidiques pGEX-GluA2 WT et mutantes a été sélectionnée et incubée dans 5ml de milieu LB-Amp pendant 16-18h à 37°C sous agitation à 200 rpm. La pré-culture

bactérienne a ensuite été ajoutée à 100 ml de milieu de culture LB-Amp contenant 2% glucose stérile puis incubé (37°C sous agitation à 200 rpm). Lorsque la densité optique (DO) atteint 0.6 à 600nm, l'expression protéique a été induite avec 0.5 mM d'IPTG pendant 2h à 30°C. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation à haute vitesse, le culot bactérien a ensuite été lysé avec 5ml de tampon GST froid (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5 mM DTT, 1mM PMSF). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation. Les protéines solubles dans le surnageant ont ensuite été purifiées par incubation pendant 2h avec 100 µl de résines Glutathion- Sepharose (GE Healthcare) pré-équilibrée par lavage avec du tampon GST. Après 2h de couplage, les protéines liant la résine ont été précipitées par centrifugation au froid puis lavées plusieurs fois avec du tampon GST. Afin de quantifier les protéines purifiées, une fraction égale de résine de chacune des conditions a été incubée avec du tampon d'éluion Laemmli 2X (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycérol, 2% SDS, 0.2% bleu de bromophénol et 10% B-mercaptoéthanol). L'éluat a été chargé sur gel SDS-PAGE et la quantification a été faite en utilisant la BSA comme protéine de référence.

2.5 Culture cellulaire et transfection de cellules HEK293T/17

Les cellules HEK293T/17 (ATCC, cat # CRL-11268) ont été maintenues à 37°C, 5% de CO₂ dans un milieu basal de culture cellulaire DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, cat # 11995-065, ThermoFisher Scientific) enrichi avec 10% de FBS (Fetal Bovine Serum, ThermoFisher Scientific), 4,5 g / L de glucose et du L-glutamine. La surface des microplaques à 6-puits (Eppendorf) a été traitée avec un volume suffisant d'une solution de la poly-D-Lys hydrobromide (0.1 mg/ml, Sigma) pour permettre une meilleure adhésion cellulaire. Les microplaques ont été bien lavées avec de l'eau stérile et séchées dans l'enceinte de sécurité biologique avant usage. Dans chacun des puits, 1 µg d'ADN plasmidique a été incubé pendant 5 min à température pièce avec 250 µl de milieu Opti-MEM (cat # 11058-021, Gibco-

ThermoFisher Scientific). Dans un tube, 2µl du réactif de transfection Lipofectamine 2000 (cat # 11668-019, ThermoFisher Scientific) a été dilué dans 250 µl de milieu Opti-MEM. Par la suite, les deux solutions ont été très bien mélangés ensemble. Après 30 minutes d'incubation, 1×10^6 cellules ont été ajoutés puis incubés pendant 19h à 37°C dans un milieu humifié contenant 5 % CO₂.

2.6 Essai de liaison in vitro par GST pulldown

Les cellules HEK293T/17, transfectées avec le plasmide exprimant V5-HIS-PICK1WT ayant un épitope V5, ont été lysées avec 1 ml de tampon Co-IP (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% Triton X-100) contenant 20 mM d'inhibiteur NEM, 1X inhibiteur de protéase cocktail (EDTA Free, Bimake), 1X des inhibiteurs de la phosphatase A et B (Bimake) et 50 µM d'inhibiteur de déubiquitine PR-619 (Millipore-Sigma, cat# 662141). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à grande vitesse à 4°C. Le surnageant a été nettoyé par incubation pendant une 1h à 4°C avec de la résine Sepharose (GE Healthcare) pré-équilibrée par lavage avec du tampon Co-IP. 250 µl de surnageant nettoyé ont été incubés avec une quantité égale de protéines GST-GluA2 WT et mutantes couplées à la résine Glutathion-Sepharose (GE Healthcare). Après une heure de rotation (15 tours/minutes, 4°C), la résine a été lavé en utilisant du tampon GST. Les protéines ont été éluées avec 20 µl du tampon de chargement Laemmli 2X. L'analyse de liaison de la protéine V5- HIS-PICK1WT a été faite par migration sur gel SDS-PAGE 10% suivi d'un IB en utilisant des anticorps α V5 Rabbit (1 :1000, Cell Signalling Technology) dilué dans du tampon TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl et 0.3% Tween 20).

2.7 Culture neuronale et transfection

Des cultures primaires de neurones hippocampiques et corticaux de rats Sprague-Dawley (Charles River, St-Constant, QC, Canada) ont été préparées à partir d'embryons des deux sexes extraits au 18^e jour de gestation. L'utilisation a été approuvée par le Comité institutionnel de protection des animaux de l'Université du Québec à Montréal (Protocole CIPA #930). Arrivés à l'animalerie de l'UQAM, les animaux en gestation ont été hébergés selon un cycle de clarté/noirceur de 12h et où les animaux avaient libre accès à l'eau et étaient nourris ad libitum. Après ~24 h d'acclimatation après transport, les rates gestantes ont été anesthésiées à l'isoflurane puis sacrifiées par décapitation et les embryons utilisés tel que précédemment (Lussier et al., 2012). Les hippocampes et cortex ont été isolés par dissection sous microscope Zeiss Stemi 508. Le tissu isolé a été conservé sur glace jusqu'à dissociation effectuée au maximum 1h après sacrifice de la rate gestante. La dissociation des neurones a été effectuée pendant 10 min à 37°C avec 0,05% de trypsine dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) contenant 10 mM HEPES, 1 U/ml de pénicilline-streptomycine (ThermoFisher Scientific) et 1,37 mg/ml d'ADNase (Sigma). Les cellules ont été triturées en utilisant des pipettes Pasteur en verre dont les embouts ont été polis par le feu. Après centrifugation pour séparer les débris des cellules hippocampiques, les neurones ont été comptés, ensemencés et maintenus dans le milieu de culture Neurobasal (NB) supplémenté avec 2% de B-27 (ThermoFisher Scientific) et 2 mM de L-glutamine (Sigma). Pour les essais d'IF, une microplaque de 24-puits contenant des lamelles de 12 mm (cat# 71887-04, Electron Microscopy Science) traitées à la poly-D-Lys (Sigma) a été ensemencée avec 75,000 cellules par puits. Pour la biochimie, ~1,25 x 10⁶ neurones corticaux ont été ensemencés par puits des plaques à six-puits (Eppendorf) prétraitées à la poly-D-Lys ou ~ 7,5 x 10⁶ cellules pour des boîtes de pétri de 100 mm (Eppendorf) prétraitées à la poly-D-Lys. Les cultures ont été maintenues à 37°C dans

un environnement contenant 5% de CO₂. Lorsque nécessaire, les neurones d'hippocampe ont été transfectés au jour 14 de culture in vitro (DIV14). 1 µg de la construction plasmidique Sep-GluA2WT a été mélangé avec 50µL de milieu NB et incubé pendant 5 minutes. 0.75 µl du réactif de transfection Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific) a été dilué dans 50 µl de milieu NB par condition. Les deux solutions ont été très bien mélangées ensemble puis incubées pendant 30 minutes à Température ambiante. Le mélange est ensuite ajouté goutte à goutte sur les neurones en culture dans 400 µl de milieu NB suivi d'une incubation de 2h à 37°C. 500 µl de milieu NB complet ont été ajoutés avant une période de 72h à 37°C, 5% de CO₂ avant utilisation.

2.8 Traitement cellulaire

Après 24 à 48 h d'incubation à 37°C, 5% de CO₂, les cellules HEK293T/17 ou neurones transfectés ont été traités avec des drogues spécifiques : 20 µM d'inhibiteurs de dégradation lysosomale - chloroquine (CQ) pendant 60 min, 5 µM d'inhibiteur de PKC - chelerytrine (CHE) - pendant 60 min, 0,4 µM d'activateur de la PKC - la phorbol 12- myristate 13-acétate (PMA) - pendant 10 min, 50 µM d'inhibiteur de PICK1 (FSC231, Millipore-Sigma, cat# 529531) pendant 10 min, 40 µM de bicuculline (bic) pendant 10 min à 37°C. Le DMSO a été utilisé comme contrôle du véhicule. Pour les expériences avec double traitement, exemple FSC231+bic ou PMA+bic, les cellules ont d'abord été incubées avec 50 µM de FSC231 ou 0.4 µM PMA pendant 10 min puis traitées avec 40 µM de bic pendant 10 minutes supplémentaires à 37°C.

2.9 Lyse cellulaire

Suite au traitement avec les différents agents pharmacologiques, les cellules ont été

lavées 3 fois avec du tampon phosphate PBS froid (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HP0₄, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂P0₄, pH 7.4). Pour la lyse non dénaturante, les cellules lavées ont été incubées 5 min avec 500-1000 µl de tampon RIPA (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5mM EDTA, 0.1%SDS, 0.5% sodium déoxycholate, 20 mM N-ethylmaléimide (NEM, Sigma), 1X cocktail inhibiteur de protéase sans EDTA (Bimake), 1X inhibiteur de phosphatase (Bimake) et 50 µM d'inhibiteur de déubiquitine PR-619 (Millipore-Sigma, cat# 662141)). Lors d'une lyse dénaturante, celle-ci a été faite avec le tampon RIPA mais contenant 1% SDS. En condition dénaturante, 100 µl de tampon SDS 1% préchauffé à 95°C a été utilisé pour lyser les cellules. Le lysat récolté par grattage a été chauffé pendant 10 min à 95°C. 900 µl de tampon d'équilibre (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1.11% Triton X-100, 0.5 mM EDTA, complété avec 20 mM NEM, 1X du cocktail inhibiteur de protéase, 1X inhibiteur de phosphatase A et B, 1X de l'inhibiteur de dé-ubiquitine PR619) froid a été ajouté. Les lysats totaux ont été incubés à froid pendant 20 min sous rotation verticale à 15 tours/min. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à haute vitesse pendant 20 min. Le kit Pierce™BCA Protein Assay (Thermo Scientific, cat #23227) a été utilisé pour la quantification de la concentration en protéines.

2.10 Immunoprécipitation

Pour chaque échantillon à analyser, une quantité égale de protéines cellulaires a été incubée avec de la résine d'agarose A/G Plus (SantaCruz Biotechnology) et l'anticorps monoclonal de souris M2 (Sigma, cat # F3165) ou l'anticorps monoclonal de souris anti-GluA2 clone 6C4 (Millipore, cat# MAB397). L'immunoprécipitation (IP) a été faite pendant une nuit à 4°C sous rotation 15 tours/min. Les protéines immuno-purifiées ont été précipitées par centrifugation de 3 min à 2000 rpm puis lavées plusieurs fois avec 750 µl de tampon RIPA froid. L'élution des protéines a été

faite avec 50 µl de tampon d'élution laemmli 2X suivi d'un chauffage pendant 5 min à 95°C. Le surnageant a été utilisé pour l'analyse quantitative par IB.

2.11 Immunobuvardage et analyses quantitatives

Les protéines immuno-purifiées, protéines éluées d'essais GST-pulldown ou les lysats totaux ont été séparées par des gels SDS-PAGE puis transférées sur membrane PVDF (Biorad) en utilisant le Kit de Trans-Blot Turbo (BioRad). Du tampon TBS-T (TBS avec 0,1% de Tween 20) contenant 5% de lait écrémé ou 3% d'albumine sérique bovine (BSA) a été utilisé pour le blocage des membranes pendant une heure à température ambiante. Après 3 lavages au tampon TBS-T, les membranes ont été incubées avec des anticorps primaires spécifiques pendant 1h à température pièce ou 18h à 4°C. Les membranes ont été lavées à 3 reprises avec sur TBST avant d'être incubées dans les mêmes conditions avec les anticorps secondaires anti-IgG (Sr ou Lp). Les protéines ont été détectées par chimioluminescence en utilisant le substrat ECL (Clarity Western Biorad). Les acquisitions des membranes de IB ont été prises par l'appareil ChemiDoc MP (BioRad). L'ensemble des analyse quantitatives ont été faites à l'aide des logiciels ImageLab, Microsoft Excel et Graphpad Prism. Le taux de sous unité GluA2 ubiquitinée ou phosphorylée a été normalisé par rapport à la quantité de sous unités immuno-précipitées (bande détectée avec α GluA2) puis les valeurs moyennes \pm SEM normalisées à un contrôle sont représentées sous forme d'histogramme.

2.12 Immunofluorescence

2.12.1 Cellules HEK293T/17

Dans des plaques de culture cellulaire à 12 puits, les lamelles circulaires de verre (18

mm, 170 μm d'épaisseur, UltiDent) ont été traitées avec de la poly-D-Lys 0.1 mg/ml. Cette dernière a été utilisée afin d'augmenter l'adhésion des cellules sur les lamelles. Les lamelles ont été ensuite lavées plusieurs fois à l'eau stérile et séchées dans des conditions stériles. 280000 cellules HEK293T ont été co-transfectées avec 0.4 μg d'ADN plasmidique Flag- GluA2 WT et V5-PICK1WT comme décrit à la section 4 ci-dessus. Après 19h d'incubation à 37°C, les lamelles ont été lavées 2 fois avec du PBS contenant du Ca^{2+} et Mg^{2+} , à température pièce. Les solutions utilisées ci-dessous ont été préparées dans du PBS. De plus l'ensemble des manipulations a été fait à température ambiante et à l'abri de la lumière. La fixation des cellules a été faite pendant 15 min en utilisant un volume de PBS contenant 4% paraformaldéhyde et 4% sucrose suivi d'un lavage au PBS. Les cellules ont été perméabilisées avec du PBS contenant 0.25% triton X-100 pour une durée de 30 min. Le blocage a été fait avec du PBS contenant 10% sérum de chèvre pendant une heure complète. Pour le marquage des sous-unités Flag GluA2WT, et la protéine V5-PICK1WT, les lamelles ont été incubées pendant 1h avec l'anticorps primaire α -Flag (Sr, 1:1000, Sigma) et α -V5 (Lp, 1:750, Cell Signaling Technology) préparé dans du PBS +3% sérum de chèvre. Après 3 lavages au PBS, les anticorps secondaires Alexa Fluor 488 anti-souris (1:1000, ThermoFisher Scientific) et Alexa Fluor 568 anti-lapin (1:1000, ThermoFisher Scientific) dilués dans du PBS+3% sérum de chèvre ont été utilisés pour le marquage des sous-unités GluA2 WT et de la protéine PICK1, respectivement. Les lamelles ont été incubées avec les anticorps secondaires pendant 1-2h puis lavés avec du PBS. Pour le marquage du noyau, les cellules ont été mise dans une solution PBS contenant du DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ThermoFisher Scientific) pendant 5 min. L'excès de solution a été éliminé par lavage au PBS. Les lamelles ont été déposées sur des lames de verre en utilisant une goutte de la solution de montage ProLong Diamond Antifade (ThermoFisher Scientific) préchauffé à 37°C. Les lames ont été gardées pendant 16- 18h à température ambiante et à l'abri de la lumière puis conservées à 4°C jusqu'à l'utilisation.

2.12.2 Neurones

Après 72h de transfection, le milieu de culture NB a été récolté. L'expression de surface de sous-unité Sep-GluA2 a été marquée avec l'anticorps primaire de lapin α -GFP (1:500, Invitrogen), préparé dans le milieu de culture NB récolté. Après une incubation de 7 min à 37°C, les neurones ont été lavés avec du milieu NB chaud puis incubés à 37°C avec les différents agents pharmacologiques dans le milieu de culture. Par la suite, les cellules ont été lavées avec du milieu NB chaud puis fixées avec une solution PBS contenant 4% paraformaldéhyde et 4% sucrose. 15 minutes plus tard, les neurones ont été lavés puis bloqués avec une solution PBS contenant 10% sérum de chèvre pendant 1h à température ambiante. Après quelques lavages au PBS, les complexes GluA2 situés à la surface et liés à l'anticorps primaire ont été marqués avec l'anticorps secondaire Alexa fluor 647 anti-lapin (1:1000, ThermoFisher Scientific) pendant 30min à température ambiante. Les neurones ont ensuite été lavés et perméabilisés avec du PBS+0.25% Triton X-100 pour 15 min puis bloqués avec la solution de blocage. Les récepteurs internalisés ont été marqués avec l'anticorps secondaire Alexa fluor 405 anti-lapin (1:1000, ThermoFisher Scientific). L'expression totale en protéine Sep-GluA2 a été détectée avec l'anticorps primaire α -GFP de souris (1:1000, Cell Signaling Technology) pendant 60 min suivi d'une incubation d'une heure avec l'anticorps secondaire Alexa fluor 488 anti-souris (1:1000, ThermoFisher Scientific). Finalement les lamelles ont été lavées plusieurs fois avec du PBS puis immobilisées sur des lames en verre à l'aide de la solution de montage ProLong Diamond Antifade (ThermoFisher Scientific) préchauffé à 37°C. Les lames ont été gardées pendant 16-18h à température ambiante et à l'abri de la lumière puis conservés à 4°C.

2.12.3 Acquisition des images et analyses quantitatives

L'ensemble des acquisitions des cellules immuno-fluorescentes a été faite en utilisant

un microscope à épifluorescence motorisé (Olympus IX83) en utilisant l'objectif 60X pour immersion à l'huile (NA 1.35 / WD 0.15mm - U Plan S-Apo, UPLSAPO60XO). La source de lumière LED X-Cite utilisée permet une couverture à large spectre d'excitation allant du DAPI à Cy5. Les images captées par la caméra sCMOS Zyla 4.2 Plus (Andor) ont subi un traitement de déconvolution par le logiciel Olympus 3D. L'ensemble des analyses quantitatives ont été ensuite faites en utilisant les logiciels Fiji et Microsoft Excel. Les valeurs moyennes normalisées à un contrôle \pm SEM sont représentées sous forme d'histogramme.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 La PMA augmente l'ubiquitination induite par la bicuculline de GluA2 dans les neurones de cortex en culture primaire.

Afin de permettre une bonne activité synaptique, les récepteurs AMPA subissent des mécanismes de régulation qui contrôlent étroitement leur synthèse, modification, expression, routage ainsi que leur dégradation (Anggono and Huganir, 2012; Jurado, 2018; Lu and Roche, 2012). Le résidu sérine en position 880 (S880) du DCT de la sous unité GluA2 a déjà été identifié comme site de phosphorylation par la PKC. De plus, l'application de la bic, un antagoniste des récepteurs GABA, sur des neurones en culture résulte en une augmentation de la quantité du glutamate relarguée au niveau de la fente synaptique (Walker et al., 1999). Avec l'objectif d'étudier l'effet de l'activation synaptique sur la modification des GluA2, les neurones de cortex en culture primaire ont été traités pendant 10 min à 37°C avec un contrôle véhicule DMSO ou 40 µM de la bic. Après traitement, les neurones ont été lysés dans des conditions dénaturantes (voir matériels et méthodes) puis les protéines solubles ont été soumises à une IP avec l'anticorps contre la sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA. La séparation des complexes immuno-purifiés a été réalisée par SDS-PAGE et les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF. Par la suite, des immunobuvardages ont utilisé des anticorps spécifiques dirigés contre le mono ou poly-

ubiquitination (α -P4D1 et α -FK2) et contre le groupement phosphate à la position S880 de GluA2 (α -p-S880). Les molécules et les chaînes d'ubiquitines libres sont aussi reconnues par l'anticorps P4D1. Le résultat d'IB montre qu'une stimulation de l'activité synaptique par la bic induit une augmentation significative de l'ubiquitination de la sous-unité GluA2 sans agir sur la phosphorylation (Figure 3.1a). Cela suggère que la voie d'ubiquitination induite par la bic est indépendante de la phosphorylation de GluA2.

Afin de définir l'implication de la PKC activée sur la phosphorylation et l'ubiquitination de GluA2, des neurones cultivés 14 jours *in vitro* ont été traités en absence ou en présence de 0.4 μ M de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA, 10 min), un puissant activateur de la PKC. À la suite d'IP anti-GluA2 réalisées sur les lysats cellulaires obtenus par lyse dénaturante, les résultats quantitatifs de l'IB illustrent une augmentation significative de l'ubiquitination de GluA2 ainsi que la phosphorylation S880 (Figure 3.1b). Ce résultat supporte que la PKC puisse être impliquée dans la voie d'ubiquitination de la sous-unité GluA2. (Schwarz et al., 2010)

Pour déterminer si la PKC et la bic agissent dans la même voie de signalisation menant à l'ubiquitination de GluA2, les neurones ont tout d'abord été traités en présence ou en absence de PMA pour activer la PKC puis l'activité synaptique a ensuite été déclenchée par l'ajout ou non de la bic pendant 10 min. Les résultats présentés à la Figure 3.1c montrent que la combinaison des deux traitements augmente davantage l'ubiquitination de GluA2 que la phosphorylation de la S880 de GluA2. Ensemble, ces résultats suggèrent que la PKC est impliquée dans la régulation de l'ubiquitination de GluA2 lors d'une augmentation de l'activité synaptique produite par la bic.

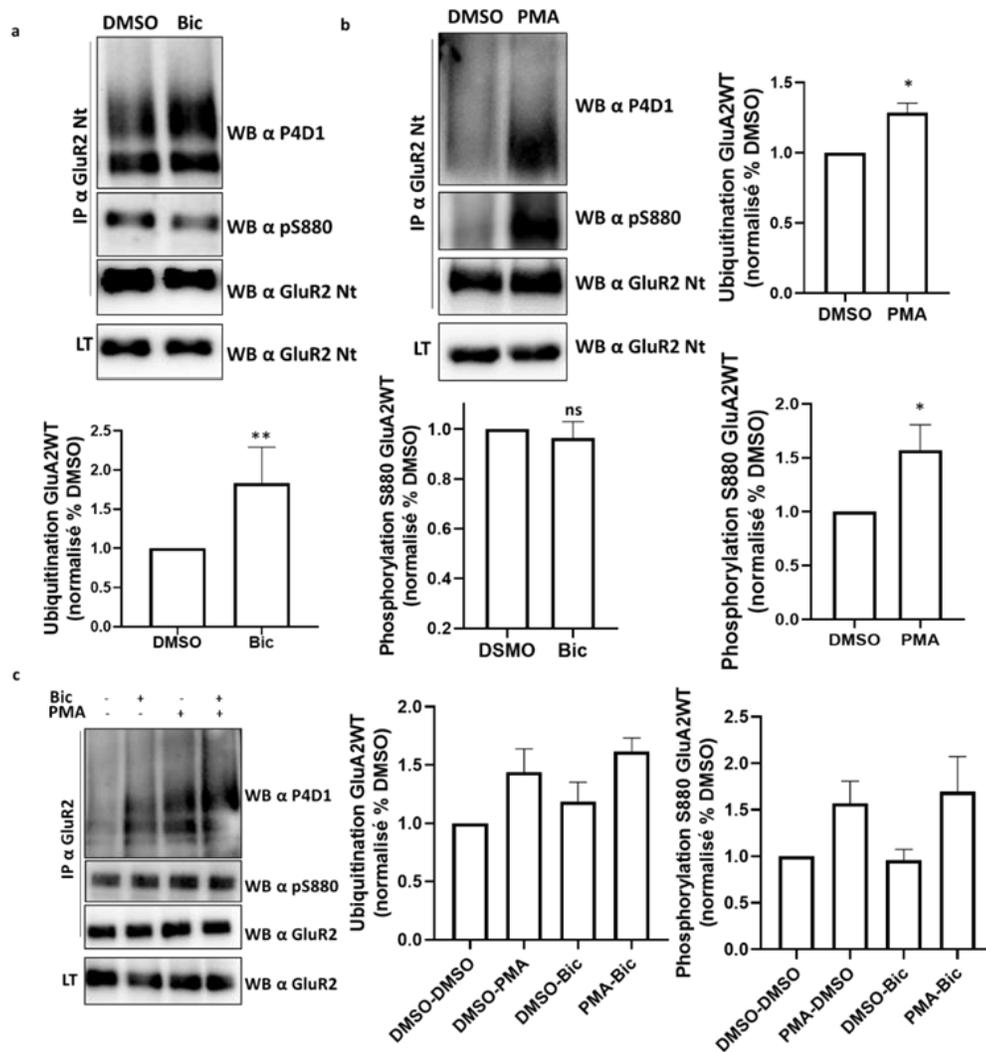


Figure 3.1: L'ubiquitination de GluA2 est augmentée par l'activation de la PKC par la PMA mais aussi par la bicuculline. Les neurones de cortex en culture DIV14 ont été traités avec du DMSO (véhicule, contrôle), (a) ou 40 μ M bicuculline (b) 0.4 μ M PMA pendant 10min ou (c) prétraités avec 0.4 μ M PMA avant incubation avec 40 μ M bicuculline à 37°C. Les protéines GluA2 ont été immuno-précipitées avec des anticorps α -GluA2 puis analysées par IB en utilisant les anticorps contre l'Ub (P4D1) et p-S880. Les données représentent la moyenne \pm SEM de 2-3 expériences indépendantes. (Test de Student non apparié ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns : non significatif.)

3.2 La bicuculline augmente l'internalisation des GluA2 dans les neurones de cortex en culture primaire.

Les récepteurs AMPA sont des protéines dynamiques dont la densité membranaire est contrôlée par un mouvement continu entre la surface synaptique et la partie intracellulaire (Rozov and Burnashev, 1999). Nous avons examiné l'effet de la bic sur le taux d'internalisation de GluA2WT. Pour se faire, les neurones ont été transfectés par les constructions pH sensible Sep-GluA2WT. Un marquage de la population de GluA2 exprimée à la surface des neurones a été effectué avant l'application de la bic.

La population internalisée a été marquée après perméabilisation de la membrane plasmique. Finalement, l'ensemble des sous unités GluA2 a été détecté par la fluorescence de la protéine GFP sensible au pH (Sep). Les résultats d'IF (Figure 3.2) semblent montrer une augmentation du taux d'internalisation de la sous unité GluA2 suite au traitement à la bic. Ceci confirme les données de la littérature (Lee et al., 2004) qui montrent que les AMPARs contenant la sous unité GluA2 sont internalisés en réponse à une activation synaptique par la bicuculline.

3.3 L'activation de la PKC par la PMA augmente l'ubiquitination et la phosphorylation de la sous unité GluA2 dans les cellules HEK293T.

Les résultats de tests biochimiques obtenus dans les neurones suggèrent un lien important entre l'ubiquitination et la phosphorylation de la S880 de la sous unité GluA2 des AMPARs. Pour mieux comprendre cette interrelation, les cellules HEK 293T ont été utilisées pour faciliter la dissection du mécanisme impliqué. Ces dernières ont été utilisées comme modèle cellulaire non neuronal dans plusieurs études faites sur les récepteurs AMPA (Gu et al., 2016; Lin et al., 2011; Lussier et al., 2012; Matsuda et al., 2013; Schwarz et al., 2010). Pour commencer, les cellules

HEK293T ont été

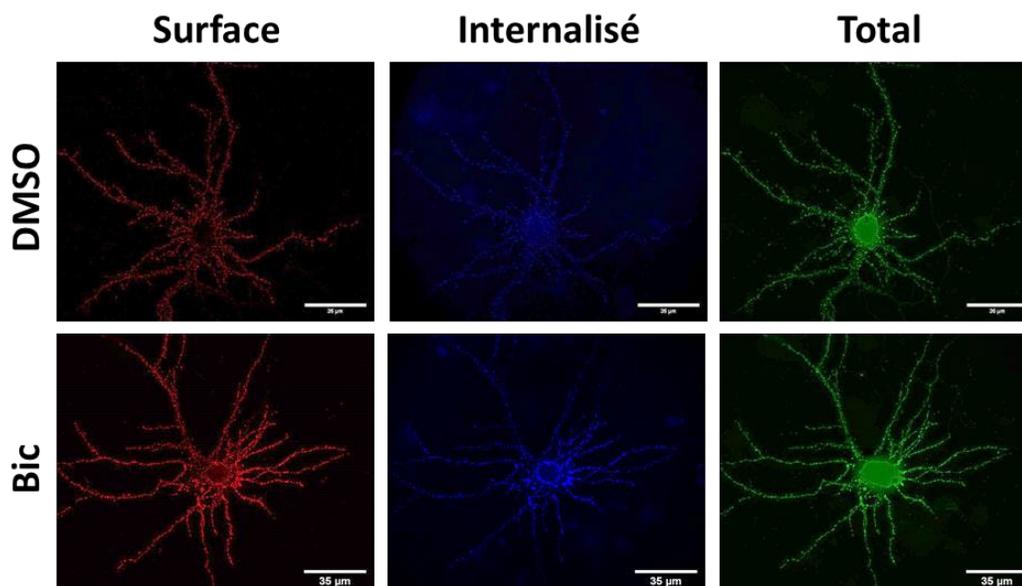


Figure 3.2: La bicuculline augmente l'internalisation des GluA2 dans les neurones de cortex en culture primaire. Les neurones corticaux en culture DIV14 ont été transfectés avec la construction plasmidique Sep-GluA2WT puis traités avec DMSO (véhicule, contrôle) ou 40 μM bicuculline pendant 10 min à 37°C. La distribution de GluA2 à la surface, internalisée et totale a été déterminé par IF comme décrite dans partie Matériels et Méthodes. Les acquisitions ont été faites par microscopie à fluorescence. Échelle 35 μm . 3.4 La PMA augmente l'ubiquitination et la phosphorylation de GluA2 au niveau de Lys-850 dans les cellules HEK293T.

transfectées avec des constructions d'ADN plasmidiques codantes pour GluA2 de type sauvage (Wild-Type, WT) comportant une étiquette Flag (Figure 3.3a). Après traitement avec de la PMA afin d'activer la PKC, les cellules ont été lysées et les sous unités GluA2 ont été enrichies par IP en utilisant des anticorps dirigés contre l'épitope Flag. Après séparation des complexes protéiques sur gel SDS-PAGE, une étape d'IB a permis de détecter puis de quantifier les protéines GluA2 ubiquitinées et phosphorylées S880. Comme attendu, l'activation de la PKC par 0.4 μM PMA

pendant 10 min a induit une augmentation significative de l'ubiquitination et de la phosphorylation S880 de la sous-unité GluA2 de forme sauvage (Figure 3.2b). Ces résultats reproduisent les phénomènes observés dans les neurones suggérant une inter- relation entre la phosphorylation de la S880 par la PKC et l'ubiquitination de GluA2.

Le DCT de la sous unité GluA2 permet la liaison de plusieurs protéines de routage et de régulation cellulaire. La liaison de la protéine AP2, permettant l'internalisation de GluA2, est bloquée par la mutation R845A.

D'autre part, la liaison de PICK1, une protéine impliquée la régulation de l'expression et du routage de GluA2, est inhibé par la présence de la mutation I883E au niveau du domaine PDZ (Figure 3.3 a). Ainsi, par l'utilisation de ces deux mutants, il serait possible d'évaluer si l'activation de la PKC induite par la PMA agit sur GluA2 en absence de liaison des protéines de routage comme PICK1 et AP2, ce qui pourrait informer sur les mécanismes moléculaires utilisés. Selon les résultats de l'IB, (Figure 3.3 c et d) l'augmentation de l'ubiquitination suite à l'activation de la PKC n'était pas spécifique à la GluA2 WT (Figure 3.3a) puisqu'elle a aussi été observée au niveau de la sous-unité mutantes I883E et R845A (Figure 3.3 c et d). On remarque aussi que le niveau d'ubiquitination de base des sous-unités GluA2 mutantes R845A et I883E est plus élevée que celle de GluA2WT (Figure 3.3 c et d). Ensemble ces résultats suggèrent que la kinase PKC puisse être impliquée dans la voie d'ubiquitination de la sous unité GluA2 dans les cellules HEK293T et que cette action est indépendante des protéines PICK1 et AP-2.

L'ajout de l'Ub peut se faire au niveau de 6 différentes Lys dans DCT cytosolique de GluA2 WT (Figure 3.3 a). Les trois Lys en position 850, 870 et 882 ont été identifiées comme importantes dans l'ubiquitination de GluA2 suite à la stimulation neuronale par l'agoniste AMPA (Widagdo et al. 2015). Ici, afin de déterminer si ces trois Lys sont aussi impliquées dans l'ubiquitination médiée par l'activité de PKC,

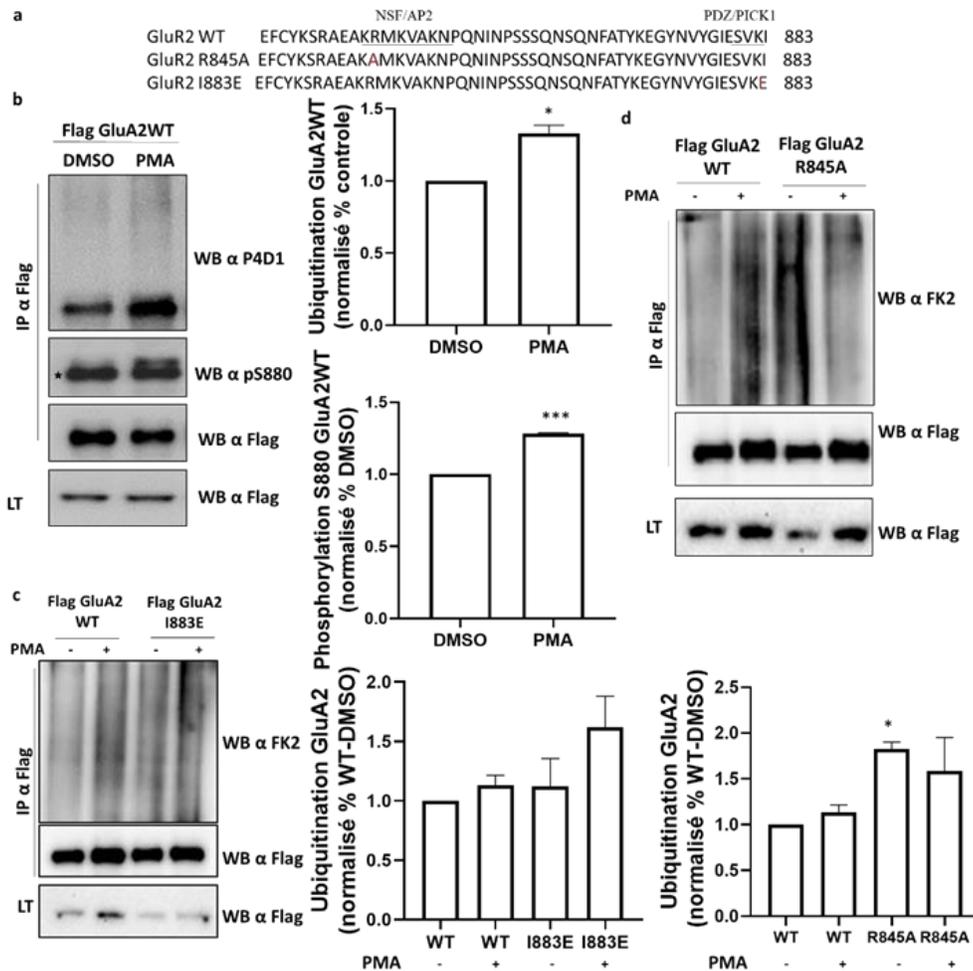


Figure 3.3: L'activation de la PKC par la PMA augmente l'ubiquitination et la phosphorylation de la sous unité GluA2 dans les cellules HEK293T. (a) Séquence d'acide aminés du domaine intracellulaire C-terminal de la sous unité GluA2 WT et les différents mutants (site de mutation indiqué en rouge). Les séquences surlignées représentent les domaines de liaison de protéine NSF/AP2 et PDZ/PICK1. (b,c) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec les constructions plasmidiques Flag-GluA2 WT ou mutantes, puis traitées avec du DMSO (véhicule, contrôle) ou 0.4 μ M PMA pendant 10 min à 37°C. Les protéines GluA2 ont été immuno-précipitées avec des anticorps α -Flag puis analysées par IB en utilisant les anticorps contre l'Ub (P4D1 ou FK2) et p-S880. L'ensemble des données a été normalisé à la condition contrôle. Les données représentent la moyenne \pm SEM de 2-3 expériences indépendantes. (Test de Student non apparié ; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, ns : non significatif et Oneway ANOVA ; * $P < 0.05$). *Bande non spécifique.

les cellules HEK293T ont été transfectées avec Flag-GluA2 WT ou avec une construction n'ayant qu'une seule lysine disponible pouvant être ubiquitinée (850K, 870K et 882K) alors que les autres lysines sont mutées en arginines. Après une lyse dénaturante, les protéines solubles ont été sujet à une IP suivie d'un IB. D'après les analyses quantitatives effectuées, le traitement à la PMA semble induire une ubiquitination de la sous unité mutante GluA2 850K deux fois plus intense que celle de la sous unité WT. Cette augmentation corrèle avec une augmentation de la phosphorylation au niveau de la S880 (Figure 3.4 a). En revanche, la PMA a induit une augmentation de la phosphorylation S880 de la sous unité GluA2 882K sans affecter son niveau d'ubiquitination (Figure 3.4 a et b). D'autre part, en présence de la PMA, le niveau de phosphorylation du mutant 870K est réduit de 30% par rapport au WT. Ces résultats suggèrent la possibilité d'un effet répresseur de l'ubiquitination de la K870 sur la phosphorylation de la S880 (Figure 3.4 a et b). L'ensemble de ces résultats suggère la présence de voies de signalisation qui implique la régulation de l'ubiquitination de la sous-unité GluA2 par la PKC en fonction de la lysine ciblée par l'Ub. On suppose que la K850 est un résidu important dans la voie d'ubiquitination régulée par la PKC et où l'ubiquitination de la K850 peut avoir un effet synergique sur la phosphorylation de la S880 (Figure 3.4 a et b).

3.4 La protéine PICK1 WT interfère avec la possibilité de modifications par ubiquitination à GluA2 dans les cellules HEK293.

La protéine à domaine PDZ, PICK1, a déjà été caractérisée comme un facteur important dans les voies de routage subcellulaire des récepteurs AMPA (Fiuza M. et al 2015). Il est aussi connu que la phosphorylation de la sérine S880 promeut la liaison de PICK1 à la sous unité GluA2 (Steinberg et al., 2006). Dans ce contexte, il est pertinent de déterminer si PICK1 est impliquée dans la régulation de l'ubiquitination et de la phosphorylation de la sous-unité GluA2. Pour commencer, la colocalisation de PICK1 et GluA2WT a été visualisé par IF dans les cellules

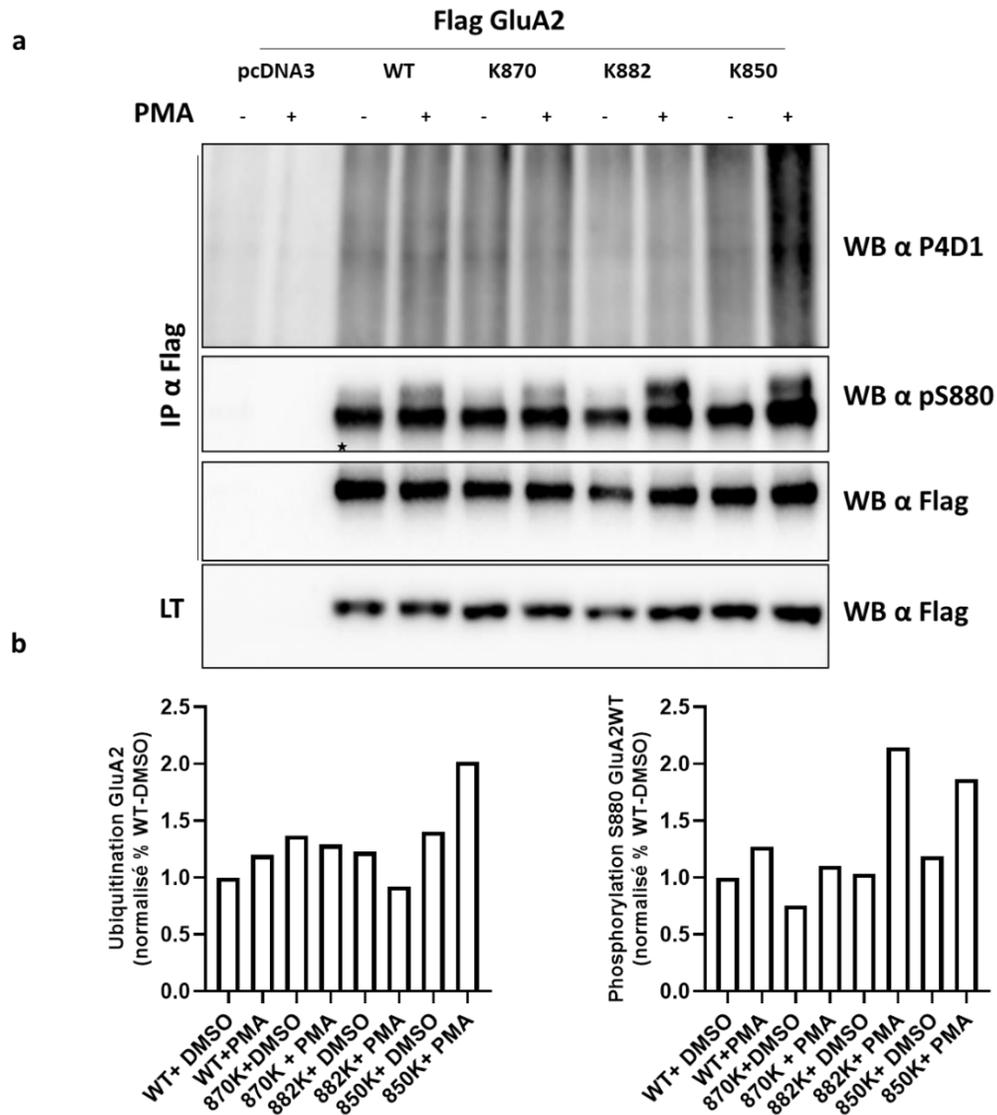


Figure 3.4: La PMA augmente l'ubiquitination et la phosphorylation de GluA2 au niveau de Lys-850 dans les cellules HEK293T. (a) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec les constructions plasmidiques codantes pour Flag-GluA2WT ou mutantes, puis traitées avec du DMSO (véhicule, contrôle) ou 0.4 μ M PMA pendant 10 min à 37°C. Les protéines GluA2 ont été immuno-précipitées avec des anticorps α -Flag puis analysées par IB en utilisant les anticorps contre l'Ub (P4D1) et p-S880. (b) L'ensemble des données a été normalisé à la condition contrôle. (n=1). *Bande non spécifique.

HEK293T (Figure 3.5 a). Par la suite, les cellules HEK293T ont été co-transfectées avec la construction Flag-GluA2 WT en présence ou en absence de V5-His-PICK1WT. Après une lyse dans des conditions dénaturantes et une IP avec les anticorps contre l'épitope Flag de GluA2, les protéines immuno-purifiées ont été séparées sur SDS-PAGE puis transférées sur membrane de PVDF. Une analyse par IB a été faite en utilisant les anticorps contre l'Ub (α -P4D1) (Figure 3.5 b) et α -p-S880 (Figure 3.5 c). Les résultats montrent que PICK1 diminue significativement l'ubiquitination et la phosphorylation de GluA2. Ces résultats suggèrent que la liaison de PICK1 à la sous unité GluA2 réduit l'ubiquitination et la phosphorylation de GluA2 dans les cellules non neuronales.

Par la suite, dans le but de confirmer l'interaction entre la protéine PICK1 WT et le domaine de liaison PDZ de GluA2, un test GST pull-down a été fait dans les conditions *in vitro*. Les séquences exprimant la partie C-terminale des sous unités GluA2 ont été insérés dans des plasmides pGEX-4T-1 afin de générer une protéine de fusion GST- GluA2. À la suite d'une expression optimale dans des bactéries *E. coli* BL21(DE3) Gold, les protéines recombinantes de GST-GluA2 WT ou les mutants I883E, R845A, S880A ont été purifiées par affinité sur résine de sépharose couplée à la glutathionne (GSH).

Le lysat des cellules HEK 293T exprimant la protéine PICK1 WT portant l'étiquette V5-His en C-terminale a été incubée avec les protéines GST-GluA2. Le résultat de l'IB contre l'épitope V5 montre que la mutation R845A qui se situe à l'extérieur du domaine PDZ ne bloque pas la liaison de PICK1 puisque l'intensité de la bande est similaire à celle de GluA2 WT. L'interaction de PICK1 est significativement réduite avec le mutant de GluA2 phospho-déficient S880A et entièrement absent avec le mutant I883E du domaine de liaison PDZ (Figure 3.6 a). Ces données montrent que la liaison de PICK1 à GluA2 se fait au niveau via le domaine PDZ. PICK1 affecte négativement le niveau d'ubiquitination et de p-S880 de la forme sauvage de GluA2.

Or, aucun effet significatif n'est observé au niveau de ces modifications pour les formes mutantes I883E et S880A dont le site de liaison au domaine PDZ-PICK1 et de phosphorylation sont respectivement mutés (Figure 3.6 b et c). L'ensemble des résultats suggèrent que la liaison de PICK1 à la sous unité GluA2 peut interférer avec l'ubiquitination de GluA2 dans les cellules HEK293T.

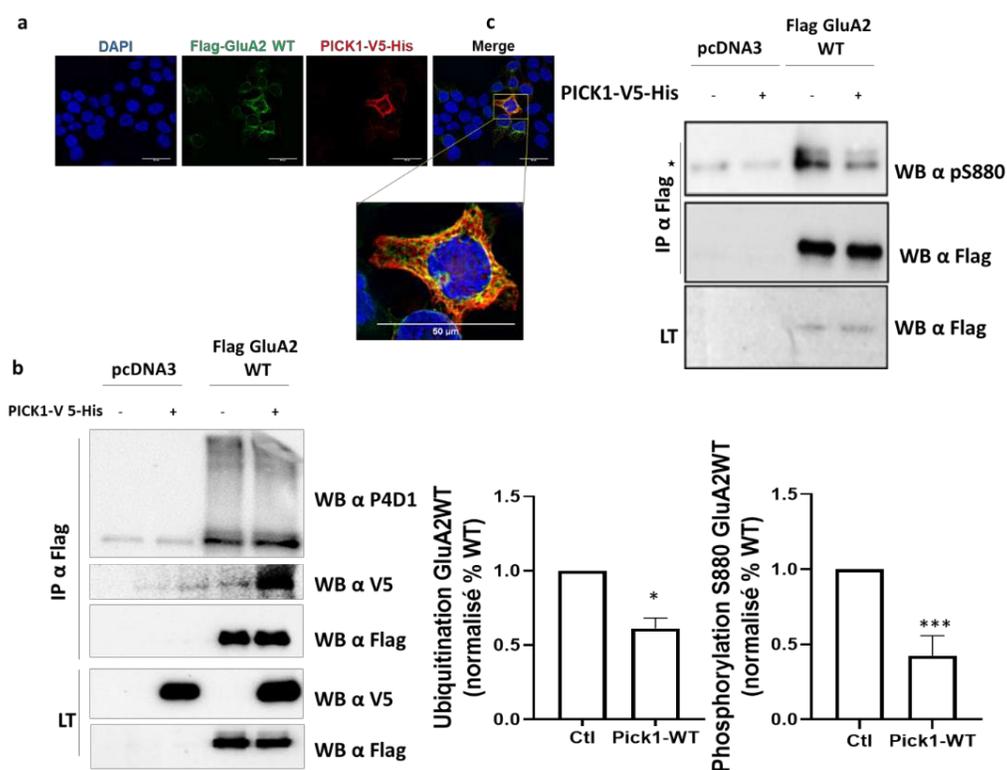


Figure 3.5: La protéine PICK1 WT diminue l'ubiquitination et la phosphorylation de GluA2 WT dans les cellules HEK293T. Les cellules HEK293T ont été co-transfectées avec les constructions plasmidiques codantes pour Flag-GluA2WT et PICK1-V5-His. (a) La colocalisation de Flag GluA2 avec PICK1 -V5-His a été détectée par IF comme décrite dans partie Matériels et Méthodes. Les acquisitions ont été faites par microscopie à fluorescence. Échelle 50 μ m (b, c) Les protéines GluA2 ont été immuno-précipitées avec des anticorps α -Flag puis analysées par IB en utilisant les anticorps contre (b) l'Ub (P4D1) et (c) p-S880. L'ensemble des données a été normalisé à la condition contrôle. Les données représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. (Test de Student non apparié ; * $p < 0.05$; *** $P < 0.001$). *Bande non spécifique.

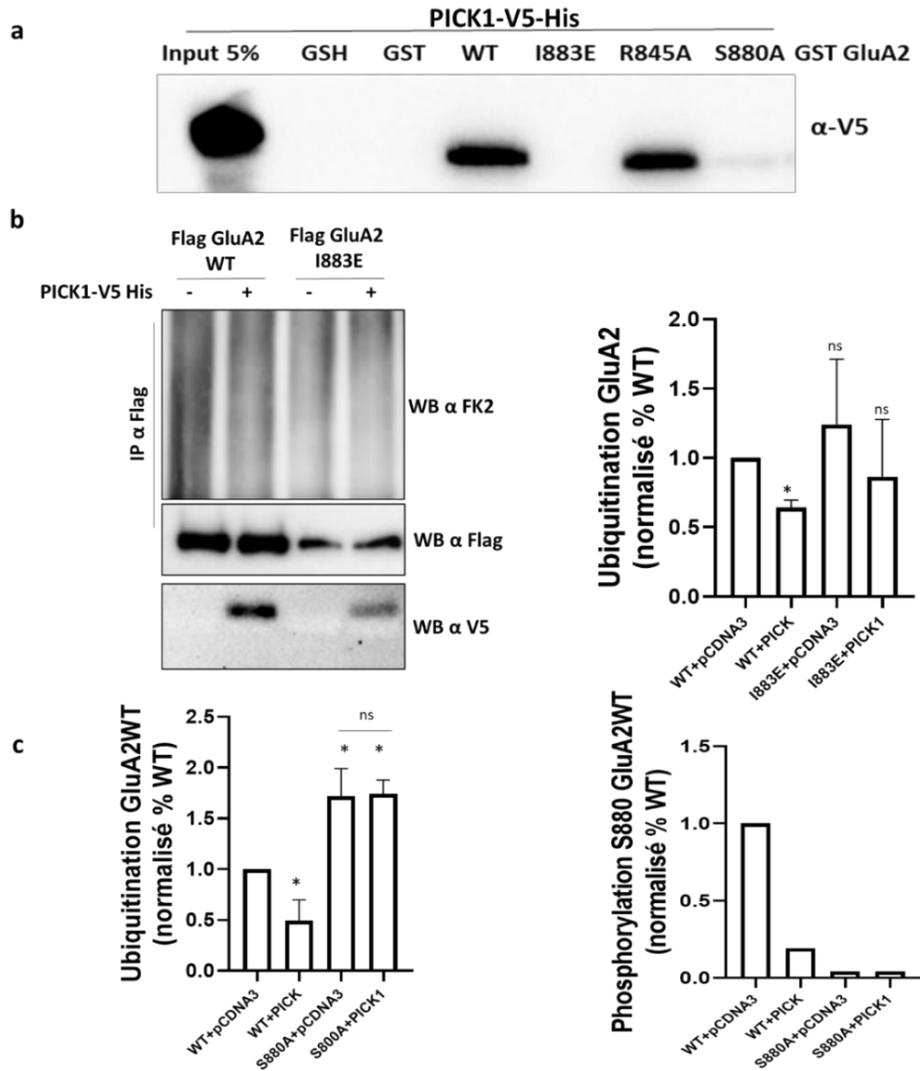


Figure 3.6: La liaison de PICK1 nécessite que le domaine PDZ de GluA2 soit intact pour réduire l'ubiquitination de GluA2 dans les cellules HEK293. (a) Essai GST PullDown. Le lysat de cellules HEK293T transfectées avec le plasmide codant pour PICK1-V5-His a été incubé avec la résine couplée ou pas à des protéines GST-GluA2 WT et mutantes. Un IB spécifique a été réalisé contre l'épitope V5 de PICK1. (b-d) Les cellules HEK293T ont été co-transfectées avec les constructions plasmidiques pcDNA3 (vecteur vide), PICK1WT-V5-His, Flag GluA2WT ou mutante. Les protéines GluA2 ont été immuno-précipitées avec des anticorps α-Flag puis analysées par IB en utilisant les anticorps contre l'Ub (FK2) et p-S880. L'ensemble des données a été normalisé à la condition contrôle. Les données représentent la moyenne \pm SEM de 1-6 expériences indépendantes. (Test de Student non apparié ; * $p < 0.05$, ns : non significatif).

3.5 L'inhibition de PICK1 n'affecte pas l'ubiquitination de GluA2 au niveau des neurones.

Sachant que l'ubiquitination de GluA2 dans les neurones peut être induite par la bic et que PICK1 est connue pour son implication dans l'internalisation et du routage intracellulaire de GluA2, il était pertinent de déterminer si la protéine PICK1 est impliquée dans l'ubiquitination de GluA2 induite par la bic. Pour se faire, les neurones ont été traités ou non avec 50 μ M d'un inhibiteur du domaine de liaison PDZ de PICK1 (le FSC231) puis incubés en présence ou en absence de 40 μ M de la bic pendant 10 min. Après traitement, les cellules ont été lysées dans des conditions dénaturantes (voir matériels et méthodes) puis les protéines solubles ont été soumises à une IP avec l'anticorps contre la sous-unité GluA2. Après séparation sur gel SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF. La détection des protéines ubiquitinées et phosphorylées a été possible en utilisant des anticorps spécifiques α -P4D1 et α -p-S880 respectivement. Lors de l'inhibition de PICK1, et cela en présence ou absence de la bic, les résultats montrent aucune modulation significative de l'ubiquitination de GluA2 et du niveau de p-S880 (Figure 3.7 a).

Pour élaborer le lien entre l'ubiquitination et le rôle de PICK1 dans l'expression membranaire de GluA2, nous avons testé si l'inhibiteur FSC231 altère l'internalisation de GluA2 dans les conditions basales non stimulées. En absence de stimulation synaptique induite par la bicuculline, les résultats démontrent que l'utilisation de l'inhibiteur FSC231 réduirait l'internalisation de GluA2 (Figure 3.7 b). En somme, les résultats supportent un rôle de PICK1 dans le mécanisme dépendant de l'activité neuronale menant à l'ubiquitination de GluA2.

3.6 L'ubiquitination de GluA2 induite par la PKC active est médiée par RNF167.

Jusqu'à maintenant nous avons montré un effet de l'activation de la PKC par la PMA sur l'ubiquitination de GluA2. Nous avons voulu ici déterminer si la phosphorylation de la sérine S880 par la PKC est essentielle pour induire l'ubiquitination de GluA2 en cellule HEK293T. Étonnamment, les résultats du IB montrent que le niveau

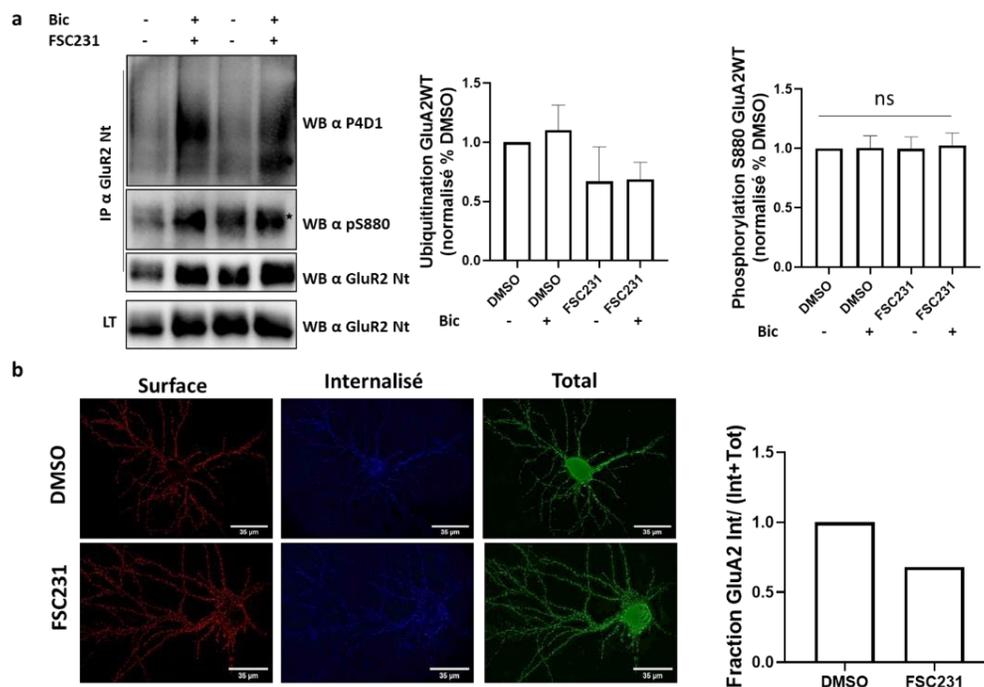


Figure 3.7: L'inhibition de PICK1 diminue l'ubiquitination et l'internalisation de GluA2 au niveau des neurones. Les neurones de cortex en culture DIV14 ont été (a) traités avec DMSO (véhicule, contrôle), 40 μ M bicuculline, 50 μ M FSC231 pendant 10min ou prétraités avec 50 μ M FSC231 avant incubation avec 40 μ M bicuculline à 37°C puis lysés dans des conditions dénaturantes. Les protéines GluA2 ont été immuno-précipitées avec des anticorps α -GluA2 puis analysées par IB en utilisant les anticorps contre l'Ub (P4D1) et p-S880. Les données représentent la moyenne \pm SEM de 2-3 expériences indépendantes. (Oneway ANOVA; ns : non significatif). *Bande non spécifique. (b) Les neurones de cortex en culture DIV14 ont été transfectés avec la construction plasmidique Sep-GluA2WT puis traités avec DMSO (véhicule, contrôle) ou 50 μ M de FSC231 pendant 10 min à 37°C. La quantité de GluA2 à la surface, internalisée et totale a été déterminé par IF comme décrite dans la partie Matériels et Méthodes. L'ensemble des acquisitions a été faite par microscope à épifluorescence motorisé (Olympus IX83). Le niveau d'expression des récepteurs a été quantifié et le ratio d'internalisation est calculé (Internalisés/(Internalisés+Total)). (n=1).

d'ubiquitination de base du mutant phospho-déficient GluA2 S880A est significativement plus élevé que celui de GluA2 WT (Figure 3.8 a). De plus, le traitement à la PMA a induit une augmentation de l'ubiquitination de GluA2 S880A. Ces données suggèrent fortement que la phosphorylation de la S880 par la PKC est importante mais pas nécessaire pour l'ubiquitination de GluA2 induite par la PMA. Nos données supportent l'hypothèse que les sous unités GluA2 des récepteurs AMPA sont régulées par l'ubiquitination et la phosphorylation. Par ailleurs, il est connu que l'enzyme RNF167 est une des E3 ubiquitine ligases responsable de l'ubiquitination des AMPARs (Lussier et al., 2012). Pour tester l'implication de RNF167 dans l'ubiquitination de GluA2, les cellules HEK293T ont été co-transfectées avec les constructions de Flag-GluA2WT et HA-RNF167. Après une lyse dans des conditions dénaturantes et une IP avec les anticorps contre l'épitope Flag de GluA2, les protéines solubles ont été transférées sur membrane de PVDF. L'IB montre une augmentation significative de l'ubiquitination et la phosphorylation de la S880 en présence de RNF167 (Figure 3.8 b). Cela confirme que la sous-unité GluA2 est un substrat de la E3 ligase RNF167. Puisqu'on a montré l'implication de RNF167 est dans la voie d'ubiquitination de GluA2 et que la PMA augmente la phosphorylation de la sous unité GluA2 WT, notre hypothèse était que RNF167 est impliqué dans la voie d'ubiquitination dépendante de la PKC. Pour tester cette hypothèse, on a effectué le même test de transfection sur les cellules HEK293T en ajoutant la PMA (0.4 μ M, 10 min).

À la suite d'une IP α -Flag, un IB a été réalisée contre les protéines ubiquitinées, phosphorylées S880 et les étiquettes HA et Flag dans le lysat total et l'éluat. Les résultats montrent une forte augmentation de l'ubiquitination de GluA2 et de la p-S880 de la sous-unité GluA2WT en présence de RNF167 suite à l'application de la PMA (Figure 3.8 c). Il est intrigant d'observer que le traitement à la PMA mais pas la CHE apporte un changement dans le poids moléculaire de RNF167 (Figure 3.8 c et d) Ces résultats suggèrent que la PMA, et conséquemment la PKC activée, est

impliquée dans la régulation de la protéine RNF167 menant à une augmentation de son activité enzymatique d'ubiquitination de GluA2.

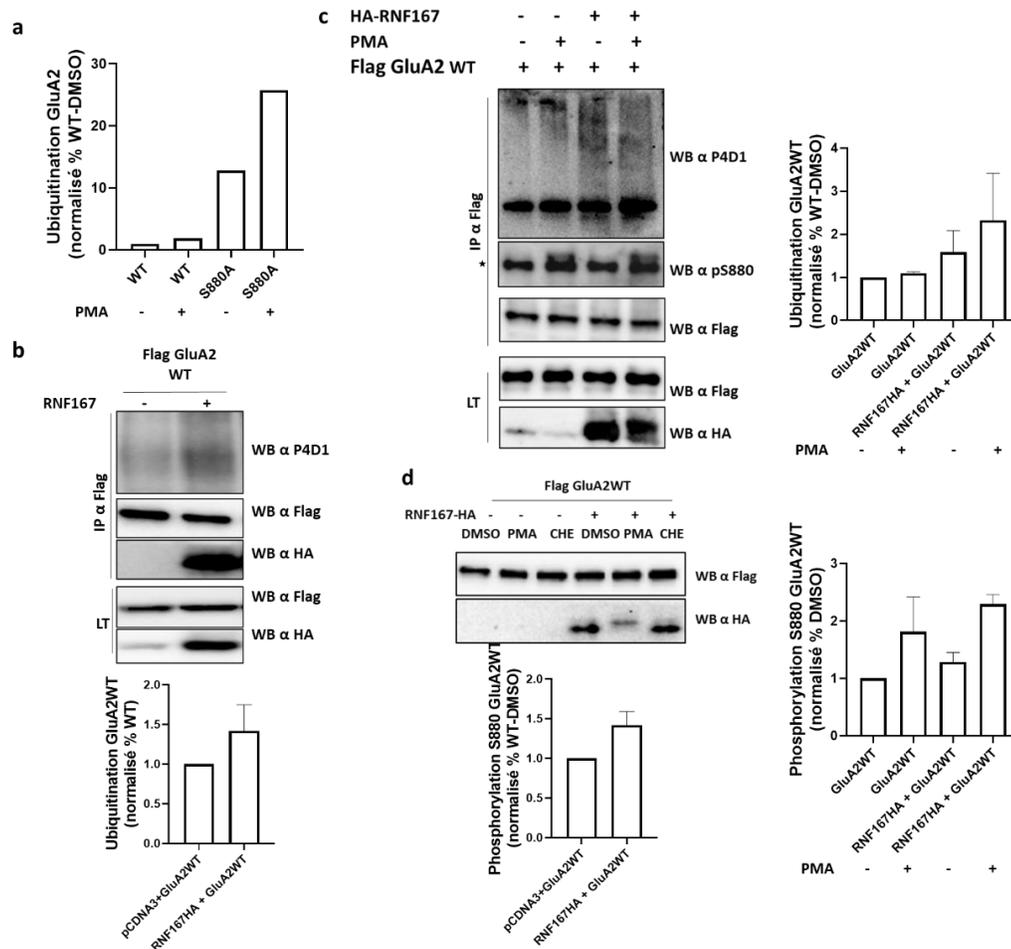


Figure 3.8: L'ubiquitination de GluA2 WT induite par la PMA est médiée par RNF167. (a-d) Les cellules HEK293T ont été (co)-transfectées avec les constructions HA-RNF167 et Flag GluA2 WT ou phospho-déficiente S880A (b) lysées directement ou (a, c et d) traitées avec DMSO (véhicule, contrôle), 0.4 μ M PMA pendant 10 min ou (d) 5 μ M CHE pendant 60 min à 37°C puis lysées dans des conditions dénaturantes. Les protéines GluA2 ont été immuno-précipitées avec des anticorps α -Flag puis analysées par IB en utilisant les anticorps contre l'Ub (P4D1) et p-S880. L'ensemble des données a été normalisé à la condition contrôle. Les données représentent la moyenne \pm SEM de 1-3 expériences indépendantes. * Bande non spécifique.

3.7 L'inhibition du lysosome par la chloroquine augmente l'ubiquitination de GluA2.

L'ubiquitination est une des grandes voies de dégradation de protéines chez les eucaryotes. Le lysosome est un organite impliqué dans la dégradation de ces protéines ubiquitinées notamment les AMPARs. L'accumulation de la chloroquine CQ, une base faible, mène à un changement du pH ce qui engendre une inhibition de l'activité des protéolyses au niveau des lysosomes (Al-Bari, 2015). Conséquemment, une altération de la machinerie du lysosome peut mener à une augmentation dans le niveau de GluA2 ubiquitinée. Pour tester cette hypothèse, on a traité les neurones pendant 60 min avec 25 μ M de l'inhibiteur lysosomal, la Chloroquine (CQ). D'après les résultats du test biochimique par IB fait sur les protéines extraites d'un lysat de cellules HEK293T transfectées avec un plasmide Flag GluA2WT, la CQ augmente significativement le taux de GluA2 WT ubiquitinées (Figure 3.9 a). Étant donné que l'activité catalytique des enzymes du lysosome est importante dans la dégradation des protéines ubiquitinées, nous avons testé l'effet de la chloroquine CQ sur GluA2 en présence de RNF167. Bien que la CQ et RNF167 augmentent séparément les taux de GluA2 ubiquitinées et phosphorylées, le traitement par la CQ sur les cellules HEK293T ne porte pas de changements significatifs sur le taux de modifications médiées par RNF167 (Figure 3.9 b). Cependant, on remarque une co-IP plus intense de RNF167 avec GluA2 en présence de CQ, suggérant que RNF167 est présent dans les mêmes vésicules que GluA2 destinée à dégradation dans les lysosomes. Pour déterminer si l'inhibition des protéolyses lysosomales a un effet sur le niveau d'expression membranaire de GluA2 nous avons procédé à une IF sur des neurones en cultures (Figure 3.2 a).

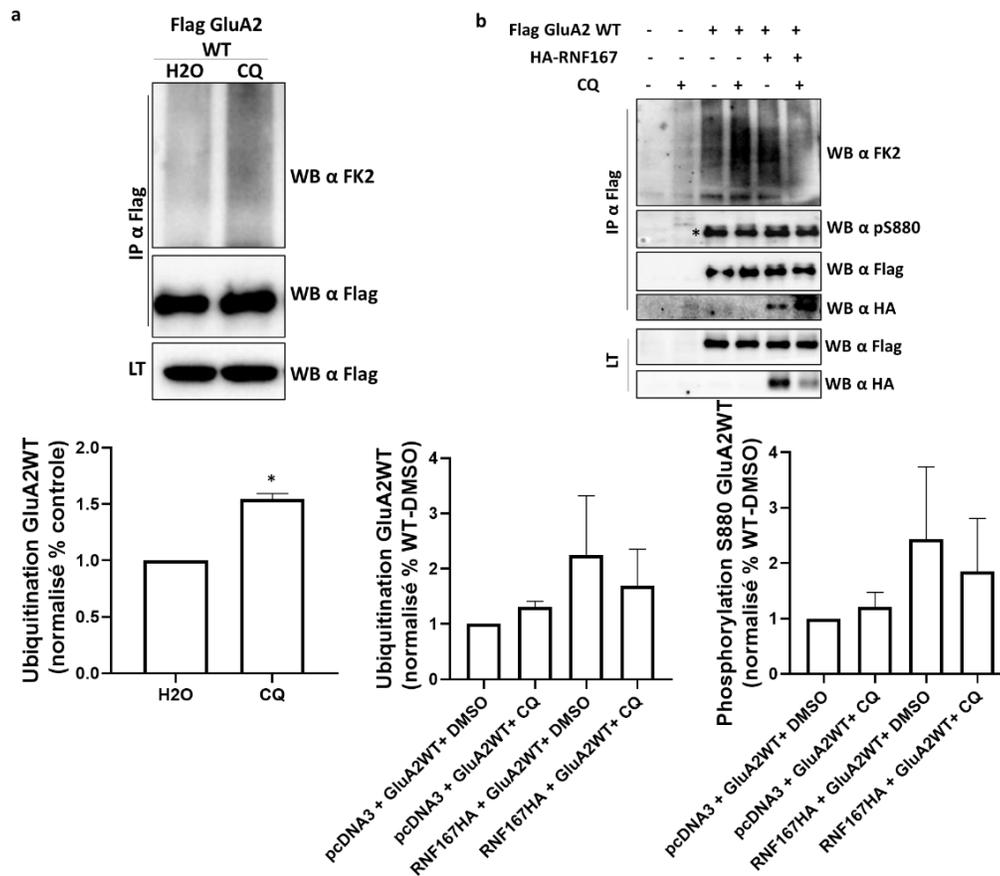


Figure 3.9: L'inhibition du lysosome par la chloroquine augmente l'accumulation de GluA2 ubiquitinée. Les cellules HEK293T ont été (a) transfectées avec les constructions Flag GluA2 WT (b) co-transfectés avec les constructions HA-RNF167 et Flag GluA2 WT puis traitées avec du H2O (véhicule, contrôle) ou 25 μ M Chloroquine (CQ) pendant 60 min à 37°C. Les protéines GluA2 ont été immuno-précipitées avec des anticorps α -Flag puis analysées par IB en utilisant les anticorps contre l'Ub (FK2) et p-S880. Les données représentent la moyenne \pm SEM de 2-3 expériences indépendantes. (Test de Student non apparié; * $p < 0.05$). *Bande non spécifique.

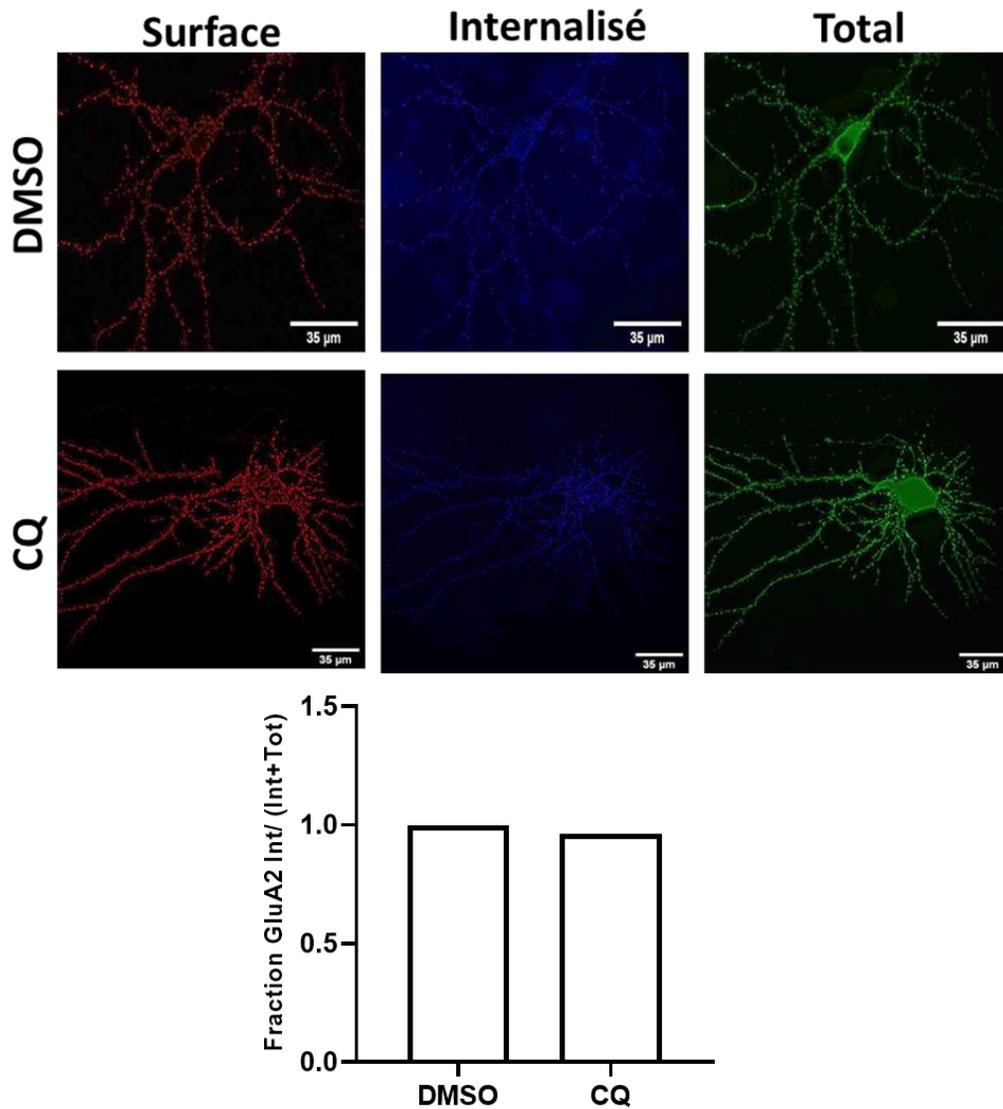


Figure 3.10: La chloroquine n'altère pas l'internalisation des GluA2 dans les neurones de cortex en culture primaire. Les neurones corticaux en culture DIV14 ont été transfectés avec la construction plasmidique Sep-GluA2WT puis traités avec DMSO (véhicule, contrôle) ou 25 μM Chloroquine (CQ) pendant 60min à 37°C. La quantité de GluA2 à la surface, internalisée et totale a été déterminé IF comme décrite dans la partie Matériels et Méthodes. Le niveau d'expression des récepteurs a été quantifié et le ratio d'internalisation est calculé (Internalisés/(Internalisés+Total)). L'ensemble des acquisitions a été fait par microscope à épifluorescence motorisé (Olympus IX83). Échelle 35μm. (n=1).

Le traitement à la CQ n'a aucun effet sur l'internalisation de GluA2 (Figure 3.10).

Collectivement ces résultats suggèrent que l'inhibition de la dégradation lysosomale induit une accumulation de la population de sous unité GluA2 à la fois ubiquitinée et phosphorylée

p-S880

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les récepteurs AMPA médient la transmission excitatrice rapide au niveau du SNC (Lussier et al., 2012). Ils s'impliquent largement dans la plasticité synaptique au niveau neuronal ainsi que la régulation du fonctionnement du cerveau (Malinow, 2003). Pour permettre une bonne fonctionnalité, les récepteurs AMPA subissent des processus qui contrôlent étroitement leur synthèse, modification, expression, routage ainsi que leur dégradation (Anggono and Huganir, 2012; Jurado, 2018; Lu and Roche, 2012). Les sous-unités GluA1 et GluA2 ont été caractérisées comme étant cibles de modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination (Lin et al., 2011a; Lussier et al., 2011). L'ubiquitination des AMPARs peut être médiée par différentes enzymes ligases UBE3 comme par exemple Nedd4-1, RNF 167 et APC^{Cdh1} (Widagdo et al., 2015). De plus, les sous-unités des récepteurs AMPA, notamment GluA2, peuvent accepter un groupement phosphate via des kinases comme la PKC, la CaMKII, la PKA et autres (Lu and Roche, 2012; Lussier et al., 2015; Park et al., 2016; Widagdo et al., 2015). Depuis l'identification des AMPARs comme protéines cibles de modifications par ubiquitination et phosphorylation, plusieurs études ont été réalisées afin de mieux comprendre l'implication de ces modifications dans la régulation de l'activité, du routage ainsi que l'expression membranaire de ces récepteurs. Une étude récente (Guntupalli et al., 2017) a montré que la phosphorylation de la sérine 845 par la PKC régule à la baisse l'ubiquitination

de la sous-unité GluA1. Or, peu d'études se sont intéressées à étudier l'inter-relation entre ces deux modifications au niveau de GluA2. Le but de cette étude était d'étudier la conséquence de la phosphorylation à la sérine 880, par la PKC, sur la régulation du niveau d'ubiquitination de la sous-unité GluA2.

La bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABAA (Johnston et al., 1972) permet le relargage du neurotransmetteur exciteur, la Glu, à partir des vésicules contenues dans les boutons synaptiques (Widagdo et al., 2017). Le Glu lie des récepteurs spécifiques comme les AMPARs et les NMDARs au niveau post-synaptique. La sensibilisation des récepteurs AMPA est considérablement plus rapide que celle des NMDAR mais l'affinité des récepteurs NMDA est beaucoup plus élevée pour le Glu que les récepteurs AMPA (Gielen, 2010). Ainsi, la liaison du Glu permet une activation plus lente mais plus durable des récepteurs NMDA et alors une diffusion importante des ions Ca^{2+} dans la cellule. Ce qu'on appelle la formation d'un potentiel postsynaptique exciteur (PPSE) (Foy et al., 1999). Cette activité synaptique résulte en une des modifications par ubiquitinations et phosphorylations de plusieurs protéines au niveau du DPS comme les AMPARs (Lussier et al., 2011). Ainsi, l'activation des NMDAR et AMPAR joue un rôle important dans la formation de la mémoire et l'apprentissage (Fox and Stryker, 2017; Ghosh, 2002). D'une part nos résultats montrent que le traitement des cultures neuronales avec la bic provoque une augmentation de l'ubiquitination de la sous-unité GluA2 sans affecter le niveau de phosphorylation de la sérine S880. D'autre part, l'activation chimique de la PKC par la PMA cause une augmentation de l'ubiquitination de GluA2 et de la phosphorylation de la S880. Bien que l'effet de la bic est plus remarquable que celui de la PMA seule, un pré-traitement à la PMA suivi par la bic augmente davantage le niveau l'ubiquitination de GluA2. On peut conclure que la PKC est impliquée dans la même voie de régulation de l'ubiquitination de GluA2 lors d'une augmentation de l'activité synaptique produite par la bic. Selon des études précédentes, l'application

de la bic sur des cultures neuronales était efficace pour provoquer l'augmentation de l'ubiquitination au niveau des AMPARs (Lussier et al., 2012; Widagdo et al., 2015). Cet effet est observé même après une courte incubation, de quelques minutes, des neurones avec 20 μ M de bic (Goo et al., 2015). Or, il est bien important que les neurones gardent un certain équilibre entre le phénomène de plasticité Hebbienne et celle homéostatique. Plus particulièrement, l'application de la bic, pendant quelques minutes ou allant à plusieurs heures, va induire une activation synaptique résultant en un relargage de Glu qui va permettre l'excitation du neurone. Nos résultats montrent que ce phénomène induit une augmentation de l'ubiquitination de GluA2. Bien que l'ubiquitination soit un processus biologique menant à la dégradation des protéines cibles, il est possible que la cellule se protège en déclenchant des mécanismes d'auto-stabilisation ou autrement dit de plasticité homéostatique. Ce mécanisme stabilise l'activité au niveau des synapses excitatrices, à la hausse ou la baisse selon le besoin (Turrigiano, 2012). Pour confirmer nos résultats, nous avons exercé un test d'IF sur des cultures neuronales. Selon certaines études faites sur des cultures neuronales, l'ubiquitination des AMPARs suite au traitement à la bic est un processus qui se produit après internalisation (Lussier et al., 2011). Selon nos résultats, l'ajout de la bic augmente le taux de GluA2 ubiquitinée. D'autre part, le traitement des neurones avec la bic augmente le taux de GluA2 internalisée. Ce qui confirme que l'activité synaptique induite par la bic stimule l'internalisation des AMPARs.

Dans le contexte de notre étude, nos conditions expérimentales ont vraisemblablement permis de découvrir la mise en place d'un mécanisme permettant à la cellule de se protéger contre une hausse excessive de la neurotransmission excitatrice de par l'internalisation et l'ubiquitination de GluA2. Dans des conditions mimant le processus de plasticité homéostatique, par exemple lors d'un traitement de 24h à la bicuculline, nous anticiperions que l'abondance de GluA2 soit réduite par une dégradation lysosomale dépendant de l'ubiquitine. Cette hypothèse pourrait être validée par des études futures.

Le coût élevé pour la culture neuronale étant initialement prohibitif, nous avons décidé d'utiliser les cellules embryonnaires humaines de rein, HEK293T, comme modèle d'étude. Au cours de la dernière décennie, ce modèle cellulaire a été utilisé dans plusieurs études faites sur les AMPARs (Gu et al., 2016; Lussier et al., 2012; Schmitz et al., 2017) et en particulier pour l'étude de l'ubiquitination des AMPARs (Lussier et al., 2012; Schmitz et al., 2017). La facilité de culture, la rapidité de croissance et la reproductibilité généralement élevée ont fait de ces cellules un outil populaire dans le domaine de recherche scientifique. En effet, les HEK 293T présentent une grande efficacité de transfection et une production protéique importante (Thomas and Smart, 2005). Ces cellules ne codent pas pour les sous-unités GluA1-4 des récepteurs AMPA (Seo et al., 2018). Par contre, la PKC est une protéine naturellement exprimée dans les cellules HEK 293T, ce qui permet donc de manipuler l'activité de la PKC par l'utilisation d'agent pharmacologiques tel que la PMA. Pour mieux comprendre le mécanisme auquel la PKC peut être impliquée dans la régulation de l'ubiquitination de la sous-unité GluA2, nous avons transfecté les cellules HEK 293T avec de l'ADN plasmidique de GluA2 sous sa forme sauvage ou phospho-mutante. Comme attendu, les résultats en HEK293T sont comparables à ceux obtenus en neurones. L'activation de la PKC par la PMA a mené à une augmentation du taux de GluA2 ubiquitinée dans les deux modèles cellulaires utilisés. Le niveau de S880 phosphorylée a aussi augmenté à la suite d'un court traitement avec la PMA. Ces données reproduisent nos résultats en culture neuronale et appuie d'idée d'inter-relation entre la phosphorylation par la PKC et l'ubiquitination de GluA2.

Selon l'étude de (Widagdo et al., 2015), l'agoniste AMPA induit une ubiquitination des résidus K850, 870 et 882 au niveau du C-terminal de GluA2. Nous nous sommes intéressés à savoir si la PKC régule l'ubiquitination de GluA2 au niveau d'un de ces résidus en particulier en utilisant les sous-unités GluA2 mutantes qui n'expriment

qu'une seule Lys active dans les cellules HEK293T. Nous avons remarqué que l'effet de la PMA n'est pas similaire sur les trois Lys. Selon nos résultats, la PMA augmente davantage la phosphorylation S880 et l'ubiquitination de GluA2 K850. À l'inverse, pour le mutant GluA2 K882, la PMA n'a pas réussi à induire l'ubiquitination mais plutôt la p-S880 a tout de même significativement augmentée. D'ailleurs, il a été démontré que la mutation K882A de GluA2 perturbe le site de reconnaissance de la PKC ce qui explique l'importance de ce résidu dans la possibilité d'augmentation de la p-S880 induite par la PMA (Kemp and Pearson, 1990). Aussi, l'activation de la PKC par la PMA n'entraîne pas l'ubiquitination de la K870. Conséquemment, nos résultats supportent que la PKC activée par la PMA induise l'ubiquitination au niveau du résidu K850 de GluA2.

Au niveau des cellules HEK293, la PKC a induit l'augmentation de l'ubiquitination et la phosphorylation de la forme sauvage de GluA2. Cependant, le résultat démontrant que la forme phospho-déficiente GluA2 S880A puisse être ubiquitinée à la suite de l'activation de la PKC par la PMA est intrigante. En fait, ces résultats ont modulé l'interprétation des données. La PMA semble être impliquée dans l'ubiquitination de la GluA2 S880A qui ne présente pas de site de phosphorylation. Ces résultats suggèrent fortement que la phosphorylation de la S880 est importante mais pas indispensable pour permettre l'ubiquitination de GluA2. Notre interprétation des résultats est fortement appuyée par un article publié très récemment (Widagdo et al., 2020) où l'ensemble de leurs travaux ont été faites sur des cultures neuronales. En effet, il est démontré dans cette étude que la phosphorylation de GluA2 S880 par la PKC est suffisante mais ne représente pas un facteur nécessaire dans la régulation à la hausse de l'ubiquitination de GluA2 induite par la bic. Puisque notre étude et celle de (Widagdo et al., 2020) suggèrent l'implication indirecte de la PKC dans l'ubiquitination de GluA2, nous avons soupçonné un rôle de la PKC sur les enzymes permettant l'ubiquitination de GluA2.

Jusqu'à présent, quatre enzymes E3 ligases ont été identifiées comme médiateur de l'ubiquitination des récepteurs AMPA. RNF167, une UBE3 ligase à domaine RING, est une de ces enzymes qui joue un rôle important dans la régulation de l'ubiquitination des AMPARs et conséquemment dans le contrôle de la neurotransmission médiée par les AMPARs (Lussier et al., 2012). Alors, nous avons décidé de tester si la stimulation de la PKC peut avoir un effet sur l'ubiquitination de GluA2 en présence de RNF167. Nos résultats démontrent qu'une co-expression de RNF167 dans les cellules HEK293T provoque une augmentation significativement des niveaux d'ubiquitination et de p-S880 de la sous-unité GluA2 WT. Alors que des expériences supplémentaires devront être réalisées dans le futur afin de comprendre le phénomène, nos résultats supportent l'hypothèse que RNF167 est impliquée dans le mécanisme impliquant indirectement la PKC dans l'ubiquitination de GluA2. De plus, l'application de la PMA n'a pas seulement induit des changements au niveau de la phosphorylation de la S880 de GluA2 mais aussi au niveau de RNF167. Nos données supportent que la PKC activée par la PMA pourrait être entre autre impliquée dans la phosphorylation de RNF167. En effet, les résultats du IB démontrent que chez les échantillons provenant de cellules traitées avec la PMA, la protéine HA-RNF167 a une mobilité électrophorétique moindre. Étant donné que PKC est une protéine cytosolique largement exprimée dans la cellule (Ringvold and Khalil, 2017) on suggère que la stimulation de la PKC par la PMA peut résulter en une modification de RNF167 par ajout d'un groupement phosphate. À cet effet, une analyse bio-informatique de RNF167 propose que le résidu S305 pourrait être la cible de phosphorylation par la PKC. Aussi, cette analyse prédictive suggère également que RNF167 puisse être phosphorylée par des kinases telles que CDK5 et GSK3. Néanmoins, cette phosphorylation peut potentiellement activer l'activité ligase de la RNF167 qui résulte en une augmentation dans le niveau d'ubiquitination des AMPARs notamment GluA2. Ces observations ouvrent des portes sur des investigations futures afin de mieux comprendre l'implication de la PKC dans la régulation de l'activité de l'enzyme RNF167. Par ailleurs, la chloroquine n'interfère

pas avec l'action de la PKC sur l'ubiquitination de GluA2 où les niveaux des modifications de GluA2 restent inchangés suite au traitement à la chloroquine en présence de RNF167. De plus l'inhibition de certaines protéases lysosomales par la chloroquine ne porte aucun changement dans le poids moléculaire de RNF167 mais l'application de la CQ augmente l'interaction de GluA2 avec RNF167. D'après les études faites auparavant, RNF167 peut se retrouver au niveau de la membrane plasmique et dans les vésicules endosomales et lysosomales (Lussier et al., 2012). Conséquemment, nos résultats suggèrent que l'activité de la PKC phosphorylerait RNF167 pour ubiquitiner les sous unités GluA2 à différents moments de leurs routages subcellulaires allant de la membrane synaptique jusqu'au lysosomes.

La sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA interagit via un motif à domaine PDZ de type II, avec différentes protéines à domaine PDZ dont PICK1. Plusieurs études ont montré l'implication de la protéine PICK1 dans la régulation des AMPARs. Cette interaction régule à la baisse l'expression membranaire des AMPARs contenant la sous-unité GluA2 (Lin and Huganir, 2007; Perez et al., 2001; Rocca et al., 2008). En effet, PICK1 facilite la machinerie d'internalisation des récepteurs en faisant un complexe avec la protéine adaptatrice AP-2 (Fiuza et al., 2017). PICK1 est également capable de se lier à l'isoforme PKC α pour faciliter son accès au niveau synaptique. La phosphorylation de la GluA2 S880 par la PKC augmente l'affinité de PICK1 envers GluA2 participant ainsi à son endocytose (Perez et al., 2001). L'ensemble de ces fonctions font de la protéine PICK1 un facteur important dans la régulation de la plasticité synaptique médiée par les AMPARs (Bissen et al., 2019; Makuch et al., 2011). Pour savoir si PICK1 est aussi impliquée dans la régulation des modifications post-traductionnelles de GluA2, nous avons testé l'effet de l'expression de PICK1 sur les niveaux d'ubiquitination et phosphorylation de la S880 de la sous-unité GluA2 dans les cellules HEK293T. Selon nos résultats, PICK1 lie la partie C-terminale et localise avec la sous-unité GluA2. Par ailleurs, l'interaction diminue les niveaux d'ubiquitination et de p-S880 de GluA2 WT. Pour s'assurer que cet effet est propre à

l'interaction entre GluA2 et PICK1, nous avons exprimé la forme mutante GluA2 I883 dont le motif de liaison PDZ est muté et ne permet pas la liaison de PICK1. L'absence de liaison à PICK1 n'affecte pas l'ubiquitination de GluA2 mutante qui montre des niveaux légèrement plus élevés que celle de la forme sauvage. On pense alors que le motif PDZ n'est pas impliqué dans la liaison intermédiaire de RNF167 à GluA2. Dans la littérature, PICK1 peut ralentir le recyclage membranaire des AMPARs en stabilisant leur rétention vésiculaire (Lin and Huganir, 2007). Cette fonction pourrait expliquer la diminution de GluA2 ubiquitinées en présence de PICK1 de par le fait que PICK1 aiguillerait GluA2 pour la voie de recyclage à la suite du retrait des Ub sur GluA2.

Le traitement des cultures neuronales avec FSC231, un inhibiteur du domaine PDZ de PICK1, semble diminuer dans le taux de GluA2 internalisées. De plus, les tests biochimiques en cultures neuronales reflètent une diminution dans l'ubiquitination de GluA2 mais pas la p-S880 en présence de cet inhibiteur. Les résultats montrent aussi que même l'application de la bic à la suite d'un traitement avec la FSC231 n'a pas réussi à contrecarrer l'effet de l'inhibition de PICK1. Comme il a déjà été démontré que PICK1 facilite l'internalisation des AMPARs (Fiuza et al., 2017) et que l'ubiquitination induite par la bic est un processus post-internalisation (Lussier et al., 2011), on pense que l'interaction de PICK1 avec GluA2 se produit au niveau membranaire. Cette interaction favorise l'internalisation de GluA2 qui subit des modifications par ubiquitination post-endocytose. De plus, on suggère que la phosphorylation de la sérine 880 est indépendante de l'interaction de GluA2 à PICK1. Le queue C-terminale de GluA2 présente une séquence d'acide aminé (KRMKVAKNP) à laquelle la protéine AP-2 peut se lier. L'interaction entre GluA2 avec AP-2 facilite l'internalisation des AMPARs (Ohno, 2006). Sachant que la mutation R845A dans GluA2 bloque la liaison de AP-2 (Joels and Lamprecht, 2010) et par conséquent l'endocytose, nous avons testé l'effet de la PMA sur l'ubiquitination de la sous-unité GluA2 mutante. Étrangement, le niveau

d'ubiquitination de GluA2 R845A dans les conditions basales est plus élevé que celle de la forme sauvage mais équivalente à l'ubiquitination de GluA2 WT induite par l'application de la PMA. Bien que ces résultats ne semblent pas cohérents avec les résultats précédents qui montrent que l'ubiquitination est un processus post-intériorisation, nous ne pouvons pas encore exclure la possibilité que GluA2 soit ubiquitiné pendant son l'insertion de GluA2 dans une vésicule tapissée de clathrine. Pour pouvoir mieux comprendre la cause de ce phénomène, une meilleure résolution temporelle, de même que de meilleurs outils moléculaires et pharmacologiques seraient nécessaire pour découvrir la raison de nos observations.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, cette étude a démontré une implication de la voie de signalisation dépendante de la PKC dans la régulation de l'ubiquitination de la sous unité GluA2 des AMPARs. L'enzyme RNF167 est un facteur important dans cette voie de régulation. Nous proposons un modèle d'étude qui explique cette voie de régulation. L'activation pharmacologique de la PKC par la PMA stimule d'une façon directe la phosphorylation de la S880. Indirectement, PMA peut activer la PKC qui à son tour modifie RNF167, par phosphorylation, résultant en une augmentation de son activité enzymatique. Cette activation induit une hausse de l'ubiquitination de GluA2 notamment au niveau de la lysine 850. De plus l'ubiquitination de la K850 peut avoir un effet synergique sur la phosphorylation de la S880. Une fois ubiquitiné, les AMPARs seront envoyés à dégradation au niveau du lysosome. Nos résultats appuient que l'ubiquitination est un phénomène post-endocytaire. De plus, nos résultats appuient sur l'importance de la protéine PICK1 dans l'internalisation des AMPARs. Dans les études futures, il sera intéressant d'investir plus dans l'étude de l'effet de PKC sur RNF167 pour déterminer les sites de phosphorylation, ce qui serait un mécanisme novateur menant à l'ubiquitination des AMPARs.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, L.F., and S.B. Nelson. 2000. Synaptic plasticity: taming the beast. *Nature Neuroscience*. 3:1178-1183.
- Ahmed, S.M., B.A. Rzigalinski, K.A. Willoughby, H.A. Sitterding, and E.F. Ellis. 2000. Stretch-induced injury alters mitochondrial membrane potential and cellular ATP in cultured astrocytes and neurons. *Journal of Neurochemistry*. 74:1951-1960.
- Akutsu, M., I. Dikic, and A. Bremm. 2016. Ubiquitin chain diversity at a glance. *Journal of Cell Science*. 129:875.
- Al-Bari, M.A.A. 2015. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 70:1608-1621.
- Ammendrup-Johnsen, I., T.S. Thorsen, U. Gether, and K.L. Madsen. 2012. Serine 77 in the PDZ Domain of PICK1 Is a Protein kinase C α phosphorylation site regulated by lipid membrane binding. *biochemistry*. 51:586-596.
- Anggono, V., and R.L. Huganir. 2012. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. 22:461-469.
- Anggono, V., Y. Koç-Schmitz, J. Widagdo, J. Kormann, A. Quan, C.-M. Chen, P.J. Robinson, S.-Y. Choi, D.J. Linden, M. Plomann, and R.L. Huganir. 2013. PICK1 interacts with PACSIN to regulate AMPA receptor internalization and cerebellar long-term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110:13976.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.-J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 18:767-811.
- Barkovich, A.J., R. Guerrini, R.I. Kuzniecky, G.D. Jackson, and W.B. Dobyns. 2012. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain*. 135:1348-1369.

- Bashir, Z.I., Z.A. Bortolotto, C.H. Davies, N. Berretta, A.J. Irving, A.J. Seal, J.M. Henley, D.E. Jane, J.C. Watkins, and G.L. Collingridge. 1993. Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature*. 363:347-350.
- Bassani, S., A. Folci, J. Zapata, and M. Passafaro. 2013. AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70:4411-4430.
- Baulieu, E. 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Progress in Hormone Research*. 52:1-32.
- Behrends, J.C. 2000. Modulation by bicuculline and penicillin of the block by t-butyl-bicyclo-phosphorothionate (TBPS) of GABA(A)-receptor mediated Cl(-)-current responses in rat striatal neurones. *British Journal of Pharmacology*. 129:402-408.
- Bernard, P.B., A.M. Castano, K.U. Bayer, and T.A. Benke. 2014. Necessary, but not sufficient: insights into the mechanisms of mGluR mediated long-term depression from a rat model of early life seizures. *Neuropharmacology*. 84:1-12.
- Bertram, E.H. 1997. Functional anatomy of spontaneous seizures in a rat model of limbic epilepsy. *Epilepsia*. 38:95-105.
- Bissen, D., F. Foss, and A. Acker-Palmer. 2019. AMPA receptors and their minions: auxiliary proteins in AMPA receptor trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 76:2133-2169.
- Blanke, M.L., and A.M. VanDongen. 2008. 13 Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. *Biology of the NMDA Receptor*:283.
- Boase, N.A., and S. Kumar. 2015. NEDD4: The founding member of a family of ubiquitin-protein ligases. *Gene*. 557:113-122.
- Boehm, J., M.-G. Kang, R.C. Johnson, J. Esteban, R.L. Huganir, and R. Malinow. 2006. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron*. 51:213-225.
- Bories, J. 1996. Le crane humain: Ostéologie-Anatomie radiologique.
- Bowie, D. 2012. Redefining the classification of AMPA-selective ionotropic glutamate receptors. *The Journal of Physiology*. 590:49-61.

- Bredt, D.S., and R.A. Nicoll. 2003. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron*. 40:361-379.
- Bromley, S.K., W.R. Burack, K.G. Johnson, K. Somersalo, T.N. Sims, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen, and M.L. Dustin. 2001. The Immunological Synapse. *Annual Review of Immunology*. 19:375-396.
- Callis, J. 2014. The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *Arabidopsis Book*. 12:e0174-e0174.
- Chakraborty, J., V. Basso, and E. Ziviani. 2017. Post translational modification of Parkin. *Biology Direct*. 12:6-6.
- Chronister, R., and L. White. 1975. Fiberarchitecture of the hippocampal formation: anatomy, projections, and structural significance. In *The hippocampus*. Springer. 9-39.
- Chung, H.J., J. Xia, R.H. Scannevin, X. Zhang, and R.L. Huganir. 2000. Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *The Journal of Neuroscience*. 20:7258- 7267.
- Citri, A., S. Bhattacharyya, C. Ma, W. Morishita, S. Fang, J. Rizo, and R.C. Malenka. 2010a. Calcium binding to PICK1 is essential for the intracellular retention of AMPA receptors underlying long-term depression. *The Journal of Neuroscience*. 30:16437- 16452.
- Clague, M.J., and S. Urbé. 2010. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*. 143:682-685.
- Clark, B.A., and S.G. Cull-Candy. 2002. Activity-dependent recruitment of extrasynaptic NMDA receptor activation at an AMPA receptor-only synapse. *The Journal of Neuroscience*. 22:4428-4436.
- Clifton, N.E., S. Trent, K.L. Thomas, and J. Hall. 2019. Regulation and function of activity-dependent homer in synaptic plasticity. *Molecular Neuropsychiatry*. 5:147- 161.
- Cochilla, A.J., and S. Alford. 1999. NMDA receptor-mediated control of presynaptic calcium and neurotransmitter release. *The Journal of Neuroscience*. 19:193-205.
- Cohen, P. 2002. Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nature reviews Drug discovery*. 1:309-315.

- Coombs, I.D., and S.G. Cull-Candy. 2009. Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins and AMPA receptor function in the cerebellum. *Neuroscience*. 162:656-665.
- Cull-Candy, S., L. Kelly, and M. Farrant. 2006. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Current Opinion in Neurology*. 16:288-297.
- De Bie, P., and A. Ciechanover. 2011. Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Cell Death and Differentiation*. 18:1393-1402.
- Deshar, R., S. Moon, W. Yoo, E.B. Cho, S.K. Yoon, and J.B. Yoon. 2016. RNF 167 targets Arl8B for degradation to regulate lysosome positioning and endocytic trafficking. *The FEBS journal*. 283:4583-4599.
- Diering, G.H., and R.L. Huganir. 2018. The AMPA Receptor code of synaptic plasticity. *neuron*. 100:314-329.
- Dikic, I., S. Wakatsuki, and K.J. Walters. 2009. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10:659-671.
- Dong, H., R.J. O'Brien, E.T. Fung, A.A. Lanahan, P.F. Worley, and R.L. Huganir. 1997. GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature*. 386:279-284.
- Dubiel, W., and C. Gordon. 1999. Ubiquitin pathway: another link in the polyubiquitin chain? *Current Biology*. 9:R554-R557.
- Ebner, P., G.A. Versteeg, and F. Ikeda. 2017. Ubiquitin enzymes in the regulation of immune responses. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 52:425-460.
- Endicott, J.A., M.E. Noble, and L.N. Johnson. 2012. The structural basis for control of eukaryotic protein kinases. *Annual Review of Biochemistry*. 81:587-613.
- Fagg, G., and A. Foster. 1983. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience*. 9:701-719.
- Fiuza, M., C.M. Rostosky, G.T. Parkinson, A.M. Bygrave, N. Halemani, M. Baptista, I. Milosevic, and J.G. Hanley. 2017. PICK1 regulates AMPA receptor endocytosis via direct interactions with AP2 α -appendage and dynamin. *Journal of Cell Biology*. 216:3323-3338.

- Foy, M., J. Xu, X. Xie, R. Brinton, R. Thompson, and T. Berger. 1999. 17β -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *Journal of Neurophysiology*. 81:925-929.
- Fox, K., and M. Stryker. 2017. Integrating Hebbian and homeostatic plasticity: introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 372:20160413.
- Gaidarov, I., and J.H. Keen. 1999. Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *The Journal of Cell Biology*. 146:755-764.
- Gaits-Iacovoni, F. 1995. Intervention de protéine tyrosine phosphatases dans l'inhibition de contact des cellules endothéliales et dans l'activation de cellules mégacaryoblastiques. Toulouse 3.
- Ghosh, A. 2002. Learning more about NMDA receptor regulation. *Science*. 295:449-451.
- Gielen, M. 2010. Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate-Des protéines responsables de la transmission synaptique excitatrice. *Médecine/Sciences*. 26:65-72.
- Goo, M.S., S.L. Scudder, and G.N. Patrick. 2015. Ubiquitin-dependent trafficking and turnover of ionotropic glutamate receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 8:60-60.
- Grice, G.L., and J.A. Nathan. 2016. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 73:3497-3506.
- Gu, X., X. Mao, M.P. Lussier, M.A. Hutchison, L. Zhou, F.K. Hamra, K.W. Roche, and W. Lu. 2016. GSG1L suppresses AMPA receptor-mediated synaptic transmission and uniquely modulates AMPA receptor kinetics in hippocampal neurons. *Nature Communications*. 7:10873-10873.
- Gukovskaya, A.S., and V.P. Zinchenko. 1990. Mechanisms of receptor-mediated generation of ionic signals in rat thymocytes and ehrlich ascites tumor cells. Harwood Academic Publishers.
- Guntupalli, S., S.E. Jang, T. Zhu, R.L. Haganir, J. Widagdo, and V. Anggono. 2017. GluA1 subunit ubiquitination mediates amyloid- β -induced loss of surface α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 292:8186-8194.

- Haas, A.L., J.V. Warme, A. Hershko, and I.A. Rose. 1982. Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *Journal of Biological Chemistry*. 257:2543-2548.
- Hackett, J.T., and T. Ueda. 2015. Glutamate release. *Neurochemical Research*.40:2443-2460.
- Haroon, E., A.H. Miller, and G. Sanacora. 2017. Inflammation, glutamate, and glia: a trio of trouble in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 42:193-215.
- Henley, J.M., and K.A. Wilkinson. 2016. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 17:337-350.
- Herring, B.E., and R.A. Nicoll. 2016. Kalirin and Trio proteins serve critical roles in excitatory synaptic transmission and LTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 113:2264- 2269.
- Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nature reviews Molecular Cell Biology*. 2:195-201.
- Huang, D.T., H.W. Hunt, M. Zhuang, M.D. Ohi, J.M. Holton, and B.A. Schulman. 2007. Basis for a ubiquitin-like protein thioester switch toggling E1–E2 affinity. *Nature*. 445:394-398.
- Kuang, K.-P. 1989. The mechanism of protein kinase C activation. *Trends in Neurosciences*. 12:425-432.
- Huber, L.A., and D. Teis. 2016. Lysosomal signaling in control of degradation pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. 39:8-14.
- Huganir, R., and R. Nicoll. 2013a. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*. 80:704-717.
- Hurley, J.H., S. Lee, and G. Prag. 2006. Ubiquitin-binding domains. *Biochemistry J*.399:361-372.
- Jackson, L.P., B.T. Kelly, A.J. McCoy, T. Gaffry, L.C. James, B.M. Collins, S. Höning, P.R. Evans, and D.J. Owen. 2010. A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell*. 141:1220-1229.
- Jessen, K.R., R. Mirsky, and A.C. Lloyd. 2015. Schwann Cells: Development and role in nerve repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7:a020487-a020487.

- Joels, G., and R. Lamprecht. 2010. Interaction between N-ethylmaleimide-sensitive factor and GluR2 is essential for fear memory formation in lateral amygdala. *The Journal of Neuroscience*. 30:15981-15986.
- Johns, T.G., and C.C. Bernard. 1999. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Journal of Neurochemistry*. 72:1-9.
- Johnston, G., P. Beart, D. Curtis, C. Game, R. McCulloch, and R. Maclachlan. 1972. Bicuculline methochloride as a GABA antagonist. *Nature New Biology*. 240:219-220.
- Jonas, P., and N. Burnashev. 1995. Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron*. 15:987-990.
- Jones, L.H. 2018. Small-molecule kinase downregulators. *Cell Chemical Biology*. 25:30-35.
- Julien, J.-P. 2000. Le transport axonal des neurofilaments et pathologie neurodégénérative.
- Jurado, S. 2018. AMPA Receptor Trafficking in Natural and Pathological Aging. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10:446-446.
- Kamiguchi, H., K.E. Long, M. Pendergast, A.W. Schaefer, I. Rapoport, T. Kirchhausen, and V. Lemmon. 1998. The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *The Journal of Neuroscience*. 18:5311-5321.
- Kashyap, M.K., and O. Abdel-Rahman. 2018. Expression, regulation and targeting of receptor tyrosine kinases in esophageal squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*. 17:54-54.
- Kastning, K., V. Kukhtina, J.T. Kittler, G. Chen, A. Pechstein, S. Enders, S.H. Lee, M. Sheng, Z. Yan, and V. Haucke. 2007. Molecular determinants for the interaction between AMPA receptors and the clathrin adaptor complex AP-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 104:2991-2996.
- Kemp, B.E., and R.B. Pearson. 1990. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends in Biochemical Sciences*. 15:342-346.
- Kennedy, M.B. 1997. The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends in Neurosciences*. 20:264-268.
- Kennedy, M.J., and M.D. Ehlers. 2011. Mechanisms and function of dendritic

- exocytosis. *Neuron*. 69:856-875.
- Kessels, H.W., C.D. Kopec, M.E. Klein, and R. Malinow. 2009. Roles of stargazin and phosphorylation in the control of AMPA receptor subcellular distribution. *Nature Neuroscience*. 12:888-896.
- Kia-Ki, H., and A. Martinage. 1992. Post-translational chemical modification (s) of proteins. *International Journal of Biochemistry*. 24:19-28.
- Kikuchi, R., K. Nakamura, S. MacLauchlan, D.T.-M. Ngo, I. Shimizu, J.J. Fuster, Y. Katanasaka, S. Yoshida, Y. Qiu, T.P. Yamaguchi, T. Matsushita, T. Murohara, N. Gokce, D.O. Bates, N.M. Hamburg, and K. Walsh. 2014. An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nature Medicine*. 20:1464-1471.
- Kim, E.C., M.J. Lee, S.Y. Shin, G.H. Seol, S.H. Han, J. Yee, C. Kim, and S.S. Min. 2013. Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Enhances Long-Term Potentiation in the Hippocampus through Activation of Protein Kinase C δ and ϵ . *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 17:51-56.
- Kirisako, T., K. Kamei, S. Murata, M. Kato, H. Fukumoto, M. Kanie, S. Sano, F. Tokunaga, K. Tanaka, and K. Iwai. 2006. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO Journal*. 25:4877-4887.
- Koh, D.S., J.R. Geiger, P. Jonas, and B. Sakmann. 1995. Ca²⁺-permeable AMPA and NMDA receptor channels in basket cells of rat hippocampal dentate gyrus. *The Journal of physiology*. 485:383-402.
- KREBS, E.G. 1972. Protein kinases. In *Current Topics In Cellular Regulation*. Vol. 5. Elsevier. 99-133.
- Lee, C.S., J. Baek, and S.-Y. Han. 2017. The Role of Kinase Modulators in Cellular Senescence for Use in Cancer Treatment. *Molecules*. 22:1411.
- Lee, S.H., A. Simonetta, and M. Sheng. 2004. Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron*. 43:221-236.
- Lee, S., S. Park, H. Lee, S. Han, J.-M. Song, D. Han, and Y.H. Suh. 2019. Nedd4 E3 ligase and beta-arrestins regulate ubiquitination, trafficking, and stability of the mGlu7 receptor. *Elife*. 8:e44502.
- Lee, S.H., L. Liu, Y.T. Wang, and M. Sheng. 2002. Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron*. 36:661-674.

- Lee, S.H., A. Simonetta, and M. Sheng. 2004. Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron*. 43:221-236.
- Li, Y.-H., N. Zhang, Y.-N. Wang, Y. Shen, and Y. Wang. 2016. Multiple faces of protein interacting with C kinase 1 (PICK1): structure, function, and diseases. *Neurochemistry International*. 98:115-121.
- Lin, A., Q. Hou, L. Jarzylo, S. Amato, J. Gilbert, F. Shang, and H.-Y. Man. 2011a. Nedd4-mediated AMPA receptor ubiquitination regulates receptor turnover and trafficking. *Journal of Neurochemistry*. 119:27-39.
- Lin, D.-T., and R.L. Huganir. 2007. PICK1 and phosphorylation of the glutamate receptor 2 (GluR2) AMPA receptor subunit regulates GluR2 recycling after NMDA receptor-induced internalization. *The Journal of Neuroscience*. 27:13903- 13908.
- Lin, D.-T., Y. Makino, K. Sharma, T. Hayashi, R. Neve, K. Takamiya, and R.L. Huganir. 2009. Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nature Neuroscience*. 12:879-887.
- Lu, W., and K.W. Roche. 2012. Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Current Opinion in Neurobiology*. 22:470-479.
- Lussier, M.P., Y. Nasu-Nishimura, and K.W. Roche. 2011. Activity-dependent ubiquitination of the AMPA receptor subunit GluA2. *The Journal of Neuroscience*. 31:3077- 3081.
- Lussier, M.P., B.E. Herring, Y. Nasu-Nishimura, A. Neutzner, M. Karbowski, R.J. Youle, R.A. Nicoll, and K.W. Roche. 2012. Ubiquitin ligase RNF167 regulates AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109:19426-19431.
- Lussier, M.P., A. Sanz-Clemente, and K.W. Roche. 2015. Dynamic regulation of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) and α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) receptors by posttranslational modifications. *Journal of Biological Chemistry*. 290:28596-28603.
- Lv, Z., L. Yuan, J.H. Atkison, G. Aldana-Masangkay, Y. Chen, and S.K. Olsen. 2017. Domain alternation and active site remodeling are conserved structural features of ubiquitin E1. *Journal of Biological Chemistry*. 292:12089-12099.
- MacDonald, C., N.J. Buchkovich, D.K. Stringer, S.D. Emr, and R.C. Piper. 2012. Cargo ubiquitination is essential for multivesicular body intraluminal vesicle formation. *EMBO Reports*. 13:331-338.

- Makuch, L., L. Volk, V. Anggono, R.C. Johnson, Y. Yu, K. Duning, J. Kremerskothen, J. Xia, K. Takamiya, and R.L. Huganir. 2011. Regulation of AMPA receptor function by the human memory-associated gene KIBRA. *Neuron*. 71:1022- 1029.
- Malinow, R. 2003. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 358:707-714.
- Mao, L.-M., B. Xue, D.-Z. Jin, and J.Q. Wang. 2015. Dynamic increases in AMPA receptor phosphorylation in the rat hippocampus in response to amphetamine. *Journal of Neurochemistry*. 133:795-805.
- Martin, J., K. Anamika, and N. Srinivasan. 2010. Classification of protein kinases on the basis of both kinase and non-kinase regions. *PLoS One*. 5:e12460-e12460.
- Matsuda, S., W. Kakegawa, T. Budisantoso, T. Nomura, K. Kohda, and M. Yuzaki. 2013. Stargazin regulates AMPA receptor trafficking through adaptor protein complexes during long-term depression. *Nature Communications*. 4:1-15.
- McCormick, D.A. 1989. GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*. 62:1018-1027.
- McNally, E.K., M.A. Karim, and C.L. Brett. 2017. Selective lysosomal transporter degradation by organelle membrane fusion. *Developmental Cell*. 40:151-167.
- Meldrum, B.S. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*. 130:1007S-1015S.
- Metzger, M.B., V.A. Hristova, and A.M. Weissman. 2012. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of Cell Science*. 125:531-537.
- Metzger, M.B., J.N. Pruneda, R.E. Klevit, and A.M. Weissman. 2014. RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1843:47-60.
- Molnár, Z., G.J. Clowry, N. Šestan, A. Alzu'bi, T. Bakken, R.F. Hevner, P.S. Hüppi, I. Kostović, P. Rakic, E.S. Anton, D. Edwards, P. Garcez, A. Hoerder-Suabedissen, and A. Kriegstein. 2019. New insights into the development of the human cerebral cortex. *Journal of Anatomy*. 235:432-451.
- Muller, S. 1992. Place et rôle de l'ubiquitine dans le développement de l'auto-immunité au cours de la maladie lupique.

- Nayak, A., D.J. Zastrow, R. Lickteig, N.R. Zahniser, and M.D. Browning. 1998. Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. *Nature*. 394:680-683.
- Nelson, N. 1993. Presynaptic events involved in neurotransmission. *Journal of Physiology-Paris*. 87:171-178.
- Newton, A.C. 2018. Protein kinase C as a tumor suppressor. *Seminars in Cancer Biology*. 48:18- 26.
- Nijman, S.M., M.P. Luna-Vargas, A. Velds, T.R. Brummelkamp, A.M. Dirac, T.K. Sixma, and R. Bernards. 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*. 123:773-786.
- Noori, H.R., L.H. Mervin, V. Bokharaie, Ö. Durmus, L. Egenrieder, S. Fritze, B. Gruhlke, G. Reinhardt, H.-H. Schabel, S. Staudenmaier, N.K. Logothetis, A. Bender, and R. Spanagel. 2018. Systemic neurotransmitter responses to clinically approved and experimental neuropsychiatric drugs. *Nature Communications*. 9:4699-4699.
- O'Connor, J.J., M.J. Rowan, and R. Anwyl. 1995. Tetanically induced LTP involves a similar increase in the AMPA and NMDA receptor components of the excitatory postsynaptic current: investigations of the involvement of mGlu receptors. *The Journal of Neuroscience*. 15:2013-2020.
- Ohno, H. 2006. Physiological roles of clathrin adaptor ap complexes: lessons from mutant animals. *The Journal of Biochemistry*. 139:943-948.
- Okabe, S., K. Forsberg-Nilsson, A.C. Spiro, M. Segal, and R.D. McKay. 1996. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mechanisms of Development*. 59:89-102.
- Paleotti, O., E. Macia, F. Luton, S. Klein, M. Partisani, P. Chardin, T. Kirchhausen, and M. Franco. 2005. The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 280:21661-21666.
- Park, J. 2018. Phosphorylation of the AMPAR-TARP Complex in synaptic plasticity.proteomes. 6:40.
- Park, J., A.E. Chávez, Y.S. Mineur, M. Morimoto-Tomita, S. Lutz, K.S. Kim, M.R. Picciotto, P.E. Castillo, and S. Tomita. 2016. CaMKII phosphorylation of TARPy-8 is a mediator of LTP and learning and memory. *Neuron*. 92:75-83.
- Park, M., E.C. Penick, J.G. Edwards, J.A. Kauer, and M.D. Ehlers. 2004. Recycling

- endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science*. 305:1972-1975.
- Park, S.Y., and X. Guo. 2014. Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Bioscience Reports*. 34:e00123.
- Parkinson, G.T., and J.G. Hanley. 2018. Mechanisms of AMPA receptor endosomal sorting. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11:440-440.
- Patriarchi, T., O.R. Buonarati, and J.W. Hell. 2018. Postsynaptic localization and regulation of AMPA receptors and Cav1.2 by β 2 adrenergic receptor/PKA and Ca(2+)/CaMKII signaling. *EMBO Journal*. 37:e99771.
- Kawson, T., and P. Nash. 2000. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes & Development*. 14:1027-1047.
- Pappa, H., J. Murray-Rust, L. Dekker, P. Parker, and N. McDonald. 1998. Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C- δ . *Structure*. 6:885-894.
- Perez, J.L., L. Khatri, C. Chang, S. Srivastava, P. Osten, and E.B. Ziff. 2001. PICK1 targets activated protein kinase C α to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. *Journal of Neuroscience*. 21:5417-5428.
- Pickart, C.M. 2001a. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry*. 70:503-533.
- Pickart, C.M., and I.A. Rose. 1985. Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 260:1573-1581.
- Pita-Almenar, J.D., S. Zou, C.M. Colbert, and A. Eskin. 2012. Relationship between increase in astrocytic GLT-1 glutamate transport and late-LTP. *Learning & Memory*. 19:615-626.
- Pow, D., and S. Robinson. 1994. Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. *Neuroscience*. 60:355-366.
- Prybylowski, K., K. Chang, N. Sans, L. Kan, S. Vicini, and R.J. Wenthold. 2005. The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron*. 47:845-857.
- Purkey, A.M., and M.L. Dell'Acqua. 2020. Phosphorylation-dependent regulation of Ca(2+)-permeable AMPA receptors during hippocampal synaptic plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 12:8-8.

- Qiu, J., and Z.-Q. Luo. 2017. Hijacking of the Host Ubiquitin network by legionella pneumophila. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7.
- Rakic, P. 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nature Reviews Neuroscience*. 10:724-735.
- Redini-Del Negro, C. 1992. Changements d'efficacité synaptique dans l'hippocampe induits par un apprentissage associatif: mécanismes neurochimiques et rôle fonctionnel dans la mémorisation. Paris 6.
- Rizo, J. 2018. Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. *Protein Sci*. 27:1364-1391.
- Robert, A., and J.R. Howe. 2003. How AMPA receptor desensitization depends on receptor occupancy. *The Journal of Neuroscience*. 23:847-858.
- Rocca, D.L., S. Martin, E.L. Jenkins, and J.G. Hanley. 2008. Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. *Nature Cell Biology*. 10:259-271.
- Rodemer, C., and V. Haucke. 2008. Clathrin/AP-2-dependent endocytosis: a novel playground for the pharmacological toolbox? In *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets*. Springer. 105-122.
- Ross, M.E., and C.A. Walsh. 2001. Human brain malformations and their lessons for neuronal migration. *Annual Review of Neuroscience*. 24:1041-1070.
- Roxo, M.R., P.R. Franceschini, C. Zubarán, F.D. Kleber, and J.W. Sander. 2011. The limbic system conception and its historical evolution. *Scientific World Journal*. 11:2428-2441.
- Rozov, A., and N. Burnashev. 1999. Polyamine-dependent facilitation of postsynaptic AMPA receptors counteracts paired-pulse depression. *Nature*. 401:594-598.
- Rudge, S.A., and M.J. Wakelam. 2013. SnapShot: Lipid kinases and phosphatases. *Cell*. 155:1654-1654. e1651.
- Schmitz, L.J.M., R.V. Klaassen, M. Ruiperez-Alonso, A.E. Zamri, J. Stroeder, P. Rao- Ruiz, J.C. Lodder, R.J. van der Loo, H.D. Mansvelder, A.B. Smit, and S. Spijker. 2017. The AMPA receptor-associated protein Shisa7 regulates hippocampal synaptic function and contextual memory. *Elife*. 6:e24192.
- Schulman, B.A., and J.W. Harper. 2009. Ubiquitin-like protein activation by E1

- enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10:319-331.
- Schwarz, L.A., B.J. Hall, and G.N. Patrick. 2010. Activity-dependent ubiquitination of GluA1 mediates a distinct AMPA receptor endocytosis and sorting pathway. *The Journal of Neuroscience*. 30:16718-16729.
- Sengmany, K., and K.J. Gregory. 2016. Metabotropic glutamate receptor subtype 5: molecular pharmacology, allosteric modulation and stimulus bias. *British Journal of Pharmacology*. 173:3001-3017.
- Seo, B.A., T. Cho, D.Z. Lee, J.-J. Lee, B. Lee, S.-W. Kim, H.-S. Shin, and M.-G. Kang. 2018. LARGE, an intellectual disability-associated protein, regulates AMPA- type glutamate receptor trafficking and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 115:7111-7116.
- Shi, S.-H., Y. Hayashi, R.S. Petralia, S.H. Zaman, R.J. Wenthold, K. Svoboda, and R. Malinow. 1999. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science*. 284:1811-1816.
- Shields, S.B., and R.C. Piper. 2011. How ubiquitin functions with ESCRTs. *Traffic*. 12:1306-1317.
- Skieterska, K., P. Rondou, and K. Van Craenenbroeck. 2017. Regulation of G protein- coupled receptors by ubiquitination. *International Journal of Molecular Sciences*. 18:923.
- Smit, J.J., and T.K. Sixma. 2014. RBR E3 —ligases at work. *EMBO Reports*. 15:142-154.
- Smith, G.M., and G. Gallo. 2018. The role of mitochondria in axon development and regeneration. *Developmental Neurobiology*. 78:221-237.
- Smith, M.A. 1998. Alzheimer disease. In *International Review of Neurobiology*. Vol.42. Elsevier. 1-54.
- Squire, L.R., and S.H. Barondes. 1973. Memory impairment during prolonged training in mice given inhibitors of cerebral protein synthesis. *Brain Research*. 56:215- 225.
- Steinberg, J.P., K. Takamiya, Y. Shen, J. Xia, M.E. Rubio, S. Yu, W. Jin, G.M. Thomas, D.J. Linden, and R.L. Huganir. 2006. Targeted in vivo mutations of the AMPA receptor subunit GluR2 and its interacting protein PICK1 eliminate cerebellar long-term depression. *Neuron*. 49:845-860.

- Steinberg, S.F. 2008. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiology Rev.* 88:1341-1378.
- Stevens, C.F., and J. Sullivan. 1998. Synaptic plasticity. *Current Biology.* 8:R151-R153.
- Stewart, M.D., T. Ritterhoff, R.E. Klevit, and P.S. Brzovic. 2016. E2 enzymes: more than just middle men. *Cell Research.* 26:423-440.
- Stuart, G., N. Spruston, B. Sakmann, and M. Häusser. 1997. Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends in Neurosciences.* 20:125-131.
- Suo, Z., L. Chen, D. Pei, X. Jin, and H. Zhang. 2014. A new nuclear DNA marker from ubiquitin ligase gene region for genetic diversity detection of walnut germplasm resources. *Biotechnology Report (Amst).* 5:40-45.
- Sur, M., and J.L.R. Rubenstein. 2005. Patterning and plasticity of the cerebral Cortex. *Science.* 310:805.
- Sutherland, R.J., and J.W. Rudy. 1989. Configural association theory: The role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia. *Psychobiology.* 17:129-144.
- Swatek, K.N., and D. Komander. 2016. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* 26:399-422.
- Theurillat, J.-P.P., N.D. Udeshi, W.J. Errington, T. Svinkina, S.C. Baca, M. Pop, P.J. Wild, M. Blattner, A.C. Groner, and M.A. Rubin. 2014. Ubiquitylome analysis identifies dysregulation of effector substrates in SPOP-mutant prostate cancer. *Science.* 346:85-89.
- Thomas, P., and T.G. Smart. 2005. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 51:187-200.
- Turrigiano, G.G. 2008. The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell.* 135:422-435.
- Turrigiano, G. 2012. Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 4:a005736- a005736.
- Van der Sluijs, P., and C.C. Hoogenraad. 2011. New insights in endosomal dynamics

- and AMPA receptor trafficking. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Vol. 22. Elsevier. 499-505.
- Vijay-Kumar, S., C.E. Bugg, and W.J. Cook. 1987. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 194:531-544.
- Walker, B.R., A. Easton, and K. Gale. 1999. Regulation of limbic motor seizures by GABA and glutamate transmission in nucleus tractus solitarius. *Epilepsia*. 40:1051-1057.
- Watson, J.F., H. Ho, and I.H. Greger. 2017. Synaptic transmission and plasticity require AMPA receptor anchoring via its N-terminal domain. *Elife*. 6:e23024.
- Westerfield, J.M., and F.N. Barrera. 2020. Membrane receptor activation mechanisms and transmembrane peptide tools to elucidate them. *Journal of Biological Chemistry*. 295:1792-1814.
- Widagdo, J., Y.J. Chai, M.C. Ridder, Y.Q. Chau, R.C. Johnson, P. Sah, R.L. Hugarir, and V. Anggono. 2015. Activity-dependent ubiquitination of GluA1 and GluA2 regulates ampa receptor intracellular sorting and degradation. *Cell Rep*. 10:783-795.
- Widagdo, J., S. Guntupalli, S.E. Jang, and V. Anggono. 2017. Regulation of ampa receptor trafficking by protein ubiquitination. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10:347- 347.
- Widagdo, J., J.W. Kerk, S. Guntupalli, R.L. Hugarir, and V. Anggono. 2020. Subunit- specific augmentation of AMPA receptor ubiquitination by phorbol ester. *Cellular and Molecular Neurobiology*:1-10.
- Woodman, R.J., and H. McIlwain. 1961. Glutamic acid, other amino acids and related compounds as substrates for cerebral tissues: their effects on tissue phosphates. *Journal of Biochemistry*. 81:83-93.
- Wu, X., G.C. Mel, D.J. Strouse, and B.W. Mel. 2019. How Dendrites Affect Online Recognition Memory. *PLOS Computational Biology*. 15:e1006892-e1006892.
- Xu, J., C. Kam, J.-H. Luo, and J. Xia. 2014. PICK1 mediates synaptic recruitment of AMPA receptors at neurexin-induced postsynaptic sites. *The Journal of Neuroscience*. 34:15415- 15424.
- Yagishita, S., M. Murayama, T. Ebihara, K. Maruyama, and A. Takashima. 2015. Glycogen synthase kinase 3 β -mediated phosphorylation in the most c- terminal region of protein interacting with C kinase 1 (PICK1) regulates the binding of

- PICK1 to glutamate receptor subunit GluA2. *Journal of Biological Chemistry*. 290:29438-29448.
- Yakubu, R.R., L.M. Weiss, and N.C. Silmon de Monerri. 2018. Post-translational modifications as key regulators of apicomplexan biology: insights from proteome-wide studies. *Molecular Microbiology*. 107:1-23.
- Yang, Q., J.C. Langston, Y. Tang, M.F. Kiani, and L.E. Kilpatrick. 2019. The role of tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta in infection and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 20:1498.
- Yang, X., and K. Qian. 2017. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 18:452-465.
- Yokoi, N., Y. Fukata, A. Sekiya, T. Murakami, K. Kobayashi, and M. Fukata. 2016. Identification of PSD-95 depalmitoylating enzymes. *The Journal of Neuroscience*. 36:6431- 6444.
- You, J., and C.M. Pickart. 2001. A HECT domain E3 enzyme assembles novel polyubiquitin chains. *Journal of Biological Chemistry*. 276:19871-19878.
- Yuan, D., Y. Tao, G. Chen, and T. Shi. 2019. Systematic expression analysis of ligand- receptor pairs reveals important cell-to-cell interactions inside glioma. *Cell Communication and Signaling*. 17:48-48.
- Yuan, W.-C., Y.-R. Lee, S.-Y. Lin, L.-Y. Chang, Y.P. Tan, C.-C. Hung, J.-C. Kuo, C.- H. Liu, M.-Y. Lin, and M. Xu. 2014. K33-linked polyubiquitination of coronin 7 by Cul3-KLHL20 ubiquitin E3 ligase regulates protein trafficking. *Molecular cell*. 54:586-600.
- Zheng, N., and N. Shabek. 2017. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation. *Annual Review of Biochemistry*. 86:129-157.
- Zhou, Y., and N.C. Danbolt. 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*. 121:799-817.
- Ziff, E.B. 2007. TARPs and the AMPA receptor trafficking taradox. *Neuron*. 53:627-633.