



# **Étude de la sous-unité GluN2B lors de l'activation de la calpaïne**

**Mémoire**

**Valérie Clavet Fournier**

**Maîtrise en neurobiologie**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

# **Étude de la sous-unité GluN2B lors de l'activation de la calpaïne**

**Mémoire**

**Valérie Clavet Fournier**

Sous la direction de :  
**Paul De Koninck, directeur de recherche**

## Résumé

Les récepteurs NMDA sont essentiels à la fonction synaptique. Ils activent diverses cascades de signalisation, dont celle de la calpaïne. Cette protéase peut cliver la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA (rNMDA), mais les conséquences d'une telle coupure ne sont pas encore connues. L'objectif de cette étude est de détecter le fragment C-terminal ainsi généré par la calpaïne et d'étudier ses possibles interactions avec d'autres protéines, telles que la CaMKII, et, par le fait même, son rôle dans la modulation de cascades de signalisation impliquées dans la fonction synaptique. J'ai donc procédé à des études biochimiques par Western Blot sur différentes fractions (nucléaire, cytosolique, densité post-synaptique (PSD), non-PSD) de neurones corticaux en culture âgée de 12 à 15 jours et j'ai observé le clivage de la sous-unité GluN2B en appliquant une stimulation excitotoxique composée de 100 $\mu$ M de glutamate et 10  $\mu$ M de glycine, qui est reconnue pour activer tous les récepteurs NMDA (synaptique et extrasynaptique) (Papouin et al., 2012). Cette stimulation a généré un fragment de 60 kDa dans la fraction PSD spécifique à la sous-unité GluN2B. J'ai également démontré, par des expériences d'immunoprécipitation, l'interaction de ce fragment C-terminal avec la CaMKII et la PSD95, ce qui n'a jamais été dévoilé par le passé. Enfin, ce fragment pourrait possiblement être en mesure de maintenir l'activité de la CaMKII lors des processus d'excitotoxicité, ce qui engendrerait la mort neuronale et plusieurs pathologies.

## **Abstract**

NMDA receptors are essential for synaptic function. They activate various signaling cascades, including that of calpain. This protease can cleave the C-terminal tail of the GluN2B subunit of the NMDA receptor (NMDAr), but the consequences of this cleavage, in neuronal functions, is not yet known. The objective of this study is to detect the C-terminal fragment induced by calpain and to study its possible interactions with other proteins, such as CaMKII, and also, its role in the modulation of signaling cascades involved in synaptic function. I therefore performed biochemical studies by Western blot on different fractions (nuclear, cytosolic, postsynaptic density (PSD), non-PSD) of cortical neurons in culture aged 12 to 15 days and observed the cleavage of the GluN2B subunit by applying an excitotoxic stimulation composed of 100  $\mu$ M glutamate and 10  $\mu$ M glycine, which is known to activate all NMDA receptors (synaptic and extrasynaptic) (Papouin et al., 2012). This stimulation generated a fragment at 60 kDa in the PSD fraction specific to the GluN2B subunit. I have also demonstrated, through immunoprecipitation experiments, the interactions of this C-terminal fragment with CaMKII and PSD95, which has never been observed in the past. Finally, this fragment could possibly be able to maintain the activity of CaMKII during the excitotoxicity processes and to induce the neuronal death and several pathologies.

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	iv
Table des matières .....	v
Liste des figures .....	vii
Liste des graphiques .....	viii
Liste des abréviations .....	ix
Remerciements .....	x
Chapitre 1: Introduction .....	1
1.1 La mémoire par le cortex .....	1
1.2 La structure du neurone .....	1
1.3 La synapse chimique .....	2
1.4 La transmission Glutamatergique .....	4
1.5 Les récepteurs post-synaptiques de la synapse excitatrice .....	4
1.5.1 Les récepteurs AMPA .....	5
1.5.2 Les récepteurs NMDA .....	6
1.5.3 La sous-unité GluN2B du récepteur NMDA .....	9
1.6 La potentialisation à long terme .....	12
1.6.1 La CaMKII .....	12
1.6.2 La Calpaïne .....	14
1.7 L'excitotoxicité .....	16
1.8 Problématique, hypothèse et objectif .....	18
Chapitre 2: Méthodologie .....	21
2.1 Culture de neurones corticaux .....	21
2.2 Infection virale .....	21
2.3 Traitement des cellules .....	22
2.4 Fractionnement neuronal .....	22
2.5 Dosage de Protéines .....	24
2.6 Activité enzymatique de la calpaïne .....	24
2.7 $\mu$ -Calpaïne active <i>in vitro</i> .....	24
2.8 Immunoprécipitation .....	25
2.9 Migration sur gel .....	25
2.10 Traitement des membranes .....	26
2.11 Quantification .....	27
Chapitre 3: Résultats .....	29
3.1 Clivage de la sous-unité GluN2B .....	29
3.2 Purification des fractions neuronales .....	30

3.3. Localisation du fragment C-terminal de GluN2B.....	32
3.4. Détection du fragment C-terminal après infection virale.....	34
3.5. Implication de la calpaïne .....	39
3.5.1 activité enzymatique de la calpaïne .....	39
3.5.2 Inhibition de la calpaïne .....	40
3.5.3 Activation de la m-calpaïne .....	42
3.5.4 Activation de la $\mu$ -calpaïne .....	45
3.6. Clivage des protéines du cytosquelette.....	47
3.7 Interaction entre la PSD95 avec la sous-unité GluN2B .....	49
3.8. Implication de la CaMKII .....	50
3.8.1 Phosphorylation de la CaMKII .....	50
3.8.2 Interaction de la CaMKII avec la sous-unité GluN2B.....	51
Chapitre 4: Discussion.....	56
Chapitre 5: Conclusion.....	67
Bibliographie.....	69
Annexe 1 .....	76
Annexe 2.....	77

## Liste des figures

Figure 2.1. Isolation des synaptosomes. ....	23
Figure 2.2. Technique d'immunoprécipitation. ....	25
Figure 3.1 Clivage de la sous-unité GluN2B. ....	29
Figure 3.2 Purification des différentes fractions neuronales. ....	31
Figure 3.3. Clivage de la sous-unité GluN2B. ....	33
Figure 3.4. Infection des cultures corticales par le virus SEP-GluN2B-HA. ....	35
Figure 3.5. Détection du fragment C-terminal de GluN2B par différents anticorps. ....	37
Figure 3.6. Effet de l'inhibition de la calpaïne sur le clivage de la sous-unité GluN2B. ....	41
Figure 3.7. Effet de l'augmentation du calcium sur le clivage de la sous-unité GluN2B. ....	43
Figure 3.8. Effet du BDNF sur le clivage de la sous-unité GluN2B. ....	44
Figure 3.9. Activation de la $\mu$ -calpaïne avec et sans antiprotéases dans les tampons d'extractions. ....	46
Figure 3.10. Clivage des protéines du cytosquelette par le glutamate. ....	48
Figure 3.11. Interaction entre la PSD95 et la sous-unité GluN2B. ....	49
Figure 3.12. Effet de l'inhibition de la calpaïne sur la phosphorylation de la CaMKII et la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ . ....	51
Figure 3.13. Interaction de la CaMKII avec la sous-unité GluN2B complète. ....	53
Figure 3.14. Interaction de la CaMKII avec le fragment C-terminal de GluN2B. ....	55
Figure 4.1. Schéma représentatif de l'induction du fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B par la m-calpaïne lors d'une stimulation excitotoxique et de ses interactions avec la PSD95 et la CaMKII. ....	65
Annexe 1: Séquençage de la queue C-terminal de la sous-unité GluN2B: ....	76
Annexe 2: Détection de GluN2B dans le cytosol avec différent anticorps. ....	77

## Liste des graphiques

- Graphique 3.1. Analyse statistique de forme Box plot du pourcentage de clivage de la sous-unité GluN2B induit par la stimulation au Glutamate dans la fraction synaptique..... 38
- Graphique 3.2. Activité enzymatique de la calpaïne en condition basale et lors d'une stimulation excitotoxique (Glu/gly). L'activité de la calpaïne a également été quantifiée par fluorimétrie lors de l'utilisation d'un inhibiteur de cette protéase (MDL)..... 40

## Liste des abréviations

**4AP:** 4-aminopyridine

**APV:** Acide 2-amino-5-phosphonovalérique

**Bic:** Bicuculline

**CaMKII:** Protéine kinases  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-dépendantes II

**DOC:** Déoxycholate

**ERK $\frac{1}{2}$ :** Extracellular signal-regulated kinases

**Glu:** Glutamate

**Gly :** Glycine

**LTP:** Long term potentiation (Potentialisation à long terme)

**non-PSD:** Fraction extrasynaptique

**PCNA:** Proliferating Cell Nuclear Antigen

**PSD:** Postsynaptic density (Densité post-synaptique)

**PSD95 :** Postsynaptic density-95

**rAMPA:** Récepteur  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate

**rNMDA:** Récepteur *N*-méthyl-D-aspartate

**S:** Sérine

**SDS:** Sodium dodecyl sulfate

**SLN:** Signal de localisation nucléaire

**STEP:** STriatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase

**Tx-100:** Triton

**V:** Valine

## Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier mon directeur de recherche Paul De Koninck, car tu m'as permis de vivre une très belle expérience dans le monde de la science. Tout d'abord, tu m'as non seulement laissé la chance d'accomplir mon projet de recherche dans ton laboratoire, mais tu as également cru en mes compétences et mes résultats. Considérant l'état du projet calpaïne à mon arrivée, je suis heureuse que tu m'aies accordée cette confiance afin d'élucider les mystères de l'implication de la calpaïne dans la fonction synaptique. Je sais que ce projet n'a pas toujours été facile, mais tu m'as supporté tout au long de mes recherches et tu as consacré un temps précieux et de qualité afin de faire avancer le projet. De plus, tu m'as aidé à faire un pas de plus vers mon rêve, car tu m'as appuyée, encouragée et donné les meilleurs conseils afin que je sois acceptée au Doctorat. C'est infiniment apprécié et je considère que je ne pouvais pas avoir une meilleure formation que la belle expérience que j'ai vécue dans ton laboratoire. Merci Paul!

Je tiens également à remercier Francine Nault! Tu as toujours été là pour répondre à mes millions de questions et tu as pris beaucoup de ton temps pour m'aider dans mes expériences. Sans toi, je ne sais pas ce que j'aurais fait ! Tu m'as permis d'apprendre énormément durant ma maîtrise et surtout au niveau technique! Maintenant, les westerns blot n'ont plus aucune surprise pour moi et ceci, c'est entièrement grâce à toi! Merci énormément! maintenant je suis prête à affronter de nouveaux défis!

Je voudrais également souligner l'aide que Mado Lemieux m'a apportée tout au long de mon projet. Merci Mado! Tu m'as énormément aidée à développer une bonne pensée scientifique avec toutes les connaissances que tu m'as transmises. J'admire la façon dont tu travailles et c'est en ayant des coachs comme toi qu'on forme de bons scientifiques! Merci à Charleen et Laurence d'avoir fait les meilleures cultures de neurones! Laurence, j'aime beaucoup comment tu travailles, tu vas bien représenter la biochimie dans le laboratoire. Merci à Flavie, sans toi, je ne serais pas en train d'accomplir un rêve! Tu as cru en mes compétences de biochimiste et tu m'as donné la plus belle opportunité du monde! Merci à Kapil! J'ai vraiment aimé travailler avec toi sur le projet calpaïne! Maintenant je peux communiquer en anglais grâce à toi! Terry, Gabriel, Simon et Pierre-Luc, ce fut un énorme plaisir de vous connaître et d'échanger

avec vous tous les jours! Un gros merci à tout le monde du laboratoire vous êtes tellement une belle équipe, je vais m'ennuyer!



comprenant un noyau qui participe activement à la synthèse de macromolécules (Purves et al., 2005). L'espace intracellulaire de la cellule nerveuse comprend aussi le cytoplasme qui contient le cytosol, où baignent les organites tels que le réticulum endoplasmique rugueux, les appareils de Golgi et les mitochondries. Le réticulum endoplasmique, pour sa part, permet l'assemblage de protéines alors que l'appareil de Golgi induit les modifications post-traductionnelles afin d'assurer le transport des biomolécules vers la membrane plasmique (Alberts et al., 2007).

La structure du neurone est également délimitée par deux types de prolongements soit l'unique axone et les nombreuses dendrites. L'axone a une longueur qui peut varier d'un millimètre à plus d'un mètre et propager l'influx nerveux à son extrémité afin que les dendrites du prochain neurone reçoivent l'information. La dendrite, quant à elle, conduit le courant jusqu'au corps cellulaire où il sera traité. Lorsque le corps cellulaire atteint un potentiel seuil, il peut alors transmettre l'information électrique au prochain neurone (Purves et al., 2005).

Ainsi, pour assurer le relais de l'information après une expérience sensorielle, les neurones du réseau doivent être électriquement excités. Lorsque le potentiel d'action est effectué à plusieurs reprises à travers les mêmes neurones, il se crée une augmentation dans l'efficacité de la transmission synaptique. Pour cette raison, l'augmentation de cette efficacité entre les neurones permet de restituer plus rapidement une information encodée dans un réseau. Ce principe de hausse dans l'efficacité de la transmission synaptique est à la base même de la mémoire (Purves et al., 2005).

### **1.3 La synapse chimique**

La communication entre deux neurones est assurée par la synapse qui relaie l'influx nerveux. La synapse a été définie par Charles Scott Sherrington en 1897 pour désigner la jonction entre deux neurones. De ce fait, il existe deux types de synapses dans le système nerveux ; la synapse électrique et la synapse chimique. La plus couramment retrouvée dans le cortex cérébral se trouve sous forme de jonction chimique. Celle-ci est également l'unité fonctionnelle de la transmission de l'information, car elle permet la conversion de l'influx nerveux en messenger chimique, et ce dans un sens

unidirectionnel. Ainsi, les messagers chimiques, plus communément appelés les neurotransmetteurs permettent d'activer certains récepteurs du neurone adjacent afin de relayer l'information (Purves et al., 2005).

D'ailleurs, la synapse est composée de trois parties afin d'assurer son rôle. Elle est constituée d'un élément présynaptique, qui correspond à la membrane du bouton terminal de l'axone. Elle contient des vésicules de formes variées contenant des neurotransmetteurs. C'est également dans cet élément présynaptique où a lieu la synthèse et l'accumulation des neurotransmetteurs qui seront libérés sous l'influence d'un potentiel d'action afin de s'adresser à la dendrite du prochain neurone (Purves et al., 2005). Les neurotransmetteurs sont alors libérés dans la fente synaptique de la synapse. Cet espace intersynaptique correspond à la zone entre les deux neurones et mesure ~ 20 nm. La synapse contient également un site post-synaptique qui se retrouve majoritairement sur l'épine dendritique du neurone adjacent (Spruston., 2008). Il est constitué de récepteurs post-synaptiques qui captent les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique. Puis, l'activation de ces récepteurs permet l'entrée de certains ions qui causent à leur tour un potentiel membranaire afin de générer un courant post-synaptique. De plus, la zone post-synaptique se caractérise par un espace dense aux électrons (microscopie électronique) dans la région sous-membranaire en raison de la présence de plusieurs récepteurs, de protéines d'échafaudages et de protéines synaptiques créant la densité post-synaptique (PSD) (Purves et al., 2005).

Notamment, l'épine correspond à l'excroissance de la membrane dendritique. Elle a été observée pour la première fois vers la fin du XIX<sup>e</sup> siècle par Santiago Ramón y Cajal, un neuroscientifique qui a reçu le prix Nobel en reconnaissance de ses travaux sur la structure du système nerveux. C'est également le premier à proposer un rôle pour ces structures dendritiques. Elles permettent d'augmenter la surface réceptive de la cellule afin d'intégrer les impulsions excitatrices de nombreux signaux afférents. De plus, la présence de ribosomes libres dans l'épine induit la synthèse des protéines du cytosquelette et modifie alors sa morphologie en réponse à l'information reçue. (Spruston., 2008).

## **1.4 La transmission Glutamatergique**

L'information électrique se transmet d'un neurone à l'autre par un processus qui se nomme la transmission synaptique. Comme il a été vu précédemment, l'influx électrique est traduit en molécules chimiques qui ont la capacité d'activer des récepteurs membranaires post-synaptiques et ainsi induire un changement dans l'efficacité de la transmission synaptique (Purves et al.2005). Ce sont ces changements qui importent pour la formation de la mémoire et la synapse excitatrice est au cœur de ce mécanisme. Le principal neurotransmetteur associé à ce type de synapse est l'acide aminé glutamate. Cette molécule est conservée dans des vésicules présynaptiques et s'accumule dans le bouton terminal de l'axone. Suite à l'arrivée d'un potentiel d'action dans le bouton, les canaux calciques sensibles au voltage s'ouvrent et permettent l'entrée de calcium. Le calcium permet alors aux vésicules de fusionner avec la membrane présynaptique et libérer le glutamate qu'elles transportent (Purves et al.2005). Les synapses excitatrices peuvent libérer plusieurs millimoles de glutamate qui vont ensuite activer des récepteurs membranaires post-synaptiques tels que les récepteurs AMPA et les récepteurs NMDA. Après leur utilisation, les molécules de glutamate sont recyclées et/ou dégradées par la partie présynaptique de la synapse ou encore par un astrocyte avoisinant. De plus, suite à leur activation, les récepteurs post-synaptiques sensibles au glutamate laisseront entrer des ions spécifiques qui vont augmenter le potentiel électrique du neurone post-synaptique. Subséquemment, l'ouverture de ces canaux ioniques peut activer à son tour des cascades de signalisation importantes pour la fonction synaptique et engendrer des changements dans la composition des synapses excitatrices.

## **1.5 Les récepteurs post-synaptiques de la synapse excitatrice**

Le nombre de synapses dans notre cerveau est gigantesque ( $\sim 10^{15}$ ) et la moitié d'entre elles sont glutamatergiques (Drachman., 2005). Ceci implique la transmission synaptique, où les molécules de glutamate sont relâchées dans la fente synaptique et servent de ligand à certains récepteurs post-synaptiques. À cet égard, il y a de nombreux récepteurs dans la densité post-synaptique sensibles à cet acide aminé dont les plus importants, pour la fonction synaptique, sont les récepteurs ionotropiques AMPA et NMDA (Tritsch et al., 1999). L'activation de ces canaux excitateurs est

nécessaire à la transmission de l'information. C'est par leur perméabilité aux cations qu'ils peuvent induire des changements dans le potentiel électrique du neurone et donc dans l'efficacité de la transmission synaptique (Dingledine et al., 1999). Les récepteurs au glutamate ont aussi la capacité de former des complexes de signalisation avec les protéines de la densité post-synaptique et participent activement à la formation des synapses, leurs maturations ainsi qu'à leur régulation (Sheng., 2011).

### **1.5.1 Les récepteurs AMPA**

Le récepteur  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate (rAMPA) se retrouve dans de nombreuses parties du cerveau et constitue le récepteur le plus abondant dans le système nerveux. Il module la majorité des courants excitateurs post-synaptiques de la transmission glutamatergique et plus précisément, la transmission rapide dans le système nerveux central (Henley et al., 2013). Afin de bien comprendre son rôle de médiateur dans l'efficacité de la transmission, il semble important de bien décrire sa composition.

Ce récepteur contient quatre types de sous-unités, GluR1 à GluR4, qui se combinent selon différentes conformations afin de former un canal fonctionnel. Les récepteurs AMPA se retrouvent sous forme de tétramère dont la plupart sont des dimères de dimère. Dans le cerveau, il y a principalement des tétramères formés des sous-unités GluR1 et GluR2 et d'autres des sous-unités GluR3/GluR4 dont la majorité des combinaisons de GluR1/2 sont synaptiques (Lu et al., 2009). Toutes les sous-unités comportent un site de liaison à son agoniste, le glutamate. Il suffit que deux sites soient occupés afin que le canal s'ouvre (Rosenmund et al., 1998). Notamment, les récepteurs AMPA sont perméables aux ions de sodium ( $\text{Na}^+$ ), de potassium ( $\text{K}^+$ ) et de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Ainsi, lors de leur activation, ils laissent entrer énormément d'ions de sodium à l'intérieur de la cellule et causent très rapidement (1 ms) une dépolarisation de la membrane post-synaptique. C'est pourquoi ils sont responsables de la majorité des courants excitateurs rapides de la transmission synaptique.

Par ailleurs, la présence de la sous-unité GluR2 dans la composition des rAMPA synaptique rend ce canal imperméable au calcium. Cette caractéristique permet de distinguer les récepteurs AMPA des autres principaux récepteurs sensibles au glutamate retrouvés à la synapse excitatrice, les récepteurs NMDA. D'autant plus que cette propriété contraint l'entrée massive du calcium dans l'espace intracellulaire et prévient donc les processus d'excitotoxicité et la mort cellulaire subséquente (Kim et al., 2001).

D'autre part, ce type de récepteur dispose d'une grande mobilité et son insertion à la synapse est régulée par plusieurs voies de signalisation dont le parcours débute par l'activation des récepteurs NMDA (Rust et al., 2010). Par conséquent, l'augmentation du nombre de rAMPA à la synapse cause un accroissement du potentiel membranaire post-synaptique et donc de la force synaptique entre les neurones. Enfin, ce renforcement synaptique est un processus indispensable pour la formation de la mémoire (Lisman and Raghavachari, 2006).

### **1.5.2 Les récepteurs NMDA**

La zone post-synaptique de la synapse comporte également les récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate (rNMDA). Tout comme les récepteurs AMPA, ils ont la capacité de moduler l'efficacité de la transmission glutamatergique et jouent un rôle crucial dans la fonction synaptique. Ceux-ci sont perméables à plusieurs cations, dont le sodium, le potassium et le plus important, le calcium (Dingledine et al., 1999). Cette perméabilité au calcium est une propriété caractéristique essentielle aux rNMDA, car le fonctionnement de plusieurs mécanismes moléculaires découle de l'activation des rNMDA et de la présence du calcium intracellulaire qu'ils engendrent. À cet égard, ce canal ionique s'ouvre et laisse entrer ces ions uniquement lorsqu'il y a des potentiels d'action simultanés et la libération du glutamate dans la fente synaptique (Purves et al., 2005). C'est pourquoi on les appelle des détecteurs de coïncidence. En effet, lors de la phase d'inactivation ou au potentiel de repos, le récepteur NMDA est bloqué par un ion magnésium ( $Mg^{2+}$ ). Sa libération est permise seulement lors de la réception d'un potentiel membranaire coïncidant avec la liaison de son agoniste, le glutamate (Dingledine et al., 1999). Sans compter que la liaison avec son coagoniste, la

glycine ou la D-sérine, est également indispensable à son activation. Ces derniers sont relâchés dans l'espace extracellulaire par les cellules gliales environnantes (Pاناتier et al., 2006). Ainsi, la transmission synaptique, effectuée par l'ouverture des rNMDA, est strictement dépendante de la synchronisation de l'activité synaptique.

Par ailleurs, il semble essentiel de bien définir la structure et la composition des rNMDA afin de mieux comprendre leur implication dans la fonction synaptique. Tout d'abord, les rNMDA contiennent trois classes de sous-unités : GluN1, GluN2A-D et GluN3A-B. Ils sont tous composés d'un domaine N-terminal extracellulaire et d'un domaine C-terminal intracellulaire. D'ailleurs, les coagonistes du récepteur NMDA, comprenant la glycine et la D-sérine, se fixent sur les sous-unités GluN1 et GluN3 alors que son agoniste, le glutamate, se lie à la sous-unité GluN2 (Wyllie et al., 2013). Ces récepteurs sont formés en tétramère et de multiples associations sont possibles entre les sous-unités. Cependant, la sous-unité GluN1 doit faire partie intégrante du récepteur afin d'obtenir un récepteur fonctionnel. En effet, une étude a démontré que des souris n'exprimant pas la sous-unité GluN1 (GluN1<sup>-/-</sup>) ne permettaient pas d'obtenir des rNMDA actifs à la surface membranaire (Fukaya et al., 2003). En raison de cette propriété, ces canaux ioniques se composent principalement en dihéromères des sous-unités: GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2C et GluN1/GluN2D. Par contre, cela n'exclut pas la possibilité qu'il y ait des combinaisons formées avec la sous-unité GluN3 qui remplace une sous-unité GluN2 ou alors, la combinaison de différentes sous-unités GluN2 assemblées dans le même récepteur. Par exemple, la composition des sous-unités GluN2A et GluN2B avec les deux GluN1 est couramment retrouvée dans le cortex (Rauner and Köhr., 2011).

D'ailleurs, les sous-unités GluN2A et GluN2B prédominent dans le cortex cérébral (Yashiro et Philpot., 2008). Dès la naissance de l'animal et les jours qui s'ensuivent (~ 7 jours), les sous-unités GluN2B sont abondantes alors que les sous-unités GluN2A sont quasi absentes et augmentent progressivement au cours du développement (après 7 jours). (Mierau et al., 2004 ; Roberts et Ramoa., 1999). En effet, une étude s'est intéressée à l'expression des ARNm

codant pour les différentes sous-unités GluN2A et GluN2B dans les neurones corticaux de rat en culture. Le niveau d'ARNm de la sous-unité GluN2B a augmenté dans les premiers jours avant de se stabiliser et l'ARNm de la sous-unité GluN2A, pour sa part, augmente progressivement après une semaine. Ainsi, le niveau d'ARNm de GluN2B est environ 4 fois plus élevé que celui de l'ARNm de GluN2A dans des cultures de neurone corticaux après 21 jours (Zhong et al., 1994). Ces changements peuvent aider à optimiser l'efficacité de la transmission synaptique à différents stades du développement (Yashiro et Philpot 2008). Notamment, le ratio GluN2A/GluN2B change tout au long du développement de l'animal, et ce par les expériences sensorielles acquises et par la formation de la mémoire qui s'ensuit (Bellone et Nicoll, 2007; Sheng et al., 1994; Roberts et Ramoa, 1999).

D'autre part, les différentes compositions formant le récepteur lui confèrent diverses propriétés fonctionnelles et biophysiques (Cull-Candy et al., 2001). Puisque la composition de la sous-unité GluN2 est nécessaire à la liaison du glutamate, cela lui procure certaines propriétés caractéristiques. En effet, ces différentes composantes en GluN2A-D influencent les cinétiques d'activation et de désactivation du récepteur, elle régule également la probabilité d'ouverture par son affinité avec le glutamate et l'ion magnésium. La conductance du récepteur est donc modifiée selon les différentes composantes (Vicini et al., 1998). En effet, le tétramère de GluN1/GluN2B possède une plus grande affinité pour le glutamate que les autres sous-unités, c'est pourquoi ce neurotransmetteur reste associé plus longtemps à cette sous-unité et donc la fermeture de ces canaux est plus lente. Par cette propriété, la sous-unité GluN2B induit une plus grande augmentation de calcium intracellulaire, ce qui provoque un potentiel membranaire presque deux fois plus grand que la sous-unité GluN2A dans une seule activation du récepteur (Yashiro et Philpot, 2008 et Erreger et al., 2005). D'autant plus que le calcium intracellulaire cause une cascade de signalisation qui active plusieurs protéines synaptiques nécessaires à plusieurs fonctions telles que l'apprentissage et le traitement de la mémoire. Par conséquent, je m'intéresse tout particulièrement à cette sous-unité et à son importance dans la fonction synaptique.

### **1.5.3 La sous-unité GluN2B du récepteur NMDA**

Tout d'abord, la sous-unité d'intérêt se compose, dans son entièreté, de 1456 acides aminés et possède une masse moléculaire approximative de 170 kDa (Kut-suwada et al., 1992). La synthèse de cette molécule débute par la transcription de son ADN dans la fraction nucléaire de la cellule et s'ensuit par l'assemblage en tétramère, avec les sous-unités GluN1, dans le réticulum endoplasmique (Bard et Groc, 2011). Ensuite, les rNMDA, contenant GluN2B, entrent dans l'appareil de Golgi afin de subir différentes modifications post-traductionnelles. Ces modifications permettent aux rNMDA de s'associer à des vésicules qui les guideront jusqu'à la membrane plasmique.

Par la suite, les récepteurs fonctionnels, combinés des sous-unités GluN2B, se distribuent à la membrane plasmique par diffusion latérale entre les compartiments synaptiques et extrasynaptiques (Triller and Choquet, 2005). De façon générale, les récepteurs synaptiques seraient responsables de la formation de la mémoire, alors que l'activation des récepteurs extrasynaptiques induirait des mécanismes d'excitotoxicité. Dans des conditions physiologiques, les rNMDA extrasynaptiques ne sont pas exposés au neurotransmetteur délivré par les vésicules présynaptiques (Le Meur et al., 2007), mais au glutamate ambiant, d'origine gliale, où la concentration est maintenue à de bas niveaux (~25 nM) (Herman and Jahr, 2007). Cependant, cette concentration ne permet pas d'engendrer l'activation des rNMDA extrasynaptiques (Herman and Jahr, 2007 ; Le Meur et al., 2007). En fait, ces récepteurs sont activés seulement lors d'une libération excessive de glutamate, lorsque celui-ci diffuse hors de la fente synaptique et serait donc impliqué dans les processus de suractivation synaptique et la neurotoxicité (Harris and Pettit, 2008). Les récepteurs extrasynaptiques se retrouvent généralement à 45% le long de la zone pérисynaptique et à 55% sur l'arbre dendritique (Petralia., 2010). La majorité d'entre eux se composent de la sous-unité GuN2B et ils se retrouvent principalement aux zones de contact avec les cellules environnantes (Papouin et al 2014).

De plus, la partie C-terminale de GluN2B joue un rôle considérable dans la signalisation synaptique, car elle est la cible de plusieurs protéines. D'autant plus que cette sous-unité possède une queue C-terminale intracellulaire plus longue que ses homologues GluN2. La queue C-terminale de GluN2B se compose d'ailleurs de 644 acides aminés (Barria et al., 2002). Cette grande terminaison cytoplasmique lui confère une importance capitale, car elle peut interagir avec plusieurs protéines synaptiques et engendrer différentes cascades de signalisation selon les besoins de la cellule. L'une d'entre elles se nomme la protéine kinase  $Ca^{2+}$ /calmoduline-dépendantes (CaMKII), elle se lie aux rNMDA lors de son activation. Plus précisément, l'entrée de calcium intracellulaire forme un complexe avec la calmoduline, suite à l'ouverture des rNMDA, ce qui permet l'activation de la CaMKII. Cette dernière peut alors translocaliser à la synapse et se lier à des protéines synaptiques telles que la queue C-terminale de GluN2B (Gustin et al., 2011). L'activation de la CaMKII par le complexe  $Ca^{2+}$ /CaM permet à celle-ci de se lier au niveau des résidus 1120- 1482 de la terminaison cytoplasmique de GluN2B. De plus, cette kinase peut également se lier au site 839-1120 sur la queue C-terminale lorsque celle-ci est autophosphorylée au niveau de l'acide aminé thréonine 286 (T286) (Bayer et al., 2001). Ce changement dans le site liaison rend cette interaction très persistante dans le temps d'où son appellation la « protéine mémoire » (Bayer et al., 2001). Sans oublier que cette union permet à la CaMKII d'avoir une activité autonome, même après la dissociation avec la  $Ca^{2+}$ /calmoduline (Bayer et al., 2001).

Parallèlement, la sous-unité GluN2B interagit aussi avec des protéines d'échafaudages de la densité post-synaptique dont la plus importante est la PostSynaptic Density-95 (PSD95). Cette association est nécessaire à la stabilisation des récepteurs NMDA à la synapse. Une étude a d'ailleurs démontré que le motif tSXV (t, terminale, S, serine, X, n'importe quel acide aminé, V, valine) qui comprend les 7 derniers acides aminés de la queue C-terminal de la sous-unité GluN2B est suffisant afin d'induire une interaction avec le domaine PDZ de la PSD95 (Lim et al., 2002). Une autre étude a également constaté que la suppression du domaine de liaison tSXV augmente l'internalisation de la sous-unité GluN2B, ainsi la PSD95 est essentielle à l'ancrage des rNMDA dans la densité post-synaptique (Roche et al. 2001).

En plus des protéines d'échafaudage PSD95, la portion cytoplasmique de GluN2B interagit avec d'autres protéines du cytosquelette, dont la spectrine et la tubuline (Wechsler A et al., 1998; Van Rossum et al., 1999). La spectrine participe à l'intégrité de la membrane plasmique et à la structure du cytosquelette. La tubuline, pour sa part, est la principale composante des microtubules formant le cytosquelette. Elle permet le soutien structurel de la cellule et participe au transport intracellulaire. Par conséquent, les interactions de GluN2B avec ces protéines de soutien permettent à celle-ci de réguler la formation des composantes du cytosquelette et donc, la morphologie de la synapse (Wechsler A et al., 1998).

Finalement, la queue C-terminal de la sous-unité GluN2B interagit aussi avec une protéase calcium dépendant, la calpaïne, dont l'activation est provoquée par l'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Il existe deux isoformes principales de la calpaïne appelée  $\mu$ -calpaïne et m-calpaïne. Leur nom provient d'ailleurs de leur sensibilité à différentes concentrations de calcium. La  $\mu$ -calpaïne est activée par des concentrations calculées en micromolaires de calcium (3 à 50  $\mu$ M) alors que la m-calpaïne, quant à elle, s'active par des concentrations en millimolaires (0,4 à 0,8 mM) (Cong et al., 1989). De ce fait, le rôle proposé pour celle-ci dans la fonction synaptique est relié à l'influx calcique généré lors de l'activation des récepteurs NMDA. Suite à son activation, cette protéase a la capacité de cliver plusieurs protéines dont la queue C-terminal de la sous-unité GluN2B des rNMDA. À ce propos, une étude a notamment démontré la coupure de cette sous-unité par l'activation de la calpaïne suite à l'application d'une stimulation induite par les agonistes du rNMDA, soient le glutamate et la glycine à une concentration de 100  $\mu$ M (Simpkins et al., 2003). Les résultats révèlent que la calpaïne provoque le clivage de GluN2B, car la sous-unité complète à 170 kDa diminue graduellement avec l'application de ces agonistes et produit un récepteur tronqué à 115 kDa. Cependant, la partie C-terminale n'a jamais été documentée dans la littérature, on ne sait donc pas si un fragment est généré ou dégradé et les conséquences fonctionnelles du clivage de ce récepteur ne sont pas très bien comprises, car la calpaïne ainsi que le récepteur NMDA ont tous deux des rôles importants dans deux voies de

signalisation distinctes, soit l'apprentissage et la mémoire ou les mécanismes d'excitotoxicité.

## **1.6 La potentialisation à long terme**

Dès la première moitié du XX<sup>e</sup> siècle, le Canadien Donald Hebb suggère que l'encodage des souvenirs se produit par le renforcement de la connexion entre les neurones qui sont conjointement excités. Cette idée théorique, appelée la règle de Hebb, a été soutenue dans les années 1970 par la découverte de la potentialisation à long terme (LTP) et de la plasticité neuronale, et reste la théorie dominante aujourd'hui. L'augmentation de la force synaptique est engendrée par l'influx de calcium qui entre dans la densité post-synaptique suite à l'activation des rNMDA. D'où l'importance de la sous-unité GluN2B et sa perméabilité pour cet ion. À cet égard, une étude a justement démontré le rôle crucial de la sous-unité GluN2B dans la mémoire en employant des souris transgéniques surexprimant la sous-unité GluN2B dans le cortex préfrontal. Les résultats indiquent que la LTP était améliorée avec la surexpression de GluN2B et les souris démontraient une meilleure performance au test de labyrinthe auxquelles elles étaient soumises (Cui et al., 2011). D'autant plus que cette amélioration était complètement supprimée lors de l'application d'un antagoniste sélectif à la sous-unité GluN2B, Ro25-6981 (Cui et al., 2011). À vrai dire, le calcium constitue une molécule de signalisation essentielle à l'activation de divers mécanismes moléculaires, car il régule l'action de plusieurs enzymes importantes pour la LTP. J'aborderai principalement les processus engendrés par la CaMKII et la calpaïne, qui sont tous deux dépendantes de la voie de signalisation calcique induite par les rNMDA.

### **1.6.1 La CaMKII**

Comme expliqué à la section précédente, l'activation des rNMDA synaptiques permet de recruter la CaMKII à la synapse où elle interagit avec la queue C terminale de la sous-unité GluN2B du récepteur. Cette interaction est critique pour le renforcement synaptique, car elle permet le maintien de l'activité de la kinase. (Leonard et al., 1999; Bayer et al 2001). En fait, une étude a démontré qu'il y a une diminution de la LTP (~50%) et des déficits d'apprentissage chez des souris transgéniques exprimant une sous-unité GluN2B mutante au niveau

de sa queue cytoplasmique, où celle-ci ne peut plus interagir avec la CaMKII. (Zhou Y, et al. 2007) D'autant plus que cette interaction permet à la CaMKII d'avoir une activité persistante dans la PSD et lui confère une autonomie durable. L'autophosphorylation obtenue par la présence du calcium lui permet également de maintenir son activité et d'induire des modifications post traductionnelles à certaines protéines nécessaires au processus de potentialisation à long terme. (Bayer et al 2010).

Plus particulièrement, par ce mécanisme, la CaMKII est en mesure de réguler la fonction de plusieurs protéines, dont la plus documentée est le récepteur AMPA. D'une part, la translocation de la kinase à la synapse lui permet d'augmenter la conductance du canal ionique AMPA. Pour ce faire, la CaMKII induit la phosphorylation du rAMPA au niveau du résidu S831 de la sous-unité GluR1, ce qui permet l'accroissement du flux d'ion  $\text{Na}^+$  intracellulaire, mais seulement lorsqu'il interagit avec une autre molécule nommée Stargazine (Kristensen et al., 2011). De plus, la CaMKII engendre également l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la synapse, car elle phosphoryle aussi la queue c-terminal de la Stargazine afin que celle-ci se lie à la PSD95. Cette interaction permet donc la stabilisation des rAMPA et induit également une augmentation de l'efficacité synaptique, par son nombre croissant à la synapse (Opazo et al., 2010). De ce fait, une simple mutation de substitution codant au site de phosphorylation Thréonine 286 de la CaMKII, par une Alanine, est suffisante pour empêcher le mécanisme de la LTP sous-jacent, car la CaMKII ne peut plus s'autophosphoryler et induire la phosphorylation de protéines post-synaptiques nécessaires à l'augmentation des récepteurs AMPA (Giese et al., 1998).

D'autre part, l'holoenzyme CaMKII peut également réguler la transcription de protéine par l'activation des voies ERK $\frac{1}{2}$ . La phosphorylation de ces voies induit la synthèse de protéines nécessaires à la maintenance de la plasticité synaptique. Par ailleurs, la translocalisation de la CaMKII dans la synapse joue un rôle considérable dans la plasticité, car elle engendre un remodelage de la structure de l'épine (Okamoto et al., 2007) et la persistance de son activité, suite à son interaction avec GluN2B, influence d'une part la synthèse de protéine et

d'autre part, le nombre de récepteurs AMPA à la surface de la membrane post-synaptiques ayant pour effet l'augmentation durable de la force synaptique.

### 1.6.2 La Calpaïne

Le rôle accordé à la calpaïne a longtemps été sous-estimé, car certains laboratoires pensaient que cette protéase s'activait seulement dans les processus de mort cellulaire afin de dégrader la membrane plasmique et les protéines du cytosquelette. Depuis, plusieurs recherches ont démontré que cette protéase s'avère très importante pour la fonction synaptique, car elle permet d'engendrer des voies de signalisation moléculaire par le clivage spécifique de certaines protéines. En 1984, le laboratoire de Baudry et Lynch a proposé un rôle pour la calpaïne dans la formation de la mémoire par des mécanismes de potentialisation à long terme, mais encore aujourd'hui, les mécanismes moléculaires sous-jacents sont très mal compris (Lynch et Baudry., 1984). De nombreuses études ont soutenu cette hypothèse. Notamment, l'une d'entre elles a prouvé que les inhibiteurs de la calpaïne ( $\mu$  et  $m$ ) empêchaient l'induction de la LTP lors d'expériences *in vivo* et *in vitro* (Baudry et al., 2013). L'équipe de Baudry a d'ailleurs observé que l'activation des rNMDA synaptiques permet l'activation de la  $\mu$ -calpaïne et celle-ci influence la phosphorylation de la voie ERK $\frac{1}{2}$  permettant alors la synthèse de nouvelles protéines (Wang et al., 2014; Wang et al., 2013). D'autres études ont également démontré que la  $m$ -calpaïne pourrait être au cœur des processus de mémorisation, car l'inhibition de la  $m$ -calpaïne, à l'aide d'un siRNA, altérerait l'induction de la LTP et les processus d'apprentissage (Zadran et al., 2013). Il est cependant étonnant, car la  $m$ -calpaïne est activée par des concentrations en termes de millimolaire de calcium et la concentration cytosolique de cet ion se retrouve généralement entre 50 à 300 nM (Maravall M et al., 2000). Par contre, la concentration de calcium extracellulaire peut s'élever à environ 2 mM. C'est pourquoi, lors de l'ouverture des canaux ioniques engendrée par la synchronisation de l'activité synaptique, les rNMDA permettent d'induire une augmentation de 10 à 100 fois le niveau basal de calcium intracellulaire près du canal ionique (Baudry et al., 2013). En revanche, il est généralement admis que des concentrations en termes de millimolaire de calcium intracellulaire sont toxiques pour la cellule et ce niveau

est atteint seulement dans des conditions pathologiques. Cette gamme de concentration ne reflète donc pas l'activation de la m-calpaïne dans des processus physiologiques.

Cependant, l'activation de cette forme de calpaïne est susceptible d'être régulée par un autre type de mécanisme explicité par une étude qui a démontré qu'elle peut être activée par la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ , et ce, sans augmentation de calcium intracellulaire (Glading., 2004). Ce qui vient confirmer le rôle de la calpaïne dans la LTP, car la synthèse de nouvelle protéine par la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$  est essentielle au maintien des changements induits lors de la formation de la mémoire. De plus, les facteurs neurotrophiques BDNF peuvent, eux aussi, induire l'activation de la m-calpaïne, par la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ . Par conséquent, la synthèse de protéine s'activera et parmi celles-ci, les rAMPA et la CaMKII seront synthétisées et leur nombre augmentera considérablement dans l'épine dendritique. C'est, en effet, ce qui a été observé lors d'expériences *in vivo* et *in vitro* après un traitement au facteur neurotrophique BDNF (Bramham et al., 2005).

D'autre part, une étude a aussi observé l'influence de la calpaïne sur l'activité de la  $\alpha$ -CaMKII. Ainsi, en plus d'influencer son recrutement synaptique par la synthèse de protéine, l'activation de la calpaïne permettrait aussi de cliver le domaine auto-inhibiteur de la CaMKII ce qui la rendrait irréversiblement active (Hajimohammadreza et al., 1997). Alors peut-être que la calpaïne, comme la queue C-terminal de la sous-unité GluN2B, jouent toutes deux un rôle dans le maintien de l'activité de la CaMKII. D'autant plus que cette étape est cruciale à l'induction de la LTP.

D'un autre côté, l'équipe de Baudry a également observé que l'activation de la calpaïne engendre des modifications dans la morphologie de l'épine dendritique après l'induction de la LTP. En effet, la calpaïne a aussi la capacité de cliver la spectrine, une composante principale du cytosquelette, ce qui suggère un remodelage de la synapse (Lynch et Baudry., 1984). De plus, l'organisation dynamique ainsi que la stabilité synaptique sont également modifiées par ce clivage (Bennett et al., 1990). Sans oublier que la protéine d'échafaudage

PSD95, qui stabilise les rNMDA à la synapse, est aussi une cible pour cette protéase. Notre laboratoire a justement montré que l'inhibition de la calpaïne prévient la séparation entre la PSD95 et le rNMDA soutenant l'hypothèse qu'elle provoque un remodelage synaptique. À ce propos, la CaMKII semble réguler ce processus de séparation par un mécanisme encore inconnu (Doré et al., 2014).

D'ailleurs, la calpaïne a été reconnue pour participer à la régulation des rNMDA et rAMPA à la surface de l'épine dendritique et d'influencer leurs propriétés fonctionnelles. Elle induit, par exemple, le clivage de la stargazine, une protéine nécessaire à l'insertion des rAMPA à la synapse, ce qui suscite un rôle pour la calpaïne dans leur trafic membranaire (Yu L et al., 2011). En plus, cette protéase provoque le clivage de la queue cytoplasmique de la sous-unité GluN2B des rNMDA, suggérant son implication dans la régulation de ses fonctions.

## **1.7 L'excitotoxicité**

Les effets néfastes du glutamate ont été observées pour la première fois dans les années 1954 par le japonais T.Hayashi et ce n'est qu'en 1969 que John Olney a donné un nom à ce processus, soit l'excitotoxicité. Ce mécanisme survient lors de la libération excessive de glutamate dans la fente synaptique, ce qui suractive, par la suite, les récepteurs sensibles au glutamate tel que les rNMDA et les rAMPA (Von Engelhardt et al., 2007). Entre autres, l'activation des rNMDA, particulièrement ceux portant la sous-unité GluN2B, provoque l'excitotoxicité de la cellule en élevant considérablement la concentration de calcium intracellulaire. L'augmentation excessive de calcium active à son tour des protéases où celles-ci endommagent la structure cellulaire menant à des processus pathologiques et à la mort cellulaire (Xu. et al., 2009) Les mécanismes engendrés par l'excitotoxicité pourraient être responsables de nombreuses maladies neurodégénératives du système nerveux central comme l'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington (Vosler et al., 2008).

Dans un premier temps, l'excitotoxicité se produit lors de la présence excessive de glutamate dans la fente synaptique ce qui permet d'activer les récepteurs NMDA extrasynaptiques. L'activation des récepteurs synaptiques et extrasynaptiques provoque alors une très grande augmentation de calcium intracellulaire induisant à

son tour la neurotoxicité (Zhou et al., 2013). En effet, l'activation des rNMDA synaptiques active la voie de signalisation ERK $\frac{1}{2}$  et la synthèse de protéines, comme mentionnées ci-dessus, alors que l'activation de tous les récepteurs NMDA n'induit pas la phosphorylation de la voie ERK $\frac{1}{2}$  et active des mécanismes impliqués dans l'apoptose (Xu et al., 2009).

De plus, une forte concentration de calcium intracellulaire induit la dépolarisation de la membrane mitochondriale, par l'ouverture des pores membranaires (Schinder et al., 1996) inhibant ainsi la formation d'ATP. La réduction de l'ATP engendre à son tour une dépolarisation prolongée de la membrane cellulaire ce qui accroît davantage l'activation des récepteurs NMDA et la neurotoxicité (Greene et Greenamyre., 1996). En effet, la libération inadaptée de l'ATP perturbe le gradient de certains ions. Ainsi, le glutamate ne peut plus être éliminé dans l'espace intracellulaire et provoque une activation majorée et néfaste des récepteurs au glutamate. En plus, l'absorption du calcium par les mitochondries favorise la libération de facteurs proapoptotiques conduisant à l'activation de caspases et à la mort cellulaire. Une étude a d'ailleurs démontré que l'activation soutenue des rNMDA a conduit la cellule à l'apoptose dans des neurones corticaux cultivés. En particulier, les rNMDA contenant la sous-unité GluN2B, car ceux-ci ont été réduits en nombre à la synapse par endocytose suite à un traitement provoquant l'ouverture excessive de ce canal ionique (Wu et al., 2017).

Par ailleurs, la protéase calpaïne joue également un rôle dans les processus tels que l'excitotoxicité et l'apoptose. Effectivement, lors de l'activation de tous les rNMDA, la grande augmentation de calcium intracellulaire permet d'activer la m-calpaïne. Différemment de la voie de prosurvie où la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$  et la synthèse de protéines sont activées, dans ce cas-ci, la m-calpaïne induit le clivage d'une protéine nommée STriatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase (STEP) (Wang et al., 2013). Celle-ci régule les protéines signalétiques synaptiques importantes et son clivage, lors de l'excitotoxicité, provoque la déphosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$  et engendre les mécanismes de mort cellulaire subséquents (Xu et al., 2009). L'équipe de Baudry a également confirmé ce processus moléculaire par l'emploi de siRNA spécifique à la m-calpaïne, où l'inhibition de celle-ci empêchait la neurotoxicité induit par les récepteurs NMDA extrasynaptiques, mais pas la neuroprotection engendrée par les rNMDA synaptiques (Wang et al., 2013). La calpaïne provoque aussi la dégradation

des protéines du cytosquelette et des protéines structurales nécessaires au maintien et à l'intégrité de la structure neuronale, ce qui assure les fonctions de la cellule. Ainsi la dégradation de ces protéines conduit à l'auto-destruction des neurones. Cela a été prouvé dans plusieurs recherches, où l'inhibition de la calpaïne a inhibé à son tour l'apoptose (Momeni., 2011)

D'ailleurs, l'activation de la calpaïne induit aussi la diminution des rNMDA synaptiques (Yuen al., 2008). Dans ces circonstances, la protéase en question, a la capacité de cliver la queue C-terminal de la sous-unité GluN2B ce qui propose un rôle particulier pour celle-ci dans l'exportation du récepteur. Notamment, la perturbation de l'interaction entre la PSD95 et la sous-unité GluN2B facilite le clivage de cette sous-unité (Yuen al., 2008). Ce qui suppose leur endocytose, ou leur diffusion latérale, car ils ne peuvent plus se stabiliser à la synapse. C'est pourquoi la PSD95 semble jouer un rôle protecteur dans l'intégrité des rNMDA. D'autant plus que la terminaison C-terminal de la sous-unité GluN2B contient des domaines structurels requis pour l'association avec des protéines d'échafaudage, des molécules de signalisation et des protéines du cytosquelette, la coupure induite par la calpaïne devrait avoir un impact significatif sur l'expression et la fonction des rNMDA.

## **1.8 Problématique, hypothèse et objectif**

Bien qu'il y ait de nombreuses études qui ont été faites sur la potentialisation à long terme et les processus d'excitotoxicité, ces deux mécanismes s'avèrent très complexes et encore très mal compris. D'autant plus que ces deux fonctions possèdent plusieurs protéines en commun participant à leurs mécanismes moléculaires. Parmi ceux-ci, le récepteur NMDA reste le plus important, car il est le siège de la formation de la mémoire et il est également l'un des principaux acteurs responsables de la mort cellulaire et des maladies pathologiques subséquentes.

Plus spécifiquement, la sous-unité GluN2B de ce récepteur participe à plusieurs voies de signalisation par sa terminaison cytoplasmique. Comme il a été vu précédemment, celui-ci permet de maintenir l'activité de la CaMKII lors des mécanismes de plasticité synaptique ce qui induit l'augmentation des rAMPA à la synapse (Bayer et al., 2001). Le rNMDA engendre également la synthèse de protéines en favorisant la

phosphorylation de la voie ERK $\frac{1}{2}$  où celle-ci initie l'activité enzymatique de la m-calpaïne et génère à son tour le clivage des protéines du cytosquelette (Lynch et Baudry., 1984). Cela provoque un remodelage structurel de l'épine synaptique ainsi que le grossissement de celle-ci (Araya et al., 2014). D'autant plus que les rNMDA eux-mêmes, par l'influx calcique qu'ils génèrent, engendrent aussi l'activation de la  $\mu$ -calpaïne dans ce processus de potentialisation à long terme (Wang et al., 2014).

Par ailleurs, ces récepteurs glutamatergiques sont également impliqués dans plusieurs maladies neurodégénératives par l'excitotoxicité qu'ils déclenchent. Ils engendrent leur propre internalisation en réponse aux mécanismes d'apoptose (Wu et al., 2017). Sans oublier que la m-calpaïne semble, encore une fois, participer à ce processus. Cependant cette fois-ci, la protéase en question n'est pas activée par la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ , mais par la grande quantité de calcium intracellulaire induite par l'activité anormale des rNMDA. La calpaïne favorise la dégradation des protéines du cytosquelette, engendre la déphosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$  et s'ensuit la mort cellulaire (Xu et al., 2009). Ainsi, on en conclut que l'activation appropriée des rNMDA est importante pour les fonctions physiologiques.

Toutefois, la ligne directrice entre la plasticité constructive et destructive est mince. Le récepteur NMDA commande l'information de la cellule et des protéases comme la calpaïne répondent à ce commandement en clivant certaines protéines. Le message envoyé peut être négatif ou non et la frontière entre les deux états peut être très difficile à établir. Dans les deux cas, ces deux protéines participent à l'excitotoxicité et à la LTP d'autant plus que la queue C-terminal de GluN2B est une cible pour la calpaïne.

Au sein du laboratoire du Pr. Paul De Koninck, nos résultats suggèrent que la calpaïne clive la queue C-terminal de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA et génère un fragment intracellulaire. Toutefois, le fragment généré n'a jamais été étudié, même si cela fait déjà une vingtaine d'années que certaines études ont pris conscience du clivage de cette sous-unité. C'est la raison pour laquelle je m'intéresse tout particulièrement à ce fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B dans le cadre de mes recherches. Pour comprendre son éventuel rôle dans la fonction synaptique, la plasticité synaptique ou dans l'excitotoxicité, il est important de connaître i) les conditions menant à sa production, ii) son parcours intracellulaire, iii) ses interactions

avec d'autres protéines et iv) s'il module des cascades de signalisation intracellulaires. Mon projet de maîtrise consiste à clarifier cette problématique. Mon hypothèse de départ fut que le fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA est impliqué dans la fonction synaptique au niveau de la signalisation de la CaMKII en maintenant l'enzyme active.

J'ai donc réalisé des études biochimiques par Western Blot sur des neurones corticaux en culture afin de mettre en évidence la présence de ce fragment, sa localisation et ses possibles interactions. Ainsi, mon premier but était d'optimiser la technique de fractionnement neuronal afin de découvrir où se trouve le fragment dans la cellule et sous quel type de stimulation il peut être généré. Ensuite, mon deuxième objectif consistait à confirmer la présence de ce fragment GluN2B en infectant des cellules corticales avec une construction du plasmide de la sous-unité GluN2B contenant une étiquette HA à la queue C-terminal. La détection du fragment avec un anticorps anti-HA permettrait ainsi de confirmer la spécificité de nos anticorps à reconnaître la queue C-terminal de GluN2B. Enfin, mon dernier objectif était d'effectuer des expériences d'immunoprécipitation dans des conditions où j'ai induit le clivage de la sous-unité GluN2B afin d'examiner les possibles interactions de ce fragment C-terminal avec la CaMKII et la PSD95 qui sont toutes deux essentielles à l'apprentissage et la formation de la mémoire.

# Chapitre 2

## Méthodologie

### 2.1 Culture de neurones corticaux

Afin d'accomplir mes objectifs, j'ai utilisé des cultures de neurones corticaux âgés de 12 à 15 jours. Cette tranche d'âge est capitale dans le cadre de mon projet, car la sous-unité GluN2B y est principalement exprimée par rapport aux autres sous-unités constituant le récepteur NMDA. Au début de mes recherches, j'effectuais moi-même la préparation des cultures, mais puisqu'elles nécessitaient trop de temps, elles ont par la suite été faites par Francine Nault, Charleen Salesse et Laurence Émond. Pour ce faire, le cerveau de rat naissant (P0 à P2) a été extrait et dissocié dans une solution de Papain 12 U/mL, afin d'être digéré enzymatiquement. Par la suite, les neurones ont été lavés dans une solution de Neurobasal et soumises à différentes centrifugations. Subséquemment, elles ont été comptées avant d'être mises en pétri (100 mm) à la densité désirée (30 millions de cellules/pétri) où les pétris étaient préalablement recouverts de Poly-D-Lysine. Ceux-ci sont ensuite maintenus de 12 à 15 jours dans un incubateur à 37 °C/5%CO<sub>2</sub>. Lors de cette incubation, la moitié du milieu de culture (Neurobasal complet) est remplacée deux fois dans la première semaine et trois fois la semaine suivante.

### 2.2 Infection virale

J'ai infecté des neurones corticaux avec un virus exprimant la sous-unité GluN2B avec une étiquette SEP à la partie N-terminal et une étiquette HA à la terminaison cytoplasmique. L'infection a été faite à 75 MOI (multiplicity of infection) pendant 2 heures et laissée 48 heures à l'incubateur afin que la protéine SEP-GluN2B-HA s'exprime suffisamment.

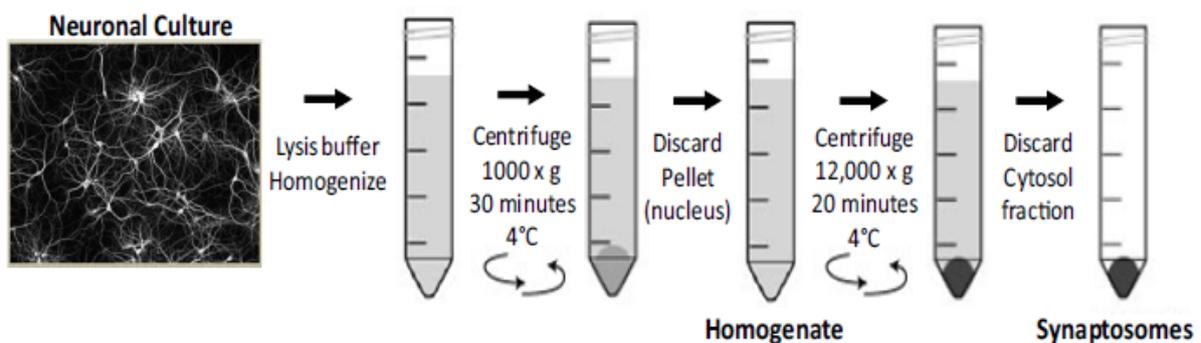
## **2.3 Traitement des cellules**

Dans le but d'induire la plasticité synaptique dans les cultures, j'ai utilisé un protocole de stimulation LTP chimique basé sur l'ajout de Bicuculine (50µM) /4AP (2,5 mM) pour 30 à 60 minutes (Hardingham et Bading., 2002). La bicuculline retire l'inhibition Gabaergique sur le réseau de neurones excitateurs et le 4amino-pyridine prolonge la dépolarisation des neurones en ralentissant la repolarisation de la membrane. Cela favorise la génération de potentiels d'action et ainsi l'activation des récepteurs NMDA synaptiques (Hardingham et Bading 2002). Une autre stimulation a été utilisée pour induire la mort neuronale. Elle consiste à activer le récepteur NMDA avec ses deux coagonistes, la glycine (10 µM) et le glutamate (100 µM) (Stout et al. 1996) pendant 30 à 60 minutes. Cette stimulation est reconnue pour provoquer l'excitotoxicité par l'activation de tous les récepteurs NMDA (synaptiques et extrasynaptiques) (Papouin et al., 2012). De plus, afin d'analyser les conséquences induites par la calpaïne sur la sous-unité GluN2B, les cellules ont été prétraitées et traitées avec des inhibiteurs de la calpaïne 1 (µ) et la calpaïne 2 (m), le MDL (50 µM) pendant 30 minutes. Finalement, pour provoquer l'activation de la m-calpaïne, j'ai utilisé 1,25 mM de Ca<sup>2+</sup> et 100 ng/mL de BDNF.

## **2.4 Fractionnement neuronal**

Les neurones corticaux préalablement traités ont été immédiatement mis sur glace afin d'arrêter toute l'activité enzymatique des cultures. Ensuite, j'ai procédé au fractionnement neuronal, afin d'identifier où se trouve le fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B. Cette méthode est importante, car elle permet d'isoler les protéines spécifiques à chaque fraction et ainsi augmenter la concentration du fragment recherché, dans la fraction où celui-ci se situe. Durant cette technique, les cellules ont d'abord été lavées deux fois avec une solution de DPBS et lysées à l'aide d'un tampon sucrose (0,32 M sucrose, 10 mM Hepes pH 7.4). Les étapes suivantes comprenaient plusieurs centrifugations. La première, après avoir lysé les neurones, était de 1000 G pendant 30 minutes, afin d'isoler les noyaux dans le culot récolté. Ensuite, le surnageant a été centrifugé à 12 000G pour séparer le cytosol des membranes plasmiques qui sont aussi appelées synaptosomes. Après deux lavages de ces membranes, j'ai procédé à la solubilisation de la fraction non-PSD

(extrasynaptique) en incubant ceux-ci dans un tampon contenant 2% de triton (Tx-100) à pH 8 pour 30 minutes (20 mM Hepes pH 8, 100mM NaCl, 2% Tx-100). Par une centrifugation à 12 000G, j'ai récolté la fraction non-PSD qui se retrouvait dans le surnageant. Le culot restant correspondait à la fraction PSD (synaptique). J'ai solubilisé celle-ci à l'aide d'un tampon contenant 1% de triton, 1% de déoxycholate (DOC) et 1% de SDS à pH 7.5 (20mM Hepes pH 7.5, 150 mM, 1% Tx-100, 1% DOC, 1% SDS). Une incubation de 1h dans ce tampon a été nécessaire pour bien solubiliser les membranes de la fraction synaptique puis une centrifugation à 10 000 G m'a permis d'obtenir la fraction PSD correspondant au surnageant.



**Figure 2.1. Isolation des synaptosomes.** Ce schéma démontre l'isolation des membranes plasmiques par différentes centrifugations. La première centrifugation à 1000G permet d'isoler la fraction nucléaire. Le surnageant, qui correspond au cytosol avec les membranes plasmiques, est ensuite centrifugé à 12 000 G, afin d'isoler les synaptosomes dans le culot récolté. (Tirée de *Method to isolate functional synaptosomes*, ThermoFisher)

Au cours de mon projet, j'ai également isolé la fraction nucléaire. Pour ce faire, j'ai solubilisé celle récoltée pendant le fractionnement avec une solution concentrée en sel (400mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8), afin de lyser la membrane nucléaire et solubiliser l'ADN. Ensuite, j'ai effectué une centrifugation à 24 000 G pendant 20 minutes pour récolter le surnageant qui correspond à la fraction voulue. J'ai également isolé les microsomes qui sont de petites vésicules provenant du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. J'ai donc pris la fraction cytosolique que j'ai obtenue lors du fractionnement et j'ai fait une centrifugation à 165 000G pendant 2h. Le surnageant constituait le cytosol soluble et le culot, les microsomes. À noter que tout au long de ces manipulations, mes échantillons étaient conservés sur glace et les solutions étaient toutes constituées d'antiprotéases (Complete (Roche), 2mM EGTA, 2mM EDTA, 1mM PMSF, 10 ug/µl Aprotinin et 10 ug/µl Pepstastin A) et d'antiphosphatases (Cocktail 2 et Cocktail 3 de Sigma à 0,5ug/ul).

## 2.5 Dosage de Protéines

Tous les extraits protéiques ont été dosés avant la migration sur gel. Pour ce faire, j'ai utilisé la méthode de Bradford qui est un dosage colorimétrique. L'intensité de la couleur, développée après l'ajout du réactif de Bradford (Biorad laboratoires, USA, # 500-0006), traduit la quantité de protéines dans mes échantillons, en mesurant le spectre d'absorbance, dans une micro cuve (plaque 96 puits) à 595nm. L'appareil calcule alors la densité optique de chaque échantillon. Une gamme de concentration connue de BSA a été dosée en parallèle, afin de réaliser une courbe standard, ce qui m'a permis de déterminer la quantité de protéines présente dans chaque échantillon. Les échantillons sont dosés en triplicata, en utilisant une dilution de 1/20, afin que la densité optique de l'échantillon entre dans la courbe standard du dosage obtenu par la BSA (0.5 ug à 1.5 ug).

## 2.6 Activité enzymatique de la calpaïne

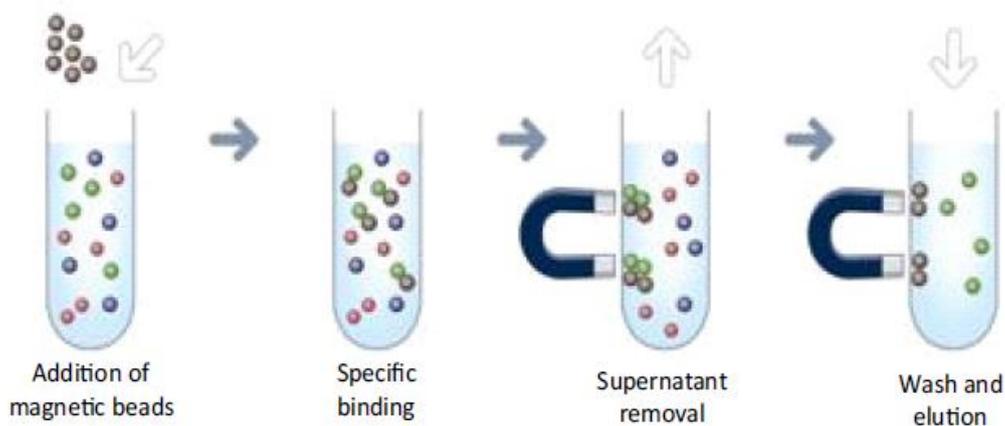
Lors de mes recherches, j'ai également vérifié l'activité enzymatique de la calpaïne avec le "Calpain Activity Fluorometric Assay Kit" (#K240-100), afin d'observer l'activité de cette protéase lors d'une stimulation, mais aussi, la capacité des inhibiteurs de la calpaïne à inhiber son activité. Cet ensemble de solutions m'a permis de vérifier l'activité de cette enzyme par le clivage du substrat Ac-LLY-AFC, qui émettait de la lumière jaune à 505 nm. Je pouvais ensuite quantifier ce clivage avec un fluorimètre et comparer ces données avec les contrôles. Dans cette expérimentation, j'ai utilisé 100 ug de protéines provenant du cytosol, que j'ai ensuite incubé avec son substrat, pendant 1 heure à 37°C, avant de lire la fluorescence.

## 2.7 $\mu$ -Calpaïne active *in vitro*

Au cours de cette étude, j'ai regardé l'implication de la  $\mu$ -calpaïne par des expériences de calpaïne active *in vitro*. J'ai usé de 50 ug de la fraction PSD où j'ai ajouté 5 ug de  $\mu$ -calpaïne active et 1mM de CaCl<sub>2</sub>. A posteriori, j'ai analysé le clivage de la sous-unité d'intérêt par Western blot.

## 2.8 Immunoprécipitation

J'ai aussi employé la technique d'immunoprécipitation, afin de mettre en évidence les protéines pouvant avoir une interaction avec le fragment C-terminal de GluN2B, tel que CaMKII et PSD95. Cette méthode consiste en l'accrochage d'une première protéine d'intérêt avec un anticorps spécifique par un complexe bille/anticorps/protéine. Une fois migrée sur gel, il nous est possible de déterminer les différents partenaires d'interaction de cette protéine. Ainsi, j'ai immunoprécipité la CaMKII et la PSD95 et j'ai examiné leurs interactions avec la queue du rNMDA. J'ai utilisé 50 uL de Dynabeads Protein G (10003D) pour chacune des conditions où j'ai homogénéisé avec 10ug d'anticorps, pendant 2 heures. Suite à plusieurs lavages, j'ai déposé 100ug d'antigène, qui se trouve à être la fraction PSD et j'ai incubé ce complexe toute la nuit. Finalement, j'ai obtenu le complexe souhaité en éluant la bille, dans une solution de 2% SDS 1X contenant 6M d'urée, que j'ai ensuite chauffée à 70°C pendant 10 minutes.



**Figure 2.2. Technique d'immunoprécipitation.** Pour vérifier l'interaction entre deux protéines, on ajoute d'abord un anticorps spécifique à la protéine que l'on veut étudier à une bille magnétique. Ensuite, on ajoute ce complexe au lysat que l'on veut analyser. Les protéines qui interagissent avec la protéine d'intérêt vont maintenir leurs interactions en formant un complexe avec la bille magnétique que l'on élut, pour finalement analyser cette interaction par Western blot. (Magnetic beads separation, page web)

## 2.9 Migration sur gel

Après leur dosage, les échantillons ont été préparés dans un tampon dénaturant de 2% SDS 3X contenant 6M d'urée, avant leur dépôt sur le gel d'acrylamide, de sorte que la quantité finale soit de 30 à 50 µg par puits. Les échantillons ainsi préparés sont

chauffés à 95°C, pendant cinq minutes, avant d'être déposés sur des gels en gradient de 4-12% d'acrylamide (Invitrogen novex). Le tampon de migration utilisé est du MOPS (NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20x, de Novex) 1x qui est préconisé pour la séparation de protéines de haut poids moléculaire. Un marqueur de poids moléculaire (Prestained See Blue, Invitrogen novex) a été déposé dans le premier puit, afin de déterminer la taille des protéines en fonction de leur migration. Cette dernière a été faite à 100V jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel. Le transfert a par la suite été fait à 60V pendant 90 minutes, dans du tampon de transfert (Tris 2mM, Glycine 190 mM, Méthanol 20%). Au dernier stade, les membranes ont été séchées pendant au moins 1 heure, pour maximiser la rétention de protéines.

## **2.10 Traitement des membranes**

Suite au transfert de protéines, les membranes ont été lavées dans du TTBS 1x (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 0,05% Tween-20), avant d'être incubées 30 minutes dans du TTBS avec du lait 5% à température ambiante, afin de saturer les sites non spécifiques. À noter que j'ai employé du TTBS lors de la méthode de révélation par la molécule HRP et j'ai utilisé du TBS (sans Tween-20) pour ces deux étapes, lors de la révélation avec le LI-COR.

Ensuite, les membranes ont été incubées avec différents anticorps spécifiques de mes protéines d'intérêts (p-ERK, GluN2B (C-terminal ou N-terminal),  $\alpha$ -CaMKII, p-CaMKII,  $\beta$ -tubuline, synaptophysin, et PSD-95) sous agitation toute la nuit à 4°C. Les différents anticorps ont été utilisés aux dilutions suivantes : p p-44/42 ERK $\frac{1}{2}$  1/500 (rabbit, Cell Signaling), GluN2B monoclonal 1/200 (mouse, MAB5778 Millipore), GluN2B 1/1000 (Guinea pig, Synaptic Systems), GluN2B N-terminal 1/500 (rabbit, Alomone labs), GluN2B polyclonal 1/500 (rabbit, Millipore) p-CaMKII 1/500 (mouse, cell signaling),  $\alpha$ -CaMKII 1/1000 (rabbit, Abcam/ mouse, Life Technologies),  $\beta$ -tubuline 1/10 000 (rabbit, Synaptic Systems), synaptophysin 1/1000 (mouse, Sigma) et PSD-95 1/1000 (mouse, Thermo scientific / rabbit, Cell signaling).

Suite à cette étape, les membranes sont lavées trois fois pendant 15 minutes avec du TTBS, avant d'être réincubées avec un second anticorps spécifique de l'anticorps

primaire utilisé pendant deux heures à température ambiante (dans du TTBS/lait 5%). Selon la méthode de détection, j'ai utilisé des anticorps secondaires différents. Tout d'abord, pour la méthode avec le HRP, les anticorps secondaires ont été dilués comme suit : anti-lapin 1/2000 (Thermo scientific) et anti-souris 1/2000 (Thermo scientific). Ces anticorps secondaires étant couplés avec une enzyme particulière (HRP, Horse radish peroxidase) réagiront avec un substrat ECL (SuperSignal West Femto Stable Peroxide Buffer et SuperSignal West Femtoluminol/Enhancer solution ; Thermo scientific). La réaction produira ensuite un signal luminescent sur la membrane qui au contact d'un film radiographique va imprimer celui-ci là à l'endroit où le substrat et l'enzyme auront réagi, c'est-à-dire au niveau de nos protéines d'intérêts. Par contre, le signal n'est pas stable et disparaît rapidement. C'est pourquoi, à la fin de mon projet, j'ai opté pour le LI-COR, car ce système est plus précis et le signal se maintient pendant plus de 2 mois. À l'aide de cette méthode, j'ai utilisé des anticorps secondaires couplés avec de la fluorescence (IRDye 680 ou IRDye 800, LI-COR) à une dilution de 1/10 000 que j'ai incubé 2 heures à l'abri de la lumière pour finalement détecter la fluorescence à 700 nm ou à 800 nm avec le scanner LI-COR Odyssey. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet de détecter deux protéines différentes sur la même membrane si les anticorps primaires proviennent de différents hôtes.

## 2.11 Quantification

En ce qui a trait à la quantification, j'ai analysé les résultats obtenus sur film avec le logiciel ImageJ et ceux obtenus avec le LI-COR, avec le logiciel Odyssey. Ces deux programmes permettent d'analyser l'intensité de la bande détectée sur la membrane. On peut alors la comparer aux différentes conditions induites lors du traitement des cellules. Grâce à cette intensité, il m'a été permis de calculer le ratio de la sous-unité GluN2B complète versus le fragment induit. Pour ce faire, afin de normaliser chacun des résultats, j'ai soustrait l'intensité du "background" (IBG) au signal récolté pour le fragment (IF) et j'ai également soustrait le IBG à l'intensité obtenue pour le récepteur complet (IC). Par la suite, j'ai additionné le signal du fragment à celui obtenu pour la sous-unité complète de la même condition (ITot). Ainsi, j'ai pu calculer le ratio de :  $\frac{IF-IBG}{ITot} \times 100$  pour le fragment induit et le ratio de :  $\frac{IC-IBG}{ITot} \times 100$  pour le pourcentage de récepteur complet. Cette façon de faire permet d'éviter les erreurs de variations causés

par le dépôt des échantillons sur gel et par le transfert des protéines sur la membrane. Sans oublier que l'utilisation de ce ratio permet également d'esquiver les fluctuations produites entre les différentes cultures neuronales.

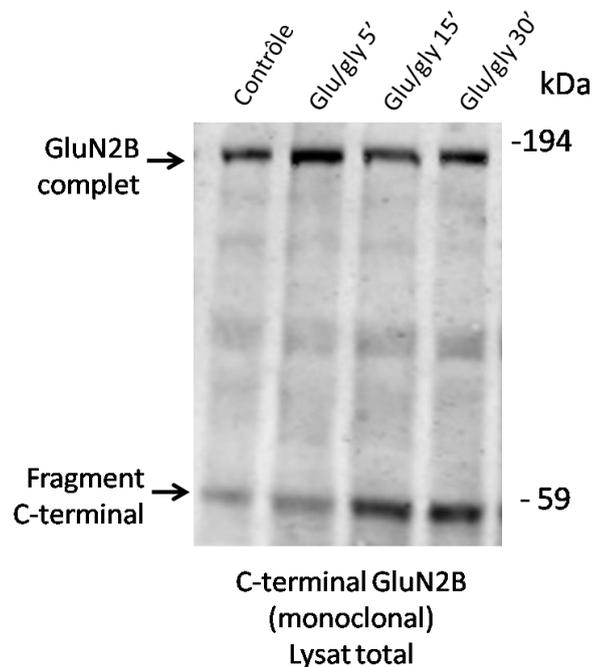
Par ailleurs, l'utilisation d'une stimulation au glutamate provoque le clivage de plusieurs protéines contrôles, dont l'actine et le GAPDH qui sont habituellement utilisés pour vérifier les variations causées entre les différentes conditions. Il m'était donc impossible de pouvoir normaliser mes résultats avec ces protéines contrôles. J'ai donc tenté la quantification des protéines totales, mais encore une fois, étant donné que la stimulation d'intérêt clive principalement les grosses protéines, l'addition des protéines totales sous cette stimulation est toujours inférieure aux autres conditions. Ceci est dû aux transferts de protéines, car les plus grosses d'entre elles ne se transfèrent pas à la même vitesse que les petites. Malgré tout, vers la fin de mon projet, j'ai constaté que la CaMKII ne présentait pas de variation entre les différentes conditions induites. J'ai donc employé l'intensité obtenue pour cette protéine afin de normaliser mes résultats lorsque je le pouvais. Pour arriver à cette fin, j'ai pris l'intensité de l'échantillon à analyser (IE) où j'ai soustrait le IBG. J'ai ensuite pris l'intensité de la bande correspondant à la CaMKII (ICaM) pour la même condition et j'ai fait un ratio de :  $\frac{IE-IBG}{ICaM-IBG} \times 100$ . À l'aide de ce résultat, il m'a finalement été possible de comparer les valeurs entre elles, en effectuant le ratio de celles-ci, sur la donnée obtenue pour la condition contrôle et son pourcentage en multipliant par 100.

## Chapitre 3

### Résultats

#### 3.1 Clivage de la sous-unité GluN2B

Des études antérieures ont démontré le clivage de la sous-unité GluN2B par la calpaïne lors de l'activation des rNMDA. Notamment, l'équipe de Lynch a observé l'induction d'un récepteur tronqué à ~115 kDa lors d'une stimulation avec les agonistes du rNMDA (glutamate et la glycine). Cette portion du récepteur a été détectée à l'aide d'un anticorps contre la partie N-terminale de la sous-unité (Simpkins et al., 2003). Par contre, le fragment C-terminal induit n'a jamais fait objet d'une étude approfondie. Les résultats préalablement obtenus dans le laboratoire du Pr. Paul De Koninck proposent qu'il y a un fragment C-terminal de généré sous cette stimulation (Figure 3.1). Cependant, on ne connaît pas son rôle dans la fonction synaptique ni sa localisation.

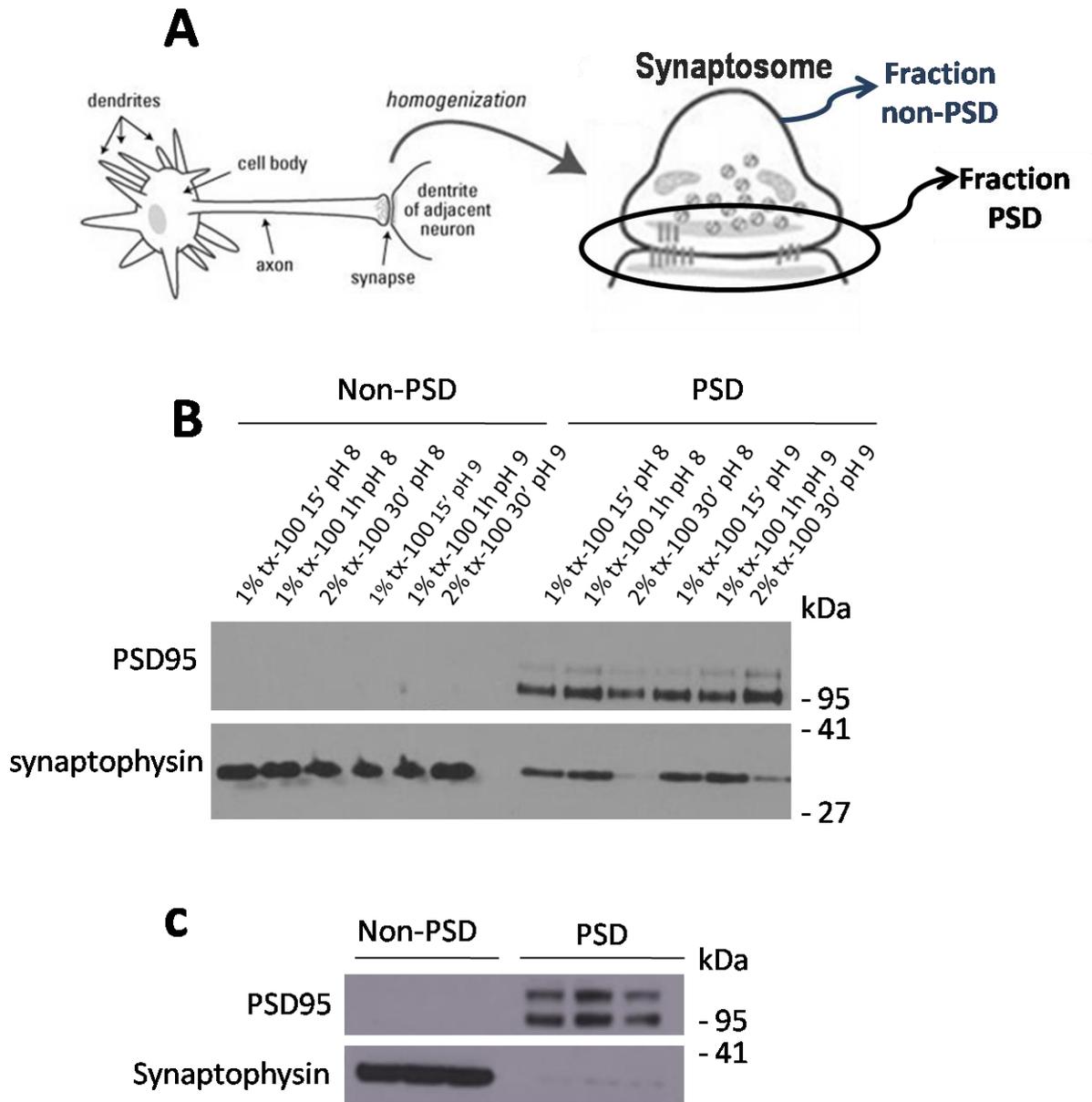


**Figure 3.1 Clivage de la sous-unité GluN2B.** Détection de la sous-unité GluN2B avec un anticorps contre la partie intracellulaire C-terminal de la sous-unité lors d'une stimulation avec les agonistes du rNMDA. Les échantillons proviennent d'une culture d'hippocampe âgé de 3 semaines où le lysat total a été déposé sur gel de polyacrylamide. Ce résultats a été obtenu par Barthélémy Tournier.

### 3.2 Purification des fractions neuronales

Afin de localiser le fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B dans le neurone, j'ai commencé mon projet de recherche par la purification des synaptosomes, car ils correspondent à la fraction neuronale la plus susceptible de contenir le fragment recherché si ce dernier joue un rôle dans la fonction synaptique. Les synaptosomes sont ensuite divisés en deux autres fractions; la fraction PSD et non-PSD (figure 3.2.A). La fraction PSD correspond à la densité post-synaptique où il y a accumulation de la PSD95, alors que la fraction non-PSD représente la membrane plasmique du bouton terminal de l'axone et de l'épine dendritique mais tout en excluant la membrane post-synaptique exposée à la fente synaptique. Cette fraction contient d'ailleurs la synaptophysin, qui est une protéine membranaire spécifique aux vésicules présynaptiques et qui sert de marqueur moléculaire pour la fraction non-PSD.

Avec l'utilisation d'un marqueur de la fraction PSD, la PSD95 et non-PSD, la synaptophysin, j'ai pu purifier chaque fraction en utilisant différents tampons de solubilisation contenant diverses concentrations de triton (tx-100), à différent pH (8-9), afin qu'il n'y ait pas de trace de la PSD95, dans la fraction non-PSD ni de contamination de la synaptophysin dans la fraction PSD. Les résultats révèlent une fraction non-PSD purifiée par l'emploi de l'anticorps contre la PSD95, car il n'y a aucune bande révélée dans cette fraction (Figure 3.1.B). De plus, la fraction PSD est purifiée seulement dans la condition où la solubilisation du non-PSD a été faite dans un tampon contenant 2% de triton à pH 8, puisqu'il y a absence de synaptophysin à ~34 kDa sur la Figure 3.2.B. Ainsi, ce tampon a été utilisé pour tous les autres fractionnements (Figure 3.2.C).



**Figure 3.2 Purification des différentes fractions neuronales.** (A) Schéma représentant la fraction PSD et non-PSD sur les synaptosomes isolés. (B) Purification de la fraction PSD par l'emploi d'un tampon d'extraction des synaptosomes composés de 2% de triton tx-100 à pH 8. (C) Confirmation de la pureté de la fraction PSD et non-PSD par des marqueurs spécifiques à chacune des fractions, les échantillons ont été déposés sur gel en triplicat.

### 3.3. Localisation du fragment C-terminal de GluN2B

Après avoir purifié les fractions PSD et non-PSD, j'ai analysé leur contenu par la technique d'immunobuvardage ciblant le rNMDA après avoir induit différentes stimulations neuronales. J'ai comparé un stimulus causant la LTP en appliquant la bicuculline et le 4AP (Bic/4AP) (Hardingham et Bading., 2002), ou un stimulus causant l'excitotoxicité des neurones, en appliquant du glutamate et de la glycine (Glu/gly) (Stout et al., 1996).

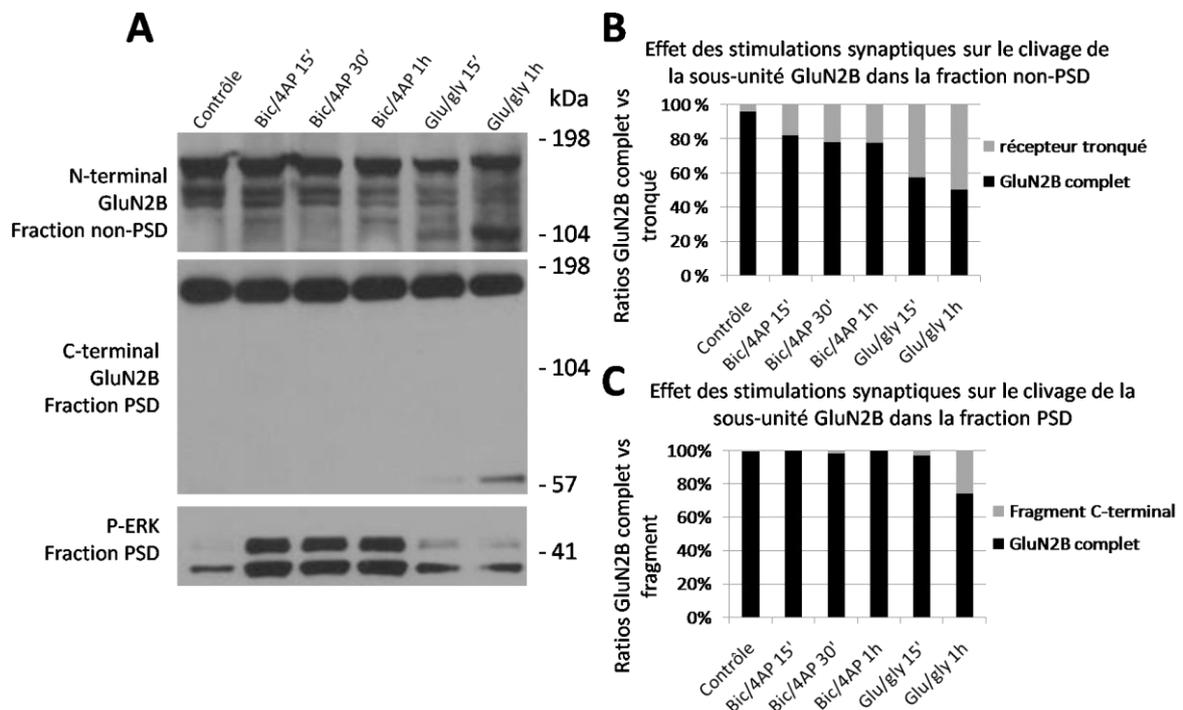
Dans un premier temps, j'ai examiné la fraction non-PSD avec un anticorps spécifique à la partie N-terminale de la sous-unité GluN2B, afin de percevoir le récepteur tronqué induit par la calpaïne comme démontré par le laboratoire de Lynch. À cette fin, les résultats présentent l'apparition de la sous-unité tronquée à ~110 kDa lors d'une stimulation excitotoxique causée par le glutamate d'autant plus que la durée de la stimulation permet d'amplifier la présence du récepteur tronqué dans cette fraction (Figure 3.3.A). En effet, l'analyse de l'intensité du récepteur complet et du récepteur tronqué induit par la stimulation au glutamate provoque environ 50% de clivage (ratios GluN2B complet vs tronqué) de la sous-unité complète, après 1h de traitement et environ 40% après 15 minutes (Figure 3.3.B). Le clivage semble donc spécifique à la stimulation causant le processus d'excitotoxicité et de mort cellulaire.

Par ailleurs, j'ai également examiné la fraction PSD, afin de trouver le fragment complémentaire au récepteur tronqué induit par l'activation de tous les récepteurs NMDA. Étant donné que le récepteur tronqué possède un poids moléculaire de 110 kDa, je m'attendais à trouver un fragment C-terminal à environ 60 kDa puisque la somme des deux parties tronquées et du fragment induit devrait avoir un poids moléculaire de 170 kDa, correspondant à la sous-unité complète. Effectivement, les résultats démontrent l'induction d'un fragment à ~60 kDa dans la fraction PSD lors de la stimulation excitotoxique (figure 3.3.A) et tout comme le récepteur tronqué, il est amplifié après 1h de traitement et ce, allant jusqu'à ~25% de clivage (ratios GluN2B complet vs fragment) par rapport à la sous-unité GluN2B complète (Figure 3.3.C).

Parallèlement, j'ai regardé la phosphorylation de la voie ERK $\frac{1}{2}$ , afin de confirmer l'impact attendu des stimulations induites (Wang et al., 2013). La stimulation bic/4AP

provoque bien la phosphorylation de cette voie (~ 44 kDa), ce qui permet la synthèse de protéines et l'expression de la potentialisation à long terme (Wang et al., 2013). À l'opposé, la stimulation au glutamate n'induit pas ou presque pas la phosphorylation de cette voie, ce qui confirme son rôle dans les processus de mort cellulaire où la phosphorylation de ERK1/2 est inhibée (Ivanov et al., 2006) (Figure 3.3.A).

J'ai également analysé la fraction nucléaire (Résultat non montré) ainsi que la fraction cytosolique (Annexe 2) afin de déterminer le parcours du fragment induit lors de la stimulation au glutamate et ces deux fractions ne démontraient pas de trace du fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B. Donc le fragment semble se localiser principalement dans la fraction PSD, car il est absent des autres fractions neuronales.



**Figure 3.3. Clivage de la sous-unité GluN2B.** (A) Détection de la sous-unité GluN2B dans la fraction non-PSD avec un anticorps contre la partie extracellulaire N-terminal. Détection de la partie C-terminal de la sous-unité et de la phosphorylation de ERK1/2 dans la fraction PSD sous divers traitements. (B) Ratios du récepteur complet vs le récepteur tronqué dans la fraction non-PSD dans différentes conditions. (C) Ratios du fragment C-terminal sur la sous-unité GluN2B complète dans la fraction PSD.

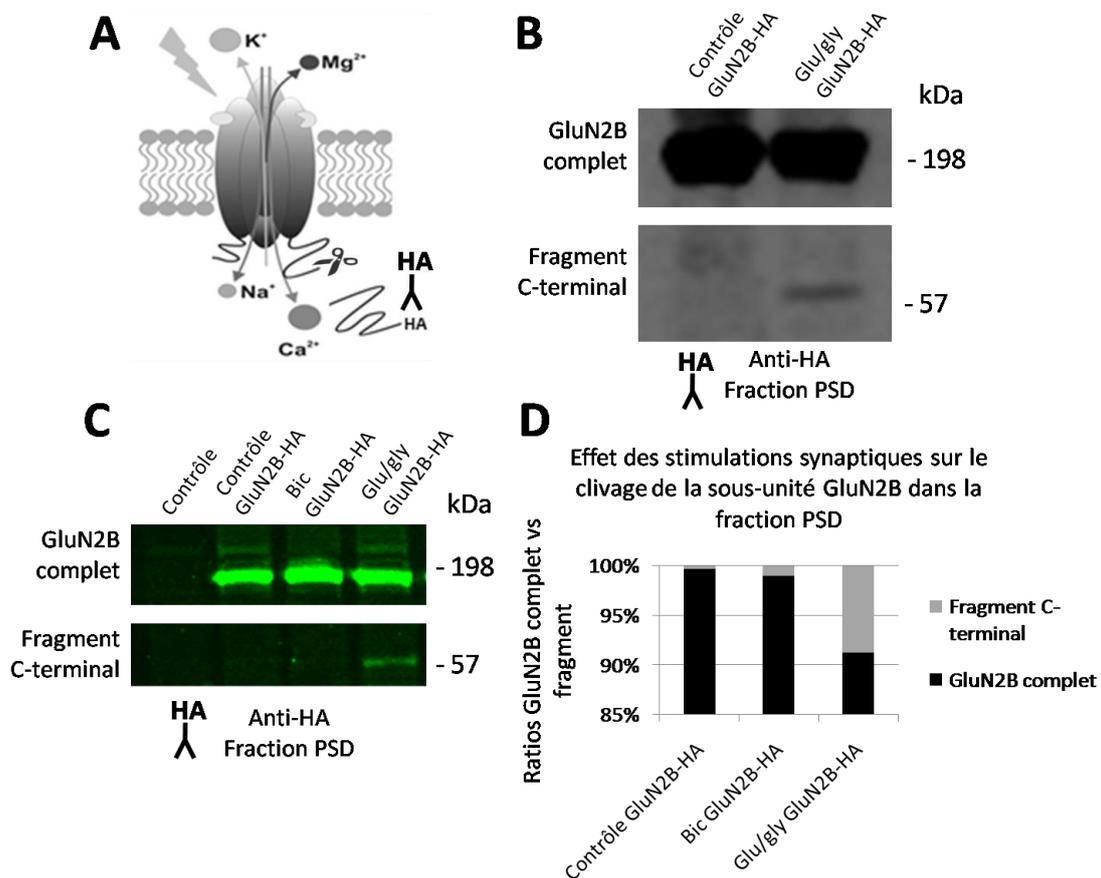
### 3.4. Détection du fragment C-terminal après infection virale

Les résultats précédents ont démontré un fragment C-terminal de GluN2B dans la fraction PSD. Cependant, celui-ci n'a jamais été observé auparavant. Est-il un artéfact révélé par l'anticorps utilisé? Afin de confirmer la présence de ce fragment dans la PSD, j'ai infecté mes cultures de neurones corticaux avec un adénovirus qui permet d'exprimer une sous-unité GluN2B avec une étiquette HA à l'extrémité de la queue C-terminal de la sous-unité (Figure 3.4.A). Ainsi, en employant un anticorps anti-HA, je pourrais confirmer la spécificité des anticorps contre GluN2B à reconnaître le fragment induit dans la PSD.

Dans un premier temps, j'ai infecté les cultures neuronales avec un virus exprimant la sous-unité GluN2B avec une étiquette SEP à l'extrémité N-terminal et une étiquette HA à l'extrémité C-terminal. Dans un deuxième temps, j'ai appliqué une stimulation au glutamate afin de générer le fragment C-terminal. Ensuite, j'ai détecté ce fragment avec l'aide d'un anticorps contre l'étiquette HA dans la fraction PSD (Figure 3.4.B). Les résultats démontrent clairement la présence d'un fragment à ~60 kDa reconnu par l'anticorps anti-HA dans la fraction PSD. Par conséquent, ce fragment ne semble pas être un artéfact et il serait spécifique à la sous-unité GluN2B. L'anticorps détecte aussi le récepteur complet, mais cette fois-ci il se retrouve à ~ 195 kDa, car l'étiquette SEP, à l'extrémité N-terminal de la sous-unité, possède un poids moléculaire de 25 kDa ajouté au poids moléculaire de la sous-unité GluN2B complète à 170 kDa. En revanche, il est difficile d'observer le clivage de la sous-unité complète et de faire la quantification avec la méthode de détection utilisant le HRP puisque la bande à ~195 kDa est très intense et saturée.

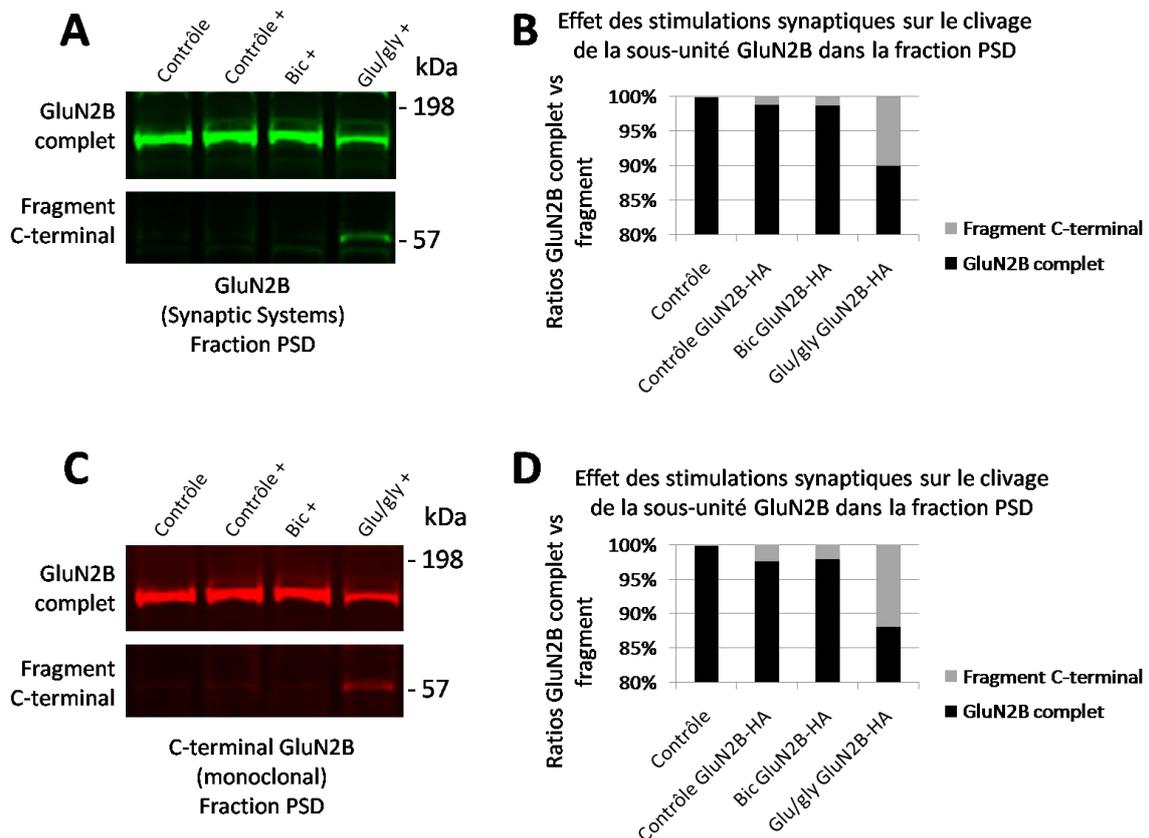
J'ai donc répété l'expérience en utilisant le système LI-COR, car celui-ci est davantage sensible et permet d'obtenir une quantification plus précise. Lors de cette expérience, j'ai également ajouté une condition où j'ai stimulé les neurones avec le bicuculline ainsi qu'une autre où les cellules n'étaient pas infectées par l'adénovirus exprimant l'étiquette HA, à l'extrémité C-terminal de la sous-unité GluN2B dans le but de m'assurer que le fragment détecté était bien spécifique à l'anticorps anti-HA utilisé. Les résultats démontrent que la sous-unité GluN2B complète est révélée avec l'anticorps

anti-HA seulement lorsque les cellules sont infectées, ce qui certifie la spécificité de l'anticorps d'autant plus que le fragment C-terminal endogène produit par infection virale se retrouve encore dans la fraction PSD à ~60 kDa, après une stimulation au glutamate, ce qui confirme la reproductibilité de mes résultats (Figure 3.4.C). L'analyse de ce gel, révélé avec le système LI COR, démontre que la stimulation au glutamate induit 8% de clivage de la sous-unité GluN2B endogène. (Figure 3.4.D). J'ai examiné aussi si la stimulation avec la bicuculline induisait elle aussi un fragment C-terminal dans la fraction PSD, qui serait reconnu par l'anticorps anti-HA et les résultats restent négatifs (Figure 3.4.C).



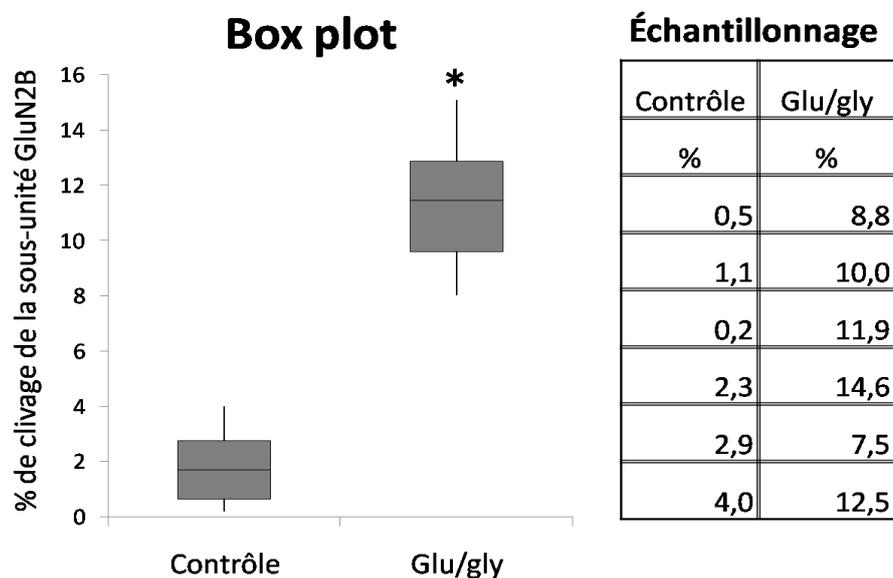
**Figure 3.4. Infection des cultures corticales par le virus SEP-GluN2B-HA.** (A) Schéma représentant la sous-unité GluN2B exprimée par le virus. Celle-ci possède une étiquette HA à l'extrémité C-terminal de la sous-unité et peut ainsi être détectée par un anticorps anti-HA. (B) Détection par Western blot (HRP) du fragment C-terminal de GluN2B, après infection virale exprimant SEP-GluN2B-HA avec un anticorps anti-HA dans la fraction PSD, sous une stimulation excitotoxique. (C) Révélation de GluN2B par un anticorps anti-HA, après infection virale sous divers traitements dans la PSD. La détection a été faite avec le système LI-COR. (D) Ratios du fragment C-terminal dans la fraction PSD vs GluN2B complet, lors de différentes stimulations et après infection virale. La quantification des résultats est obtenue suite à la révélation avec le LI-COR (C).

Dans le même ordre d'idée, afin de confirmer la présence du fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B dans la fraction PSD, j'ai employé deux anticorps différents, qui sont tous deux spécifiques à cette sous-unité et susceptibles de reconnaître le fragment. J'ai également repris les mêmes échantillons qu'à la Figure 3.4.C où j'ai infecté les cellules avec un virus possédant une étiquette HA, à l'extrémité C-terminal de GluN2B, afin de comparer le fragment du rNMDA produit par le virus lors d'une stimulation excitotoxique à la population entière de fragment généré dans la cellule suite à l'application du glutamate. Ainsi, encore une fois, je détecte le fragment C-terminal seulement lorsque les cellules ont été stimulées par le glutamate et la glycine (Figure 3.5). D'autant plus que ce fragment C-terminal de GluN2B est révélé par deux autres anticorps différents, soit l'anticorps monoclonal spécifique à la terminaison cytoplasmique de GluN2B (Figure 3.5.C) et l'anticorps anti-GluN2B de chez Synaptic Systems (Figure 3.5.A). Ces résultats proposent donc qu'il y ait réellement un fragment qui existe dans la fraction PSD car il est détecté par 3 anticorps différents, si on compte l'anticorps anti-HA. De plus, l'analyse des données démontre que la stimulation au glutamate induit 10% de clivage de la sous-unité complète lors de la détection par l'anticorps provenant de chez Synaptic Systems (Figure 3.5.B) et 12% de clivage lorsque celui-ci est détecté par l'anticorps monoclonal contre la partie C-terminal de GluN2B (Figure 3.5.D). Il y a donc 2 à 4% de fragments supplémentaires, qui sont détectés avec les anticorps contre la sous-unité d'intérêt, après une stimulation au glutamate, que de fragment endogène généré par l'adénovirus et reconnu par l'anticorps anti-HA (8% de clivage). Ce qui est normal car le virus n'infecte pas toutes les cellules contenues dans le pétri lors de l'infection virale. Donc, il y a un certain pourcentage des cellules qui synthétise la sous-unité GluN2B sans l'étiquette HA à l'extrémité C-terminal.



**Figure 3.5. Détection du fragment C-terminal de GluN2B par différents anticorps.** (A) Révélation de GluN2B suite à une infection virale SEP-GluN2B-HA dans la fraction PSD avec un anticorps spécifique à la sous-unité en question provenant de chez synaptique Systems. (B) Ratios de GluN2B vs le fragment des résultats obtenus en A. (C) Détection du fragment C-terminal après infection virale avec un anticorps monoclonal contre GluN2B dans la fraction PSD après divers traitements. (D) Ratios de GluN2B complet vs le fragment C-terminal de GluN2B révélé dans la figure C. Les échantillons qui ont subi une infection virale sont marqués d'un "+" .

La stimulation excitotoxique génère un fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B dans la fraction PSD, mais celui-ci est de très faible quantité et à la limite de la détection par Western blot. C'est pourquoi j'ai fait l'analyse statistique du pourcentage de clivage obtenu lors des diverses expérimentations où je détectais le fragment C-terminal après la stimulation synaptique par le glutamate. Dans tous les cas, j'ai utilisé le système LI-COR lors de la détection étant donné que celui-ci est plus précis au niveau de la quantification des protéines détectées. J'ai également employé des antiprotéases et des antiphosphatases dans toutes les expériences de l'échantillonnage et j'ai normalisé la quantité de fragments induits par rapport à la sous-unité GluN2B complète spécifique à chaque condition afin d'éviter les variations causées par les cultures et le transfert de protéines. C'est avec un échantillonnage de 6 que je peux affirmer que le glutamate induit un fragment dans la fraction PSD, car l'étendue des données démontre que la stimulation induit en moyenne 11,0% de clivage et il peut s'étendre de 9,1% à 12,4%, alors que le contrôle se situe seulement entre 0,65% à 2,75 % de clivage d'autant plus que la valeur de p-value non-pairée est plus petit que 0,005. Par conséquent, la valeur de ces résultats est significative.



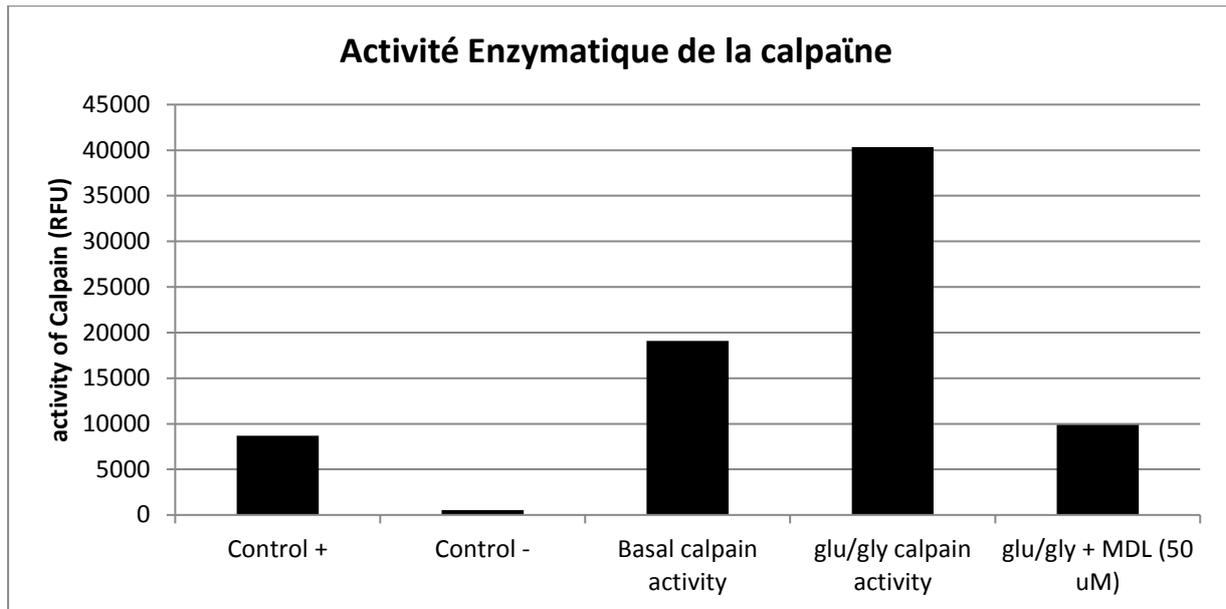
**Graphique 3.1. Analyse statistique de forme Box plot du pourcentage de clivage (Ratios de GluN2B complet vs fragment) de la sous-unité GluN2B induit par la stimulation au Glutamate dans la fraction PSD. \*p= 0,0022, n=6**

### **3.5. Implication de la calpaïne**

Le laboratoire de Lynch a non seulement découvert la présence d'un récepteur tronqué de la sous-unité GluN2B à ~115 kDa, mais ils ont aussi démontré que ce clivage est spécifique à l'activation de la calpaïne (Simpkins et al., 2003). Par contre, on ne connaît pas la forme de la calpaïne ( $\mu$  ou  $m$ ) participant à cette activité. J'ai donc approfondi les recherches à ce sujet.

#### **3.5.1 Activité enzymatique de la calpaïne**

Tout d'abord, j'ai analysé l'activité enzymatique de la calpaïne par fluorométrie sur les cultures de neurones corticaux de 14 jours. J'ai donc regardé l'activité enzymatique d'une culture contrôle afin de déterminer l'activité basale de la calpaïne. J'ai également observé l'activité de celle-ci suite à une stimulation excitotoxique par le glutamate et la capacité d'un inhibiteur des calpaïnes ( $\mu$ -calpaïne et  $m$ -calpaïne), le MDL 28170 (MDL), à inhiber l'activité de cette protéase lors d'une stimulation synaptique (Graphique 3.2). Les résultats démontrent une activité enzymatique assez élevée dans la condition basale, car il y a davantage d'activité perçue que le contrôle positif à l'endroit où j'ai appliqué directement la  $\mu$ -calpaïne activée avec le substrat, sans les cellules dans la réaction (Control -). De plus, une stimulation au glutamate permet d'activer deux fois plus de calpaïne que la condition basale ce qui est attendu, car cette stimulation induit l'ouverture des rNMDA et provoque un influx de calcium intracellulaire qui permet d'activer l'enzyme étudié. Finalement, l'inhibiteur de la calpaïne semble bien fonctionner, car il inhibe 75% de l'activité de la calpaïne lors d'une stimulation synaptique. Cependant, le MDL n'inhibe pas toute l'activité de cette protéase, seulement la moitié de l'activité basale (Graphique 3.2).

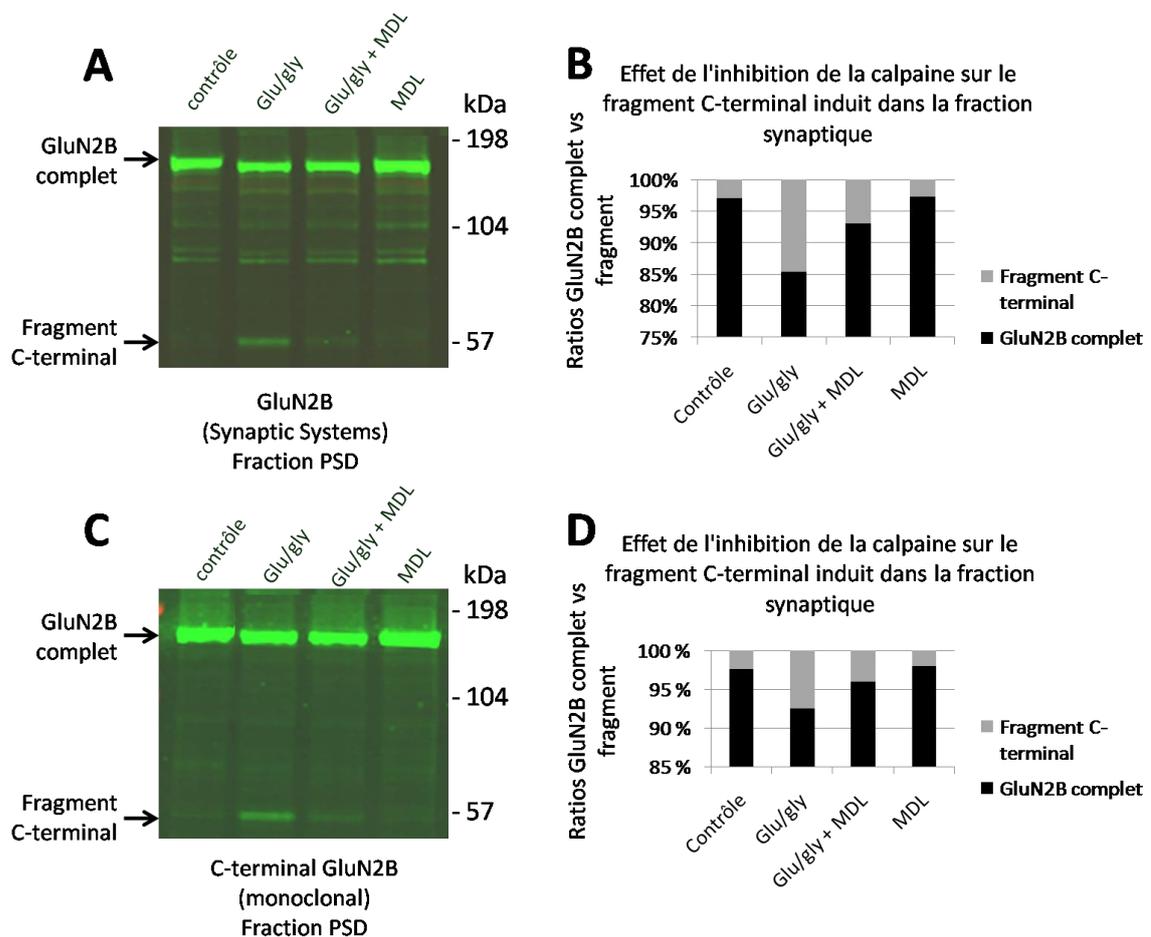


**Graphique 3.2. Activité enzymatique de la calpaïne en condition basale et lors d'une stimulation excitotoxique (Glu/gly). L'activité de la calpaïne a également été quantifiée par fluorimétrie lors de l'utilisation d'un inhibiteur de cette protéase (MDL).**

### 3.5.2 Inhibition de la calpaïne

Afin de relier directement la présence du fragment C-terminal qui se retrouve dans la fraction PSD à l'activité de la calpaïne, j'ai employé un inhibiteur de cette protéase afin d'observer son implication dans le clivage de la sous-unité GluN2B. J'ai donc induit le clivage de cette sous-unité par une stimulation excitotoxique tel que démontré dans les résultats antérieurs. J'ai également inséré une condition où j'ai stimulé les cellules corticales avec cette même stimulation, mais cette fois-ci, accompagnées de l'inhibiteur de la calpaïne, le MDL à 50  $\mu\text{M}$ . D'ailleurs, comme le montre le résultat précédent (Graphique 3.2), le MDL permet d'inhiber ~75% de l'activité de la calpaïne lors d'une stimulation synaptique. Je m'attends donc à ce que l'inhibiteur de la calpaïne empêche l'induction du fragment dans la fraction PSD (Figure 3.6). En effet, j'ai observé ce phénomène à l'aide de deux anticorps différents. Dans le premier cas, j'ai utilisé un anticorps spécifique à la sous-unité GluN2B de chez Synaptic Systems afin de détecter le fragment C-terminal et son inhibition par le MDL (Figure 3.6.A). Cet anticorps détecte un ratio de 15% du fragment induit par rapport à la sous-unité GluN2B complète et le MDL inhibe 50% de ce clivage, car la condition employant l'inhibiteur de la calpaïne lors de la stimulation au glutamate induit un ratio de 7% (Figure 3.6.B). Dans le second cas, la détection de GluN2B a été faite à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique à la terminaison cytoplasmique de la sous-unité

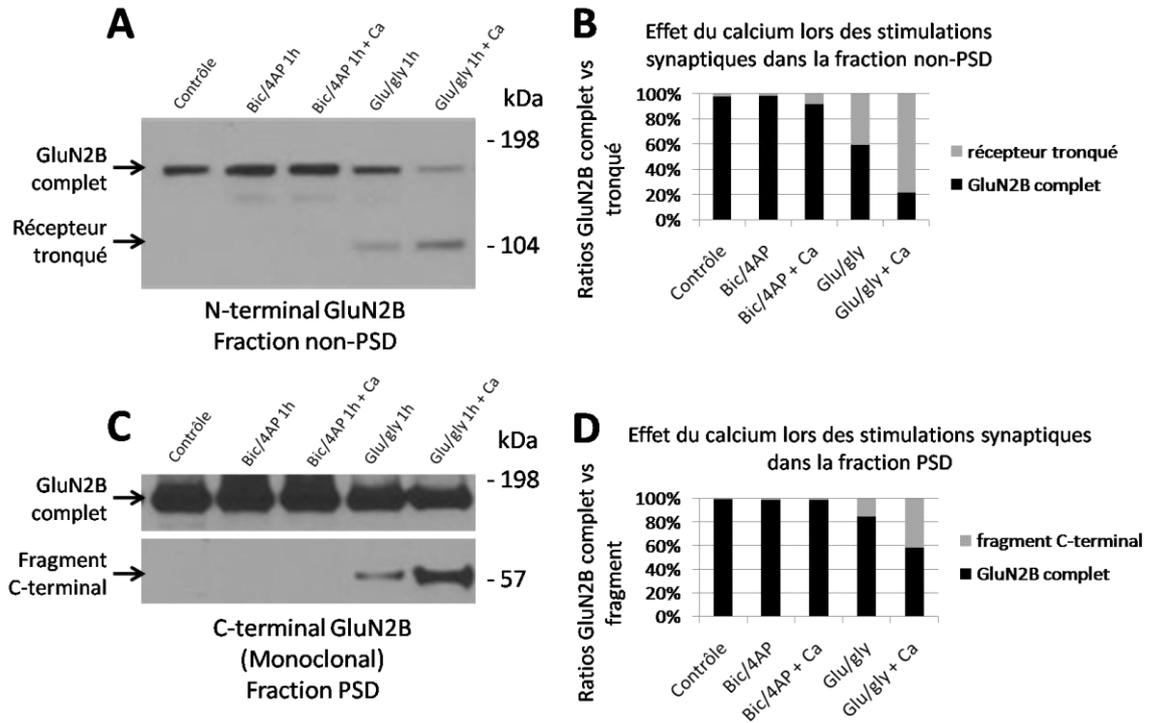
(Figure 3.6.C). On retrouve encore une fois le même patron, car la stimulation au glutamate provoque 8% de clivage et l'application du MDL permet d'inhiber 50% de ce ratio (Figure 3.6.D). Ainsi, la présence du fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B semble dépendant de l'activité de la calpaïne, car l'inhibition de cette protéase empêche en grande partie de générer ce fragment dans la fraction PSD d'autant plus que les résultats portés sur l'activité enzymatique de la calpaïne proposent que l'inhibiteur n'inactive pas toute l'activité de cette protéase, c'est pourquoi on retrouve une faible quantité de fragments dans la fraction PSD après une stimulation contenant le MDL.



**Figure 3.6. Effet de l'inhibition de la calpaïne sur le clivage de la sous-unité GluN2B.** (A) Détection de la sous-unité GluN2B avec l'anticorps de chez Synaptic Systems dans la fraction PSD après une stimulation au glutamate et l'application du MDL. (B) Ratios de GluN2B complet vs le fragment des résultats obtenu en A. (C) Révélation du fragment C-terminal de GluN2B avec l'anticorps monoclonal contre la sous-unité après une stimulation excitotoxique et l'inhibition de la calpaïne. (D) Ratios de la sous-unité GluN2B complète vs le fragment induit des résultats révéle en C.

### 3.5.3 Implication de la m-calpaïne

Selon la littérature, la grande augmentation de calcium intracellulaire lors des processus d'excitotoxicité provoque l'activation de facteurs proapoptotiques et de protéases qui engendrent à leurs tour la mort cellulaire. À cet égard, l'équipe de Baudry a démontré que l'activation des rNMDA extrasynaptiques induit l'activation de la m-calpaïne où celle-ci provoque la neurotoxicité en clivant la protéine STEP (Wang et al., 2013). C'est pourquoi, dans cette expérience, j'ai ajouté 2,5 mM de calcium lors des stimulations excitotoxiques, afin d'observer si cette hausse calcique génère davantage de fragments C-terminal dans la PSD lors de l'excitotoxicité produit par les rNMDA. J'ai également observé si cette élévation de calcium influençait l'induction du fragment dans la fraction PSD lors d'une stimulation provoquant la potentialisation à long terme. De plus, au cours de cette expérience, j'ai analysé la quantité de récepteurs tronqués induits dans la fraction non-PSD en utilisant un anticorps contre la partie N-terminal de la sous-unité GluN2B. Les résultats démontrent que seule la stimulation par le glutamate est en mesure de générer un récepteur tronqué. De plus, l'application de 2,5 mM de calcium permet d'augmenter la présence de cette troncature lors de la stimulation excitotoxique, mais aucun effet n'a été observé lors d'une stimulation par le Bic/4AP (Figure 3.7.A). Au contraire, cette stimulation semble augmenter la quantité de rNMDA complets à la membrane plasmique. D'ailleurs, le glutamate permet d'induire 40% de clivage de la sous-unité GluN2B complète par rapport au tronqué dans la fraction non-PSD et l'application du calcium lors de cette stimulation excitotoxique augmente davantage ce ratio, et ce, jusqu'à 80% (Figure 3.7.B). Ces résultats corrént avec les données obtenues dans la fraction PSD, car l'augmentation de calcium à 2,5 mM pendant la stimulation Glu/gly permet d'élever le taux de fragment C-terminal (Figure 3.7.C). En effet, l'analyse des données indique que le glutamate permet de générer ~15% de clivage et l'application du calcium au cours de cette stimulation élève le pourcentage à ~40% (Figure 3.7.D). Ainsi, ces données proposent que la m-calpaïne soit au cœur de ce processus, car l'élévation du calcium lors de la stimulation excitotoxique, génère davantage de fragments C-terminal à 60 kDa dans la fraction PSD et élève le taux de récepteur tronqué induit dans la fraction non-PSD.

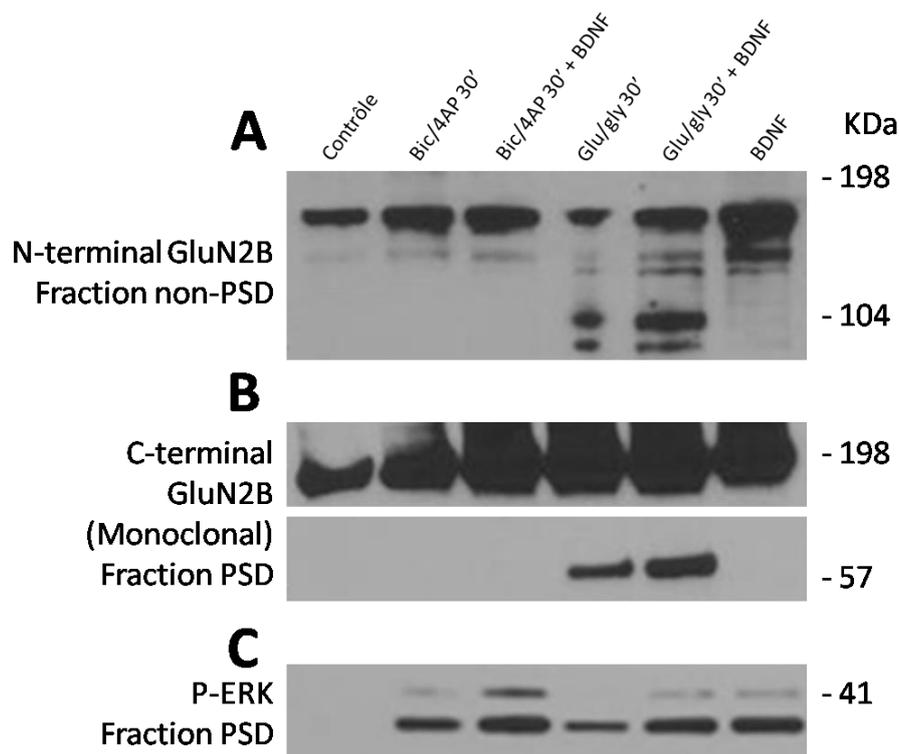


**Figure 3.7. Effet de l'augmentation du calcium sur le clivage de la sous-unité GluN2B.** (A) Détection de la terminaison extracellulaire (N-terminal) de GluN2B dans la fraction non-PSD suite à différentes stimulations synaptiques avec et sans 2,5 mM de calcium ajouté lors du traitement. (B) Ratios de GluN2B complet vs tronqué dans la fraction non-PSD après le supplément calcique (résultats obtenus en A). (C) Révélation du fragment C-terminal avec l'anticorps monoclonal dans la fraction PSD sous les mêmes conditions que présenté ci-dessus. (D) Ratios du fragment C-terminal obtenu en C vs GluN2B complet.

Afin de mettre en évidence l'implication de la m-calpaïne dans le clivage de la sous-unité GluN2B, j'ai observé l'effet du BDNF lors de la stimulation excitotoxique. J'ai utilisé cette molécule, car à ce jour, il n'existe pas d'inhibiteur de la m-calpaïne seulement ni de m-calpaïne active. Cependant, selon la littérature, la m-calpaïne serait activée par les facteurs neurotrophiques tel que le BDNF qui permet la phosphorylation de ERK et l'activation de cette forme de calpaïne (Glading., 2004). Dans cette expérience, j'ai analysé la fraction non-PSD avec un anticorps spécifique à la partie N-terminal de GluN2B et la fraction PSD avec un anticorps monoclonal contre la terminaison cytoplasmique de la sous-unité. Les résultats démontrent la présence d'un récepteur tronqué à ~110 kDa dans la fraction non-PSD lors de l'application du glutamate. Malheureusement, je ne peux pas affirmer que le BDNF induit davantage de récepteurs tronqués lors de la stimulation excitotoxique, car j'ai éprouvé des problèmes lors de la migration des protéines sur gel de polyacrylamide, ce qui rend cette condition non quantifiable. (Figure 3.8.A). Cependant, en vérifiant la fraction

PSD, je constate qu'il y a beaucoup plus de fragments générés lorsque j'applique le BDNF en même temps que la stimulation synaptique par le glutamate (Figure 3.8.B). Toutefois, en raison de l'intensité de la bande spécifique à la sous-unité complète, je ne peux pas établir un taux de clivage pour ce résultat, car l'intensité de la bande est trop saturée pour être quantifiable.

Par ailleurs, j'ai également analysé la phosphorylation de la voie ERK dans la fraction PSD, car il est connu que le BDNF induit la synthèse de protéine par l'activation de cette voie (Glading., 2004). En effet, l'application de cette molécule induit toujours une augmentation de la phosphorylation de cette voie par rapport à son contrôle respectif. Effectivement, il y a davantage de phosphorylation lors de la stimulation bic/4ap avec le BDNF que la condition utilisant cette stimulation, mais sans la molécule neurotrophique. Sans oublier que le même effet se reproduit lors de la stimulation excitotoxique par le glutamate employant le BDNF (Figure 3.8.C).



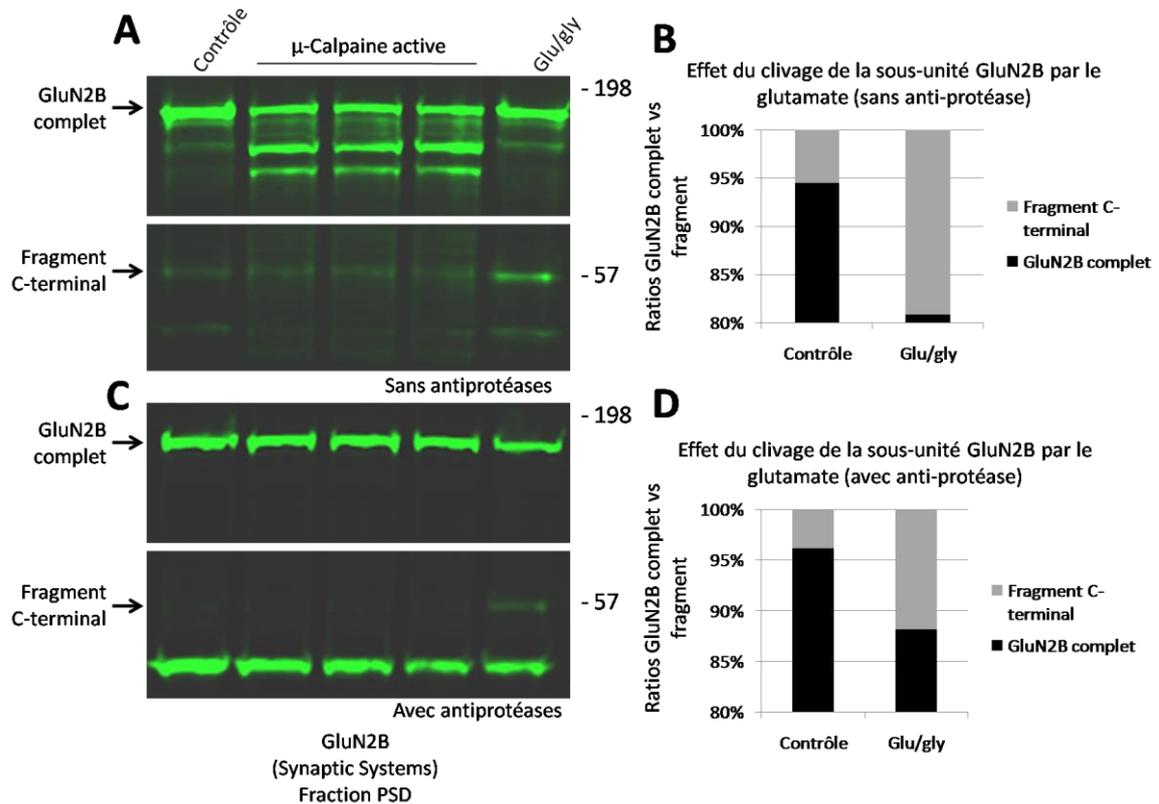
**Figure 3.8. Effet du BDNF sur le clivage de la sous-unité GluN2B.** (A) Détection de la partie extracellulaire (N-terminal GluN2B) dans la fraction non-PSD après différentes stimulations synaptiques avec ou sans BDNF. (B) Révélation du fragment C-terminal avec un anticorps monoclonal contre GluN2B dans la fraction PSD sous les mêmes conditions que présenté en A. (C) Phosphorylation de ERK dans les différentes conditions.

### 3.5.4 Implication de la $\mu$ -calpaïne

J'ai également analysé l'implication de la  $\mu$ -calpaïne dans le clivage de la sous-unité GluN2B. Pour ce faire, j'ai appliqué la  $\mu$ -calpaïne active sur la fraction PSD préalablement isolée afin d'induire le clivage de la sous-unité GluN2B *in vitro* et d'observer si un fragment à 60 kDa est généré. Lors de cette expérience, j'ai aussi étudié la capacité des antiprotéases à protéger la sous-unité GluN2B contre le clivage effectué dans l'éprouvette lors du fractionnement neuronal. Ainsi, dans un premier temps, j'ai isolé la fraction PSD sans mettre d'antiprotéases dans mes solutions d'extractions et par la suite, j'ai appliqué la  $\mu$ -calpaïne active afin d'induire le clivage de la sous-unité GluN2B. J'ai également comparé cette condition que j'ai effectuée en triplicata à la condition employant la stimulation Glu/gly (Figure 3.9.A). En effet, l'anticorps détecte un fragment à 60 kDa seulement lors de la stimulation par le glutamate. L'application de la calpaïne active n'induit pas plus de fragments dans la fraction PSD à 60 kDa que le contrôle. Cependant, il est clair que cette forme de calpaïne induit le clivage de la sous-unité GluN2B, car il y a induction de deux autres bandes, une à ~140 kDa et l'autre à ~124 kDa (Figure 3.9.A). Notamment, notre laboratoire a auparavant analysé la séquence de la sous-unité GluN2B et on y perçoit plusieurs sites potentiels de clivage par la calpaïne dont un à 144 kDa et l'autre à 125 kDa (Annexe 1). De plus, l'application des antiprotéases dans les solutions d'extractions permet de bien protéger la sous-unité GluN2B contre le clivage *in vitro* (Figure 3.9.C). En effet, lorsque ceux-ci sont utilisés, la  $\mu$ -calpaïne active n'est plus en mesure de cliver la sous-unité GluN2B. Par ailleurs, j'ai remarqué que l'utilisation des antiprotéases semble protéger une bande qui est reconnue par l'anticorps contre GluN2B à environ 45 kDa.

Durant cette expérience, j'ai utilisé les mêmes cultures afin de bien comparer le pourcentage de clivage de la sous-unité GluN2B généré par la stimulation au glutamate lorsqu'il y a présence des antiprotéases et lorsque ceux-ci sont absents. Dans le cas où ils sont absents, le contrôle démontre un ratio de 5% et la stimulation génère 19% (Figure 3.9.B). Dans le cas où ils sont présents, la stimulation synaptique induit 12% de clivage de la sous-unité GluN2B et le contrôle démontre un taux de 4% (Figure 3.9.D). Ainsi, les antiprotéases permettent de protéger la troncature de GluN2B en arrêtant toute l'activité de la calpaïne puisque dans le cas contraire, s'ils ne sont

pas désactivés, la calpaïne est en mesure de continuer de cliver la sous-unité en question résultant à une augmentation du taux de clivage d'environ 7%. L'utilisation des antiprotéases est donc essentielle afin d'inhiber tout clivage *in vitro* qui pourrait se faire lors de l'extraction de protéines.



**Figure 3.9. Activation de la  $\mu$ -calpaïne avec et sans antiprotéases dans les tampons d'extractions.** (A) Détection du clivage de GluN2B (anticorps: Synaptic Systems) par la  $\mu$ -calpaïne active *in vitro* lorsqu'il n'y a pas d'antiprotéases (A-P) dans les tampons d'extractions de protéines. (B) Ratios de GluN2B complet par rapport au fragment induit par le glutamate lorsqu'il n'y a pas d'antiprotéases (Résultats en A). (C) Révélation de la même expérimentation effectuée en A, mais avec des anti-protéases dans les tampons d'extractions. (D) Ratios de GluN2B complet vs le fragment induit par la stimulation au glutamate lorsqu'il y a présence des antiprotéases.

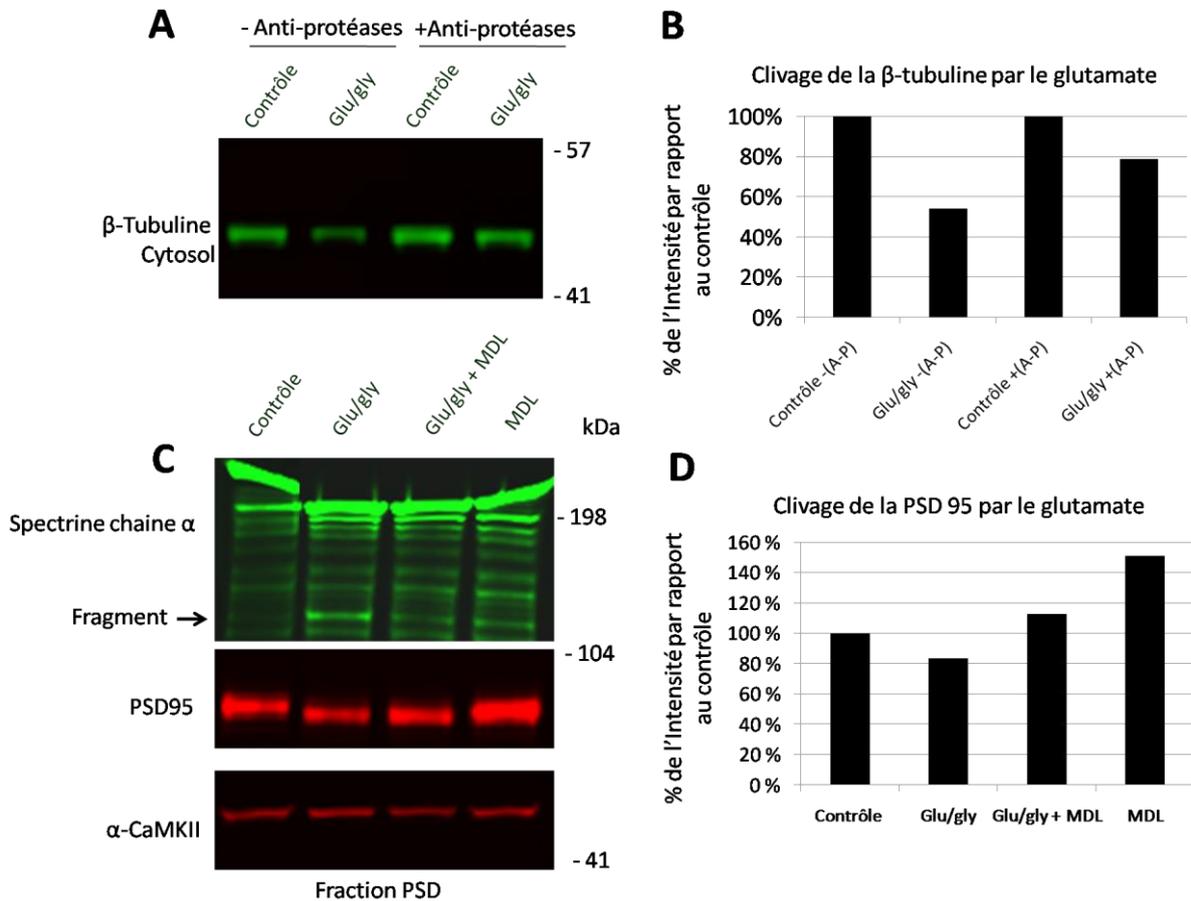
### 3.6. Clivage des protéines du cytosquelette

J'ai vérifié si l'activation de la calpaïne engendrait un réarrangement structurel des protéines du cytosquelette puisque, selon la littérature, une stimulation excitotoxique induit l'apoptose des cellules et donc, le clivage de plusieurs protéines de soutien par l'activation de la protéase d'intérêt (Momeni., 2011). Dans un premier temps, j'ai regardé si une stimulation au glutamate induisait le clivage de la  $\beta$ -tubuline dans le cytosol puisque c'est dans cette fraction que cette protéine est concentrée en neurofilament. Dans cette expérience, j'ai encore une fois analysé la capacité des antiprotéases à protéger le clivage fait *in vitro* lors de l'extraction des protéines (Figure 3.10.A). Les résultats démontrent que la  $\beta$ -tubuline est bien clivée lors d'une stimulation excitotoxique et les antiprotéases (A-P) permettent d'arrêter l'activité de ceux-ci lors du fractionnement neuronal. En effet, le pourcentage de clivage lorsque les A-P sont absents s'élève à 45% par la stimulation au glutamate alors que l'application des A-P génère un taux de clivage de ~23% (Figure 3.10.B). Malheureusement, dans cette expérience, je n'ai pas pu normaliser mes résultats avec une protéine contrôle étant donné que la plupart des protéines utilisées afin de vérifier la quantité de protéines (actine, GAPDH) sont clivées par la stimulation au glutamate.

De surcroît, j'ai vérifié si la spectrine était également clivée dans la fraction PSD lors de cette stimulation synaptique (Figure 3.10.C). En effet, cette stimulation induit un fragment spécifique à la spectrine à ~150 kDa et l'application du MDL semble protéger ce clivage, car le fragment détecté possède une intensité moindre que la bande révélée en glutamate/glycine. Cependant, la quantification de la chaîne  $\alpha$  complète est difficile à effectuer, car les grosses protéines ont davantage de difficulté à entrer dans le gel lors de la migration de protéines.

Finalement, j'ai aussi observé les conséquences d'une stimulation par le glutamate sur la PSD95 (Figure 3.10.C). Cette stimulation induit directement le clivage d'une partie de cette protéine d'échafaudage. En effet, la stimulation synaptique engendre une diminution du poids moléculaire et de l'intensité de la bande de 20% et le MDL semble protéger la PSD95 lorsqu'on analyse l'intensité de la bande révélée, mais le poids moléculaire reste moindre (Figure 3.10.D). J'ai également normalisé ces résultats avec

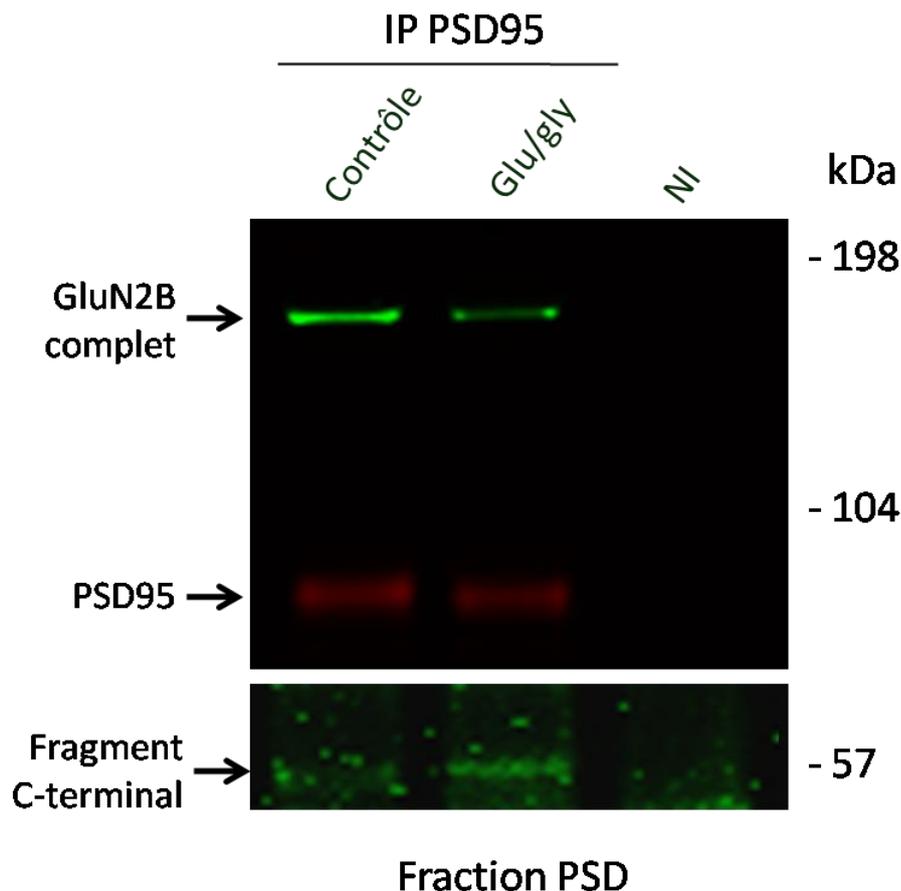
la CaMKII, car ceux-ci ont été révélés sur la même membrane suite à la migration sur gel.



**Figure 3.10. Clivage des protéines du cytosquelette par le glutamate.** (A) Détection de la β-Tubuline dans le cytosol lors d'une stimulation au glutamate avec et sans A-P. (B) Quantification de l'intensité de la β-Tubuline par rapport à son contrôle avec et sans A-P. (C) Détection de la Spectrine, la PSD95 et la α-CaMKII dans la fraction PSD sous une stimulation excitotoxique et l'inhibition de la calpaïne. (D) Quantification de l'intensité de la PSD95 observé en C. À noter qu'il y a des A-P dans tous les conditions à la figure en C.

### 3.7 Interaction entre la PSD95 avec la sous-unité GluN2B

Comme il est connu, la PSD95 permet de maintenir la sous-unité GluN2B à la synapse. J'ai donc analysé si une stimulation causant l'excitotoxicité induisait la dissociation de ces deux protéines. À l'aide d'une immunoprécipitation de la PSD95, j'ai regardé son interaction avec la sous-unité GluN2B complète. En effet, cette stimulation diminue l'interaction entre la PSD95 avec la sous-unité GluN2B complète à 170 kDa (Figure 3.11). J'ai également observé si le fragment C-terminal de GluN2B formait un complexe protéique avec la PSD95. Les résultats semblent être affirmatifs, mais difficiles à quantifier, car le "background" est assez élevé. Cependant, à vue d'œil, on constate la présence d'une bande de faible intensité dans la condition employant la stimulation excitotoxique (figure 3.11). Donc le fragment C-terminal de GluN2B resterait en interaction avec la PSD95 dans la fraction PSD.



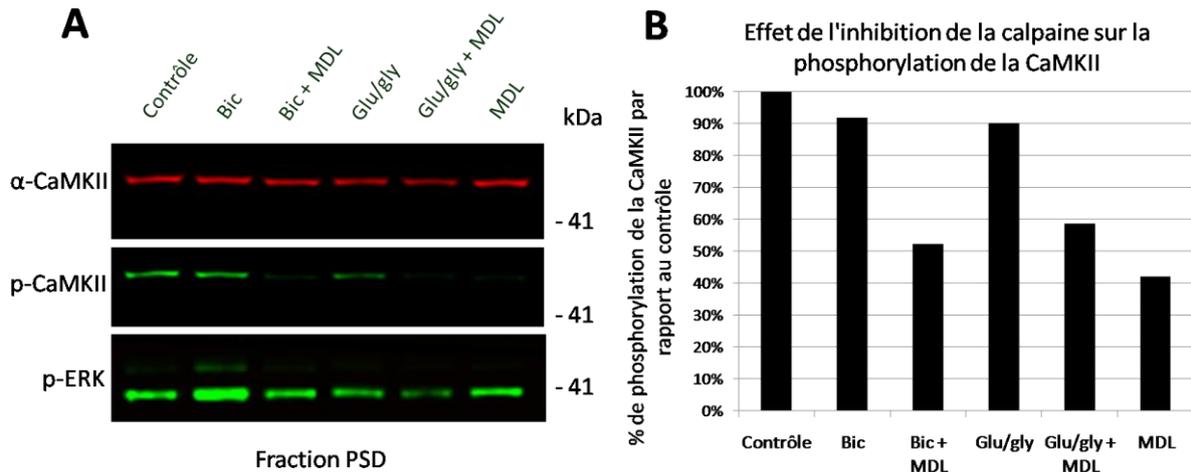
**Figure 3.11. Interaction entre la PSD95 et la sous-unité GluN2B.** Immunoprécipitation de la PSD95 et détection de la sous-unité GluN2B et de la PSD95 dans la fraction PSD après une stimulation par le glutamate. La condition NI correspond au contrôle négatif, où il n'y a pas anticorps contre la PSD95 sur la bille magnétique.

## **3.8. Implication de la CaMKII**

La CaMKII est une protéine essentielle dans la fonction synaptique et son interaction avec la sous-unité GluN2B lui permet de maintenir son activité afin d'assurer son rôle dans la fonction (Bayer et al., 2001). Ainsi, je me suis demandé quelles étaient les conséquences du clivage de la sous-unité en question sur la persistance de l'activité de la CaMKII.

### **3.8.1 Phosphorylation de la CaMKII**

Dans un premier temps, j'ai voulu analyser la phosphorylation de la  $\alpha$ -CaMKII au niveau de l'acide aminé Thréonine 286 lors d'une stimulation synaptique et l'importance de la calpaïne dans le maintien de cette autophosphorylation. J'ai donc induit une stimulation avec le bicuculline et une autre avec le glutamate afin d'observer si ces stimulations engendraient la phosphorylation de la kinase d'intérêt. Les résultats démontrent que sous ces stimulations, la CaMKII était phosphorylée, par contre il y avait 10% moins de phosphorylation que le contrôle (Figure 3.12.B). Par la suite, j'ai observé l'effet de l'inhibition de la calpaïne sur la phosphorylation de la CaMKII. L'inhibition de cette protéase inhibe en effet la phosphorylation de la p-CaMKII, car l'application du MDL lors de la stimulation par la bicuculline diminue la phosphorylation de la kinase de 50% (Figure 3.12.B). La stimulation par le glutamate avec le MDL, pour sa part, diminue la phosphorylation de 42% par rapport au contrôle et l'application de MDL seulement diminue celle-ci de 60%. De surcroît, la stimulation par la bicuculline provoque la phosphorylation de la voie ERK $\frac{1}{2}$  à 44 kDa, et le MDL inhibe cette phosphorylation à ce même poids moléculaire. Cette inhibition se compare d'ailleurs à la condition employant la stimulation par le glutamate et la glycine, car l'intensité de leur bande est très semblable.



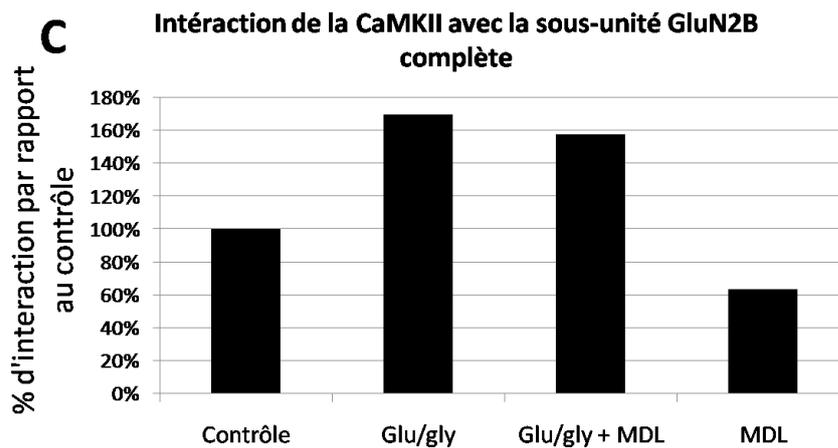
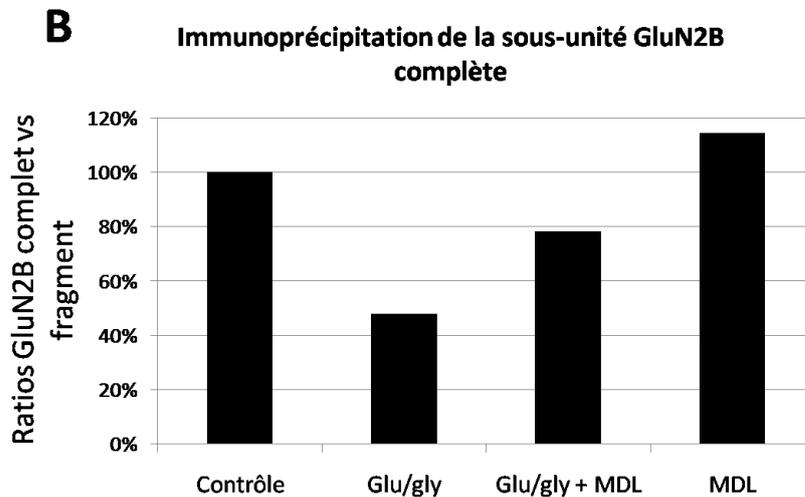
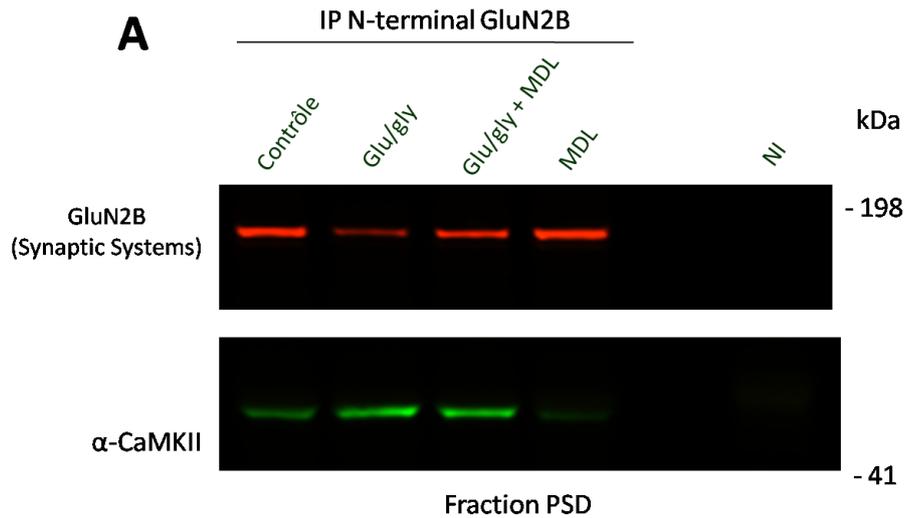
**Figure 3.12. Effet de l'inhibition de la calpaïne sur la phosphorylation de la CaMKII et la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ .** (A) Détection de la  $\alpha$ -CaMKII, la p-CaMKII et la p-ERK $\frac{1}{2}$  dans la fraction PSD sous divers traitements. (B) Pourcentage de phosphorylation de la CaMKII par rapport au contrôle lors des différentes stimulations enduites en A.

### 3.8.2 Interaction de la CaMKII avec la sous-unité GluN2B

Les résultats précédents ont démontré que la CaMKII est phosphorylée lors d'une stimulation par le glutamate et le MDL inhibe en partie cette phosphorylation. Par la suite, j'ai observé si ces conditions permettaient à la CaMKII d'interagir avec la sous-unité GluN2B, car il est connu que cette interaction induit la persistance de l'activité de la CaMKII à la synapse (Bayer et al., 2001). J'ai tout d'abord immunoprécipité la sous-unité GluN2B complète à l'aide d'un anticorps spécifique à la partie N-terminal de la sous-unité. J'ai également étudié la quantité de récepteurs complets qui était retenue par les billes magnétiques lors de cette expérience (Figure 3.13.A). Les résultats ont démontré le même patron que les expériences antérieures soit un clivage de la sous-unité GluN2B complète lors de la stimulation par le glutamate et l'inhibition, mais pas totalement, de ce clivage par l'application du MDL (Figure 3.13.B). Ainsi, je peux affirmer que les traitements ont bien fonctionné.

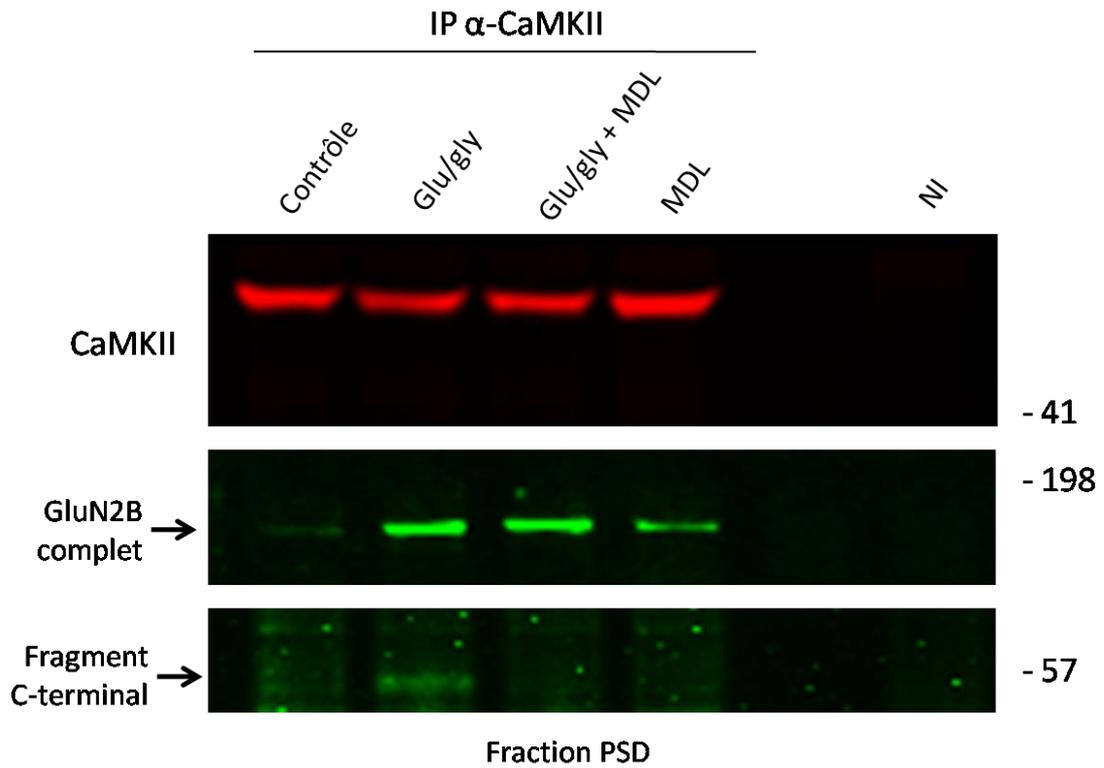
Par la suite, j'ai analysé l'interaction de  $\alpha$ -CaMKII avec la sous-unité GluN2B et les résultats dévoilent une augmentation de l'interaction entre ces deux protéines lors d'une stimulation par le glutamate (Figure 3.13.C). Cependant, dans cette expérience, je n'ai pas de contrôle permettant de voir la quantité de protéine dans chacune des conditions, je ne peux donc pas normaliser ce résultat. Il est toutefois évident que la

CaMKII interagit davantage avec la sous-unité GluN2B lors de la stimulation excitotoxique puisque la quantité de la sous-unité GluN2B complète révélée avec l'anticorps contre cette sous-unité détecte un clivage dans cette condition alors que l'anticorps contre la CaMKII démontre une augmentation de l'interaction sous cette stimulation (Figure 3.13.A). Ainsi, l'activation de tous les rNMDA permet à la CaMKII d'interagir avec la sous-unité GluN2B du récepteur en question. Cette interaction est importante dans le maintien de l'activité de la CaMKII et bien que le MDL ne semble pas empêcher cette interaction, les résultats démontrent tout de même une faible diminution lorsque cette drogue est appliquée (Figure 3.13.C).



**Figure 3.13. Interaction de la CaMKII avec la sous-unité GluN2B complète.** (A) Immunoprécipitation de la sous-unité GluN2B (extracellulaire N-terminal) et détection de GluN2B (Synaptic Systems) et de son interaction avec la CaMKII lors de différents traitements dans la fraction PSD. (B) Ratio de GluN2B complet vs le fragment induit par les différents traitements en A. (C) Pourcentage de l'interaction entre la sous-unité GluN2B et la CaMKII lors d'une stimulation par le glutamate et de l'inhibition de la calpaïne.

En se basant sur les résultats obtenus, la stimulation excitotoxique induit le clivage de la sous-unité GluN2B complète, laissant place à un fragment de ~60 kDa dans la fraction PSD. De plus, mes résultats suggèrent que cette stimulation induit une interaction entre la CaMKII et la sous-unité GluN2B et permet à celle-ci de rester phosphorylée. Suite à ces résultats, je me suis alors demandé si la CaMKII restait en interaction avec le fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B induit lors de la stimulation synaptique. C'est peut-être ce fragment qui permet à la CaMKII de rester phosphorylée, car l'inhibition de la calpaïne, donc l'inhibition du fragment induit, diminue l'activation de la kinase en question. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai immunoprécipité la CaMKII et j'ai regardé si celle-ci interagissait avec la sous-unité GluN2B complète et le fragment généré. En effet, la CaMKII interagit davantage avec la sous-unité GluN2B complète lors des stimulations au glutamate, ce qui certifie le résultat obtenu précédemment (Figure 3.14). De plus, le fragment C-terminal de GluN2B généré à 60 kDa interagit lui aussi avec la CaMKII lors de la stimulation excitotoxique par le glutamate (Figure 3.14). En outre, ce fragment n'est pas présent dans le contrôle négatif (NI), je peux donc affirmer que cette interaction a bel et bien lieu dans la fraction PSD et le MDL inhibe le fragment induit et donc l'interaction entre la CaMKII avec celui-ci. À noter que je n'ai pas pu effectuer la quantification de ces résultats préliminaires, car le "background" de la membrane est trop élevé en raison de la faible quantité de fragments générés dans la fraction PSD.



**Figure 3.14. Interaction de la CaMKII avec le fragment C-terminal de GluN2B.** Immunoprécipitation de la  $\alpha$ -CaMKII et détection de la CaMKII et de son interaction avec le fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B (Synaptic systems) dans la PSD lors d'une stimulation au glutamate et l'application du MDL. La condition NI correspond au contrôle négatif.

## Chapitre 4

### Discussion

Dans ce projet de recherche, j'ai voulu démontrer la présence du fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B dans le neurone, car des études antérieures ont constaté le clivage de la sous-unité complète, toutefois ils n'ont pas réussi à prouver qu'il y avait un fragment C-terminal de généré. Donc le but de mon projet était de mettre en évidence ce fragment induit par la calpaïne et ses possibles interactions avec d'autres protéines afin de comprendre son éventuelle fonction. C'est pourquoi, dans un premier temps, j'ai optimisé la technique de fractionnement neuronal afin de localiser le fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B du rNMDA dans le neurone. Dans le cadre de mon projet, cette méthode de fractionnement est très importante, car le produit de clivage généré par l'activation de la calpaïne induit une faible quantité de fragments C-terminal de GluN2B dans la totalité du cerveau. Il est donc nécessaire d'isoler et de purifier chacune des fractions du neurone afin de concentrer le produit de clivage du rNMDA.

Ainsi, j'ai commencé ce projet de maîtrise par la purification de la fraction PSD et non-PSD, car selon la littérature, la sous-unité GluN2B y serait principalement localisée (Papouin et al, 2012). J'ai optimisé la pureté de ces deux fractions à l'aide d'un tampon d'extraction des synaptosomes contenant 2% de triton à pH 8. L'augmentation du pH et de la concentration du triton permet de solubiliser davantage la synaptophysin dans la fraction non-PSD afin qu'il n'y ait plus de trace de celle-ci dans la fraction PSD et je me suis assurée que chacune des fractions soit enrichie avec leur protéine d'intérêt, soit la PSD95 et la synaptophysin.

Après ces ajustements dans la méthode de fractionnement neuronal, j'ai découvert le fragment tant recherché de la sous-unité GluN2B dans la fraction PSD où celui-ci était induit sous une stimulation causant l'excitotoxicité. Au départ, je m'attendais à ce que le processus de clivage ait une fonction dans la plasticité synaptique, où le fragment C-terminal induit jouerait le rôle d'une molécule mémoire comme la CaMKII. J'ai été

surprise de voir que celui-ci n'y était pas impliqué. Les résultats obtenus à la figure 3.8 nous donnent plus d'évidence, car le fragment n'est pas généré lors d'une stimulation avec la bicuculline et l'ajout de BDNF. Peut-être qu'il y en a un peu de généré et on le perd ou on ne peut le détecter, mais il semblerait que le clivage de la sous-unité GluN2B soit favorisé dans les processus d'excitotoxicité.

J'ai confirmé la toxicité de la stimulation employée en analysant la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$  et celle-ci inhibait en grande partie la phosphorylation de cette voie de synthèse protéique ce qui suggère l'activation des mécanismes de mort cellulaire et d'apoptose. J'ai également observé le récepteur tronqué de la sous-unité GluN2B à ~110 kDa dans la fraction non-PSD sous cette même stimulation (Figure 3.5). Ces résultats évoquent que l'activation de tous les rNMDA par le glutamate provoque effectivement le clivage de la sous-unité GluN2B, comme plusieurs études ont démontré auparavant (Simpkins et al., 2003). Cependant, mes résultats proposent la mobilité du récepteur tronqué où celui-ci se déplacerait de la fraction PSD à la fraction non-PSD par diffusion latérale après son clivage et le fragment resterait dans la fraction PSD. En effet, la quantité de récepteurs tronqués augmente lorsque le temps de stimulation est prolongé, on peut donc exclure le mécanisme d'internalisation de la sous-unité et sa dégradation, car autrement, on ne retrouverait plus la sous-unité GluN2B tronquée dans la fraction non-PSD. Cela contredit certaines recherches où ils proposent l'endocytose de celle-ci lors des processus d'excitotoxicité (Wu et al., 2017). Par contre, ces études n'utilisaient pas la technique de fractionnement neuronal lors de l'analyse de la sous-unité en question. Il est probable qu'ils associaient la diminution de la quantité de la sous-unité GluN2B dévoilée par Western blot au processus d'internalisation, car il n'était pas possible pour eux d'observer la présence du produit de clivage sans la technique de fractionnement neuronal d'où l'importance de l'optimisation de cette méthode.

De plus, tout comme les résultats que j'ai obtenus, l'équipe de Lynch a également observé l'induction d'un récepteur tronqué à ~115 kDa sous une stimulation par le glutamate et la glycine (Simpkins et al., 2003). En effet, ils ont analysé le pourcentage de clivage de la sous-unité GluN2B induisant le récepteur tronqué et ce chiffre s'élève à 45% pour 30 minutes de stimulation lorsque ce résultat est détecté par la méthode de Western blot utilisant la molécule HRP. Cela confirme la reproductibilité de mes manipulations, car dans les mêmes conditions expérimentales, j'ai dévoilé le récepteur

tronqué dans la fraction non-PSD avec un pourcentage de clivage de 40% après 15 minutes de stimulation et 50% pour 1h de traitement par le glutamate, où la valeur obtenue par le laboratoire de Lynch, 45% après 30 minutes (Simpkins et al., 2003), se situe parfaitement entre les valeurs que j'ai recueillies (figure 3.5).

D'autre part, je me suis assuré de la reproductibilité de mes résultats en détectant le fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B avec différents anticorps. Ceux-ci ont tous dévoilé la présence d'un fragment à 60 kDa dans la fraction PSD sous une stimulation induisant l'excitotoxicité. J'ai également confirmé l'induction du fragment par infection virale sur des cellules corticales de 14 jours avec un virus exprimant la sous-unité GluN2B possédant une étiquette HA sur sa terminaison cytoplasmique. J'ai une fois encore observé ce fragment lors d'une stimulation au glutamate, mais cette fois-ci avec un anticorps anti-HA.

Maintenant que j'ai atteint mon premier objectif qui était de trouver le fragment C-terminal de GluN2B, j'ai voulu relier l'induction de celui-ci à l'activité de la calpaïne. Pour ce faire, j'ai utilisé un inhibiteur des deux formes de calpaïne ( $\mu$  ou  $m$ ), le MDL, lors de la stimulation par le glutamate. Les résultats ont démontré que cette drogue diminuait le taux de clivage de 50%. Ce qui corrèle avec l'activité enzymatique de cette protéase lorsque celle-ci est activée par une stimulation employant le glutamate et inhibée avec le MDL. En effet, cette drogue ne permet pas d'inhiber toute l'activité enzymatique de la calpaïne, c'est pourquoi on retrouve un peu de clivage sous cette condition. Ainsi, cette enzyme semble être un joueur important dans l'induction du fragment, cependant afin de confirmer l'exactitude de son rôle, il serait nécessaire de reproduire l'expérience avec un inhibiteur qui permet d'empêcher toute l'activité enzymatique de cette protéase. Peut-être que l'augmentation de la concentration du MDL, lors de la stimulation par le glutamate, pourrait aider à cesser toute l'activité de celle-ci. Il serait également nécessaire de refaire cette manipulation avec un autre inhibiteur de la calpaïne, car il se pose toujours le problème de la spécificité des drogues utilisées.

Compte tenu de ces résultats, j'ai voulu savoir laquelle des deux formes de la calpaïne ( $\mu$  ou  $m$ ) était responsable du clivage de la sous-unité GluN2B. Mes résultats suggèrent l'implication de la  $m$ -calpaïne dans ce processus, car l'activation de celle-ci,

par l'augmentation de calcium (2,5 mM) lors de la stimulation par le glutamate, induit davantage de fragments C-terminal à 60 kDa. Il est connu que la m-calpaïne s'active lors de l'ouverture des rNMDA extrasynaptiques, ce qui augmente considérablement la concentration de calcium intracellulaire, mais cette concentration est toxique pour la cellule (Maravall M et al., 2000). Cependant, cette quantité de calcium active également la  $\mu$ -calpaïne. C'est pourquoi j'ai refait la même expérience, mais au lieu d'utiliser le calcium pour activer la m-calpaïne, j'ai utilisé le facteur neurotrophique BDNF, qui est connu lui aussi pour activer cette forme de protéase lors de la LTP par la phosphorylation de la voie ERK $\frac{1}{2}$ . Tout comme l'augmentation du calcium, l'ajout de BDNF permet l'induction d'une plus grande quantité de fragments intracellulaires à 60 kDa lors d'une stimulation excitotoxique, mais pas lors de la LTP, ce qui suggère l'implication de la m-calpaïne dans ce processus d'excitotoxicité. Malheureusement, nous n'avons pas trouvé d'inhibiteur spécifique de la m-calpaïne pour certifier ce résultat, la question reste à étudier en utilisant des constructions moléculaires visant à bloquer ou éteindre l'expression de la protéine endogène.

Dans le même ordre d'idée, j'ai également vérifié l'implication de la  $\mu$ -calpaïne dans le clivage de la sous-unité d'intérêt. Dans cette expérimentation, j'ai appliqué la  $\mu$ -calpaïne active *in vitro* sur une fraction PSD préalablement isolée. Les résultats n'ont pas dévoilé de fragment dans la synapse à 60 kDa sous l'activité de cette forme de calpaïne. Ainsi peut-on dire que cette dernière n'est pas impliquée dans ce processus. Par contre, il serait nécessaire de reproduire cette expérience avec une condition où j'ai stimulé les cellules avec le glutamate et une autre où j'ai appliqué la calpaïne active pendant cette stimulation afin de m'assurer qu'elle n'alimente pas l'induction du fragment lorsque le processus d'excitotoxicité est enclenché. De plus, dans cette expérience de calpaïne active *in vitro*, je n'ai peut-être pas retrouvé le fragment C-terminal à prime abord, mais la  $\mu$ -calpaïne a tout de même la possibilité de cliver la sous-unité GluN2B complète, car son activité induit deux produits de clivage qui sont reconnus par l'anticorps contre la sous-unité GluN2B, une à 124 kDa et l'autre à 140 kDa. Ces poids moléculaires correspondent eux aussi à des sites de clivage de la calpaïne retrouvés sur la queue C-terminal de la sous-unité étudiée (Annexe 1). Donc, cela suggère qu'il pourrait y avoir différents produits de clivage qui seraient générés lors de la transmission synaptique, tout dépendamment du type de calpaïne qui serait impliqué. À cet égard, j'ai également remarqué lors de mes expérimentations que les

antiprotéases protègent un fragment à 45 kDa qui est reconnu par l'anticorps contre la sous-unité GluN2B et lorsque les antiprotéases sont absentes, ce fragment semble se dégrader. Si celui-ci n'est pas un artefact, il pourrait potentiellement servir à la fonction synaptique, car il correspond au poids moléculaire du signal de localisation nucléaire (SLN) (Annexe1). Il serait intéressant d'approfondir les recherches à ce sujet.

J'ai également démontré les effets d'une stimulation par le glutamate sur le réarrangement structurel de l'épine dendritique, car mes résultats proposent le clivage de la spectrine et de la tubuline sous cette stimulation. Ce qui concorde avec la littérature, où l'augmentation de calcium, provoqué par l'ouverture de tous les rNMDA contenant la sous-unité GluN2B, devient toxique pour la cellule et cela active plusieurs protéases, dont la calpaïne. Celle-ci engendre le bris des protéines du cytosquelette et déclenche l'apoptose (Momeni et al., 2011). J'ai également observé les effets de l'inhibition de la calpaïne et le MDL permet de conserver l'intégralité de la spectrine sous sa forme à 280 kDa lors de l'application du glutamate et de la glycine. Par contre, il serait bien de refaire l'expérience avec un gel permettant une meilleure séparation des protéines de haut poids moléculaire afin de quantifier le pourcentage de clivage induit par le glutamate et celui inhibé par l'application du MDL. De plus, ces résultats sont très intéressants, car la queue C-terminal de la sous-unité GluN2B est connue pour interagir avec la spectrine et la tubuline (Wechsler A et al., 1998; Van Rossum et al., 1999). Ce qui suggère un rôle pour la sous-unité en question dans la régulation des composantes du cytosquelette. Par conséquent, l'induction du fragment doit nécessairement avoir un impact sur la structure de l'épine. Il serait pertinent de vérifier si ces protéines conservent leur interaction avec le fragment C-terminal après son clivage.

Je me suis également intéressé aux conséquences de l'excitotoxicité sur la protéine échafaudage PSD95. Étant donné son importance dans le maintien de la sous-unité GluN2B à la synapse. J'ai regardé si elle aussi était la cible de la calpaïne lors de la stimulation par le glutamate. En effet, les résultats ont démontré un taux de clivage qui s'élève à 20% sous cette condition et le MDL semble protéger cette hydrolyse. Subséquemment, j'ai analysé si l'interaction entre la PSD95 et la sous-unité GluN2B était conservée suite à son clivage, car les 7 derniers acides aminés de la queue C-terminal sont suffisants afin d'induire ce complexe protéique (Lim et al., 2002). Mes

résultats ont démontré la désunion entre la PSD95 et la sous-unité GluN2B complète lors de l'application du glutamate. Cela suggère que la sous-unité tronquée quitte la synapse par diffusion latérale, car celle-ci n'interagit plus avec la PSD95 dans ce compartiment neuronal. De plus, cela coïncide avec ce qui a été observé auparavant dans notre laboratoire, par des expériences de FRET-FLIM, où la stimulation par le glutamate provoquait la séparation de ces deux protéines et le MDL inhibait cette disjonction (Doré et al., 2014). De plus, il est démontré que la perturbation de l'interaction entre la PSD95 et la sous-unité GluN2B facilite le clivage de la sous-unité en question et c'est ce que j'observe lors de mes expérimentations (Yuen et al., 2008). Finalement, j'ai aussi regardé si le fragment C-terminal, généré par la calpaïne, maintenait son interaction avec la PSD95 après son clivage, car, comme mentionné ci-dessus, les 7 derniers acides aminés du fragment C-terminal suffisent afin d'induire une interaction avec la PSD95. Effectivement, mes résultats proposent que celui-ci conserve son interaction avec la protéine d'échafaudage afin de conserver le fragment C-terminal dans la PSD. Cependant, cette immunoprécipitation est à refaire avec plus de protéines dans le lysat de la fraction PSD lors de l'incubation des billes avec l'anticorps PSD95, car la bande révélée est à la limite de la détection par Western blot. Il serait également important de vérifier les conséquences de l'inhibition de la calpaïne sur la capacité de la PSD95 à interagir avec la sous-unité GluN2B.

D'autre part, j'ai aussi investigué la contribution de la CaMKII dans les mécanismes moléculaires de l'excitotoxicité. Dans un premier temps, j'ai regardé si cette stimulation induisait la phosphorylation de la CaMKII au niveau de l'acide aminé T286, car celle-ci est reconnue pour maintenir l'enzyme active (Bayer et al., 2001). En effet, cette stimulation détecte la phosphorylation de cette kinase. Cependant, l'ajout de l'inhibiteur de la calpaïne empêchait cette modification post traductionnelle ce qui propose un rôle pour celle-ci dans le maintien de l'activité de la kinase d'autant plus que cela coïncide avec la littérature, car un article avait auparavant démontré que cette protéase était essentielle au maintien de l'activité de la CaMKII en clivant son domaine auto-inhibiteur (Hajimohammadreza et al., 1997). De plus, l'inhibition de la calpaïne entrave également la phosphorylation de la voie ERK $\frac{1}{2}$ , ce qui est attendu, car cette voie est activée par l'autophosphorylation de la CaMKII. Celle-ci ne peut donc plus maintenir son activité lorsque la calpaïne est inhibée, il va de soi que la voie de synthèse protéique soit inhibée elle aussi.

Ensuite, j'ai vérifié si la CaMKII restait en interaction avec le fragment C-terminal de GluN2B suite à son clivage, car plusieurs recherches ont démontré l'importance de leur interaction dans le maintien de l'autophosphorylation de la kinase et ce, sans oublier que le site d'interaction de la CaMKII se retrouve sur le fragment induit à 60 kDa (Bayer et al., 2001). Cela dit, mes résultats suggèrent que ce fragment est responsable de l'activité autonome de la CaMKII, car celui-ci conserve son interaction avec la kinase en question dans la fraction PSD après l'application du glutamate. Ce nouveau résultat, qui n'a jamais été décrit dans la littérature, pourrait expliquer ce qui a été observé il y a un an lorsque l'équipe de Carvalho a démontré l'implication de la queue C-terminal dans la mort neuronale (Vieira et al., 2016). En fait, à l'aide d'une construction de plasmide de la sous-unité GluN2B ayant une mutation au niveau du site d'interaction avec la CaMKII, ils ont observé que cette mutation empêchait le processus de mort neuronal proposant un rôle pour ce complexe dans l'induction de ce mécanisme. De plus, ce même laboratoire a également fait la même expérience, mais avec la PSD95 où ils ont muté le site d'interaction pour cette protéine sur la queue C-terminal de GluN2B et cette mutation empêchait elle aussi la mort cellulaire après l'induction de l'excitotoxicité (Vieira et al., 2016). Ces informations proposent donc un rôle important pour ce fragment C-terminal dans les mécanismes d'excitotoxicité en formant un complexe avec la PSD95 et la CaMKII. Afin d'apporter un dernier argument au mécanisme proposé pour ce fragment, une autre étude a observé l'implication de la CaMKII phosphorylée à la T286 dans les processus d'excitotoxicité où son interaction avec la sous-unité GluN2B permet de conserver l'autophosphorylation de la CaMKII (Wang et al., 2014). Ils ont également utilisé le peptide Tat-GluN2B reconnu pour défaire l'association entre la CaMKII et la sous-unité GluN2B. Ce peptide s'est montré protecteur contre la mort cellulaire induite par le traitement excitotoxique de déprivation de glucose et d'oxygène. Ainsi, ce complexe semble être un élément crucial à l'induction de la mort neuronale créé par l'excitotoxicité des rNMDA.

En ce qui concerne les antiprotéases, il y a plusieurs études qui s'intéressent à l'activité de la calpaïne, cependant, celles-ci n'utilisent pas d'antiprotéase ni d'antiphosphatase. Au cours de mes recherches, j'ai observé l'importance de ces drogues, car leur absence permettait aux protéases de continuer leur activité enzymatique en clivant énormément de protéines lors de la lyse cellulaire. Afin d'inhiber tout clivage in vitro

par l'activation des protéases et d'observer seulement l'activation de ceux induits lors de la stimulation, je pense qu'il est nécessaire de mettre ces molécules dans toutes les solutions d'extractions, surtout lorsque le sujet à l'étude se concentre sur les effets d'une protéase. Les antiphosphatases sont également importantes lorsqu'on étudie une protéine phosphorylée. De plus, il est essentiel de conserver les échantillons à -80°C et d'éviter le gel / dégel, car autrement les protéases s'activent et peuvent continuer leur activité en clivant plusieurs protéines dont le rNMDA.

Les applications pratiques de ces méthodes comportent toutefois des limites. Pour commencer, je suis consciente que la technique de fractionnement neuronal n'est pas parfaite. Il peut y avoir de la contamination entre chacune des fractions même si j'ai tenté d'optimiser leur pureté. De plus, on ne connaît pas le pouvoir exact de chacun des détergents utilisés. En effet, il pourrait solubiliser des protéines des autres fractions, même si celles-ci semblent enrichies de leurs protéines d'intérêts. Au même titre, la présence des cellules gliales dans les cultures de neurones ne doit pas être négligée puisqu'elles assurent la régulation de l'activité neuronale par la libération de la D-sérine et la glycine. Du coup, lors de l'extraction de protéines, la présence de protéines spécifiques à ces cellules sont aussi extraites ce qui peut modifier le contenu en protéines exclusives à chacune des fractions neuronales. À cet égard, lors de l'optimisation du fractionnement, j'ai constaté la présence de Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) dans la fraction nucléaire (Résultat non montré). Par contre, les neurones n'ont pas la possibilité de proliférer, ce qui suggère que cette molécule est obtenue par les cellules gliales où ceux-ci ont la possibilité d'effectuer la division cellulaire. Ainsi, cette technique n'est pas optimale, mais elle m'a tout de même aidé à atteindre mes objectifs en me permettant de localiser l'endroit où se situe le fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B dans les neurones et d'amplifier sa concentration dans la fraction PSD.

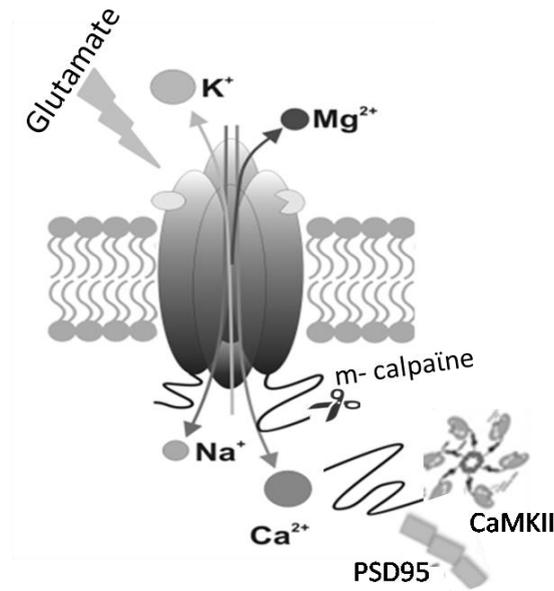
Une autre limite que j'ai constatée lors de mes expérimentations sont les cultures de neurones corticaux. J'utilise des cultures neuronales qui ont entre 12 à 15 jours d'incubation afin qu'il y ait principalement la sous-unité GluN2B qui y soit exprimée. Cependant, à cet âge les cultures deviennent très actives et le pH a tendance à devenir acide. Il est donc très important de changer le milieu constamment afin d'empêcher cette acidité, car un pH plus bas que 7 favorise la fermeture des rNMDA et diminue la

probabilité d'ouverture de ces canaux ioniques. Étant donné cette activité, je ne peux pas augmenter la densité de la culture neuronale afin d'obtenir plus de protéines dans mes différentes fractions lors du fractionnement neuronal. Lorsque j'augmente la densité, la culture devient acide plus rapidement et je ne peux plus l'utiliser aux âges souhaités. C'est pourquoi je suis toujours limitée en quantité de protéines lors de la détection du fragment C-terminal dans la fraction PSD et que celui-ci se retrouve à la limite de détection par Western Blot. Afin d'optimiser la technique, il faudrait utiliser des pétris de 150 mm au lieu de 100 mm lors de la préparation de la culture neuronale. Dans ces circonstances, les cellules auraient davantage de surface pour assurer leur activité, je pourrais donc augmenter la densité de la culture sans affecter l'acidité du milieu.

Je tiens également à souligner l'importance d'utiliser plusieurs anticorps afin de confirmer un résultat par Western blot, surtout si celui-ci n'a jamais été démontré. En ce qui me concerne, j'ai eu de la difficulté avec la spécificité de mon anticorps à reconnaître le fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B, car celui-ci détectait une bande très intense au poids moléculaire souhaité dans la fraction cytosolique (Annexe 2). Par contre, cette détection n'était pas spécifique au rNMDA, car avec le même anticorps, mais avec un numéro de lot différent, cet artefact n'y était plus dévoilé. C'est pourquoi, l'infection virale exprimant la sous-unité GluN2B avec une étiquette HA est une bonne alternative afin de confirmer la spécificité des anticorps utilisés.

Finalement, afin de mieux visualiser ce que mes résultats représentent et leur importance, j'ai fait un schéma représentatif de ceux-ci (Figure 3.2.). Mes données suggèrent le clivage de la sous-unité GluN2B lors du processus d'excitotoxicité et de la mort cellulaire. Ce clivage induisant un fragment à 60 kDa dans la synapse semble être effectué par la m-calpaïne, car la stimulation au glutamate provoque l'ouverture de tous les rNMDA ce qui augmente considérablement le calcium intracellulaire. Cette forme de calpaïne engendre aussi le bris des protéines du cytosquelette. Subséquemment, cette stimulation synaptique détecte également l'activité de la CaMKII où celle-ci semble rester en interaction avec le fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B induit à 60 kDa. De plus, mes résultats suggèrent que la stimulation excitotoxique clive aussi la protéine d'échafaudage PSD95 où celle-ci cesse d'interagir avec la sous-unité GluN2B complète. La séparation entre ces deux protéines induit

probablement la diffusion latérale de la forme tronquée de GluN2B. Cependant, en ce qui concerne le fragment C-terminal, lui il reste en complexe avec la PSD95 dans la synapse. Enfin, mes résultats proposent que le fragment obtenu lors de l'excitotoxicité forme un complexe protéique avec la PSD95 et la CaMKII dans la synapse où il pourrait fort possiblement contribuer aux mécanismes de la mort cellulaire et à plusieurs pathologies en maintenant l'activité de la CaMKII.



**Figure 4.1. Schéma représentatif de l'induction du fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B par la m-calpaïne lors d'une stimulation excitotoxique et de ses interactions avec la PSD95 et la CaMKII.**

Compte tenu de ce qui précède, il serait intéressant d'investiguer davantage à ce sujet, car la formation de ce complexe protéique avec le fragment C-terminal, la CaMKII et la PSD95 n'a jamais été observé auparavant puisque le fragment n'avait pas été perçu. Il serait important de confirmer les résultats obtenus avec un système plus représentatif de la réalité comme des tranches organotypiques de cortex. Il serait également nécessaire d'analyser les conséquences de ce clivage par une construction de plasmide de la sous-unité GluN2B possédant une mutation au site de clivage par la calpaïne, où celle-ci ne peut plus engendrer le fragment C-terminal de GluN2B. Il faudrait également examiner les potentiels effets protecteurs de cette construction par l'injection d'un virus exprimant cette construction *in vivo* et procéder à l'analyse optique

afin de mieux comprendre le rôle du fragment C-terminal et les répercussions qu'il provoque lorsqu'il s'associe avec la CaMKII et la PSD95 lors de la mort cellulaire.

# Chapitre 5

## Conclusion

La transmission synaptique est un processus indispensable pour la formation de la mémoire et la plasticité qu'elle engendre est assurée par l'activation appropriée des récepteurs NMDA. Dès lors, la suractivation de ces canaux ioniques produisent d'importantes conséquences sur les fonctions physiologiques tout particulièrement les rNMDA contenant la sous-unité GluN2B, car ils sont principalement responsables de la concentration de calcium intracellulaire. Lorsque cette concentration en calcium est trop élevée, cela déclenche certains mécanismes responsables de la mort cellulaire et de plusieurs pathologies. Bien qu'il ait de nombreuses études sur la biologie de ce processus, leur compréhension reste très complexe, c'est pourquoi il est important de bien connaître le rôle des molécules impliquées afin de démystifier son fonctionnement.

Dans ce projet de recherche, je suis parvenu à élucider une pièce de ce laborieux casse-tête. En effet, j'ai démontré la présence du fragment C-terminal de la sous-unité GluN2B dans la synapse à l'aide de la technique de fractionnement neuronal que j'ai optimisée. Ce qui m'a permis d'atteindre mon premier objectif. De même, j'ai confirmé que le fragment était occasionné sous l'activité de la calpaïne lors de l'excitotoxicité. J'ai également constaté que celui-ci restait en interaction avec la CaMKII et la PSD95 suite à son clivage, ce qui n'avait jamais été établi d'autant plus que cette union s'avère très importante dans l'induction de la mort cellulaire puisque l'activité de la CaMKII semble être maintenue par ce fragment.

Il est évident que les recherches basées sur la présence et les interactions du fragment C-terminal de GluN2B dans la fonction synaptique vont changer la compréhension du récepteur NMDA. Il sera nécessaire d'approfondir cette hypothèse et si celle-ci s'avère concluante, cela pourrait constituer une avancée majeure pour le traitement de certaines maladies. En effet, l'inhibition de la formation du complexe protéique composé du fragment C-terminal, de la CaMKII et de la PSD95 pourrait avoir un effet

protecteur sur l'intégrité du neurone ce qui permettrait de prévenir la dégénérescence de certaines maladies neurologiques telles que l'Alzheimer et la maladie de Huntington qui sont toutes deux causées par des mécanismes d'excitotoxicité.

## Bibliographie

- Albert**, B. Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.(2007). Molecular Biology of the Cell. *Taylor & Francis Group*, 2007, 1503 pages.
- Araya**, R. Vogels T., Yuste R. (2014). Activity-dependent dendritic spine neck changes are correlated with synaptic strength. *PNAS* 111 no 28, E2895-E2904 .
- Bard**, L., and Groc, L. (2011). Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor. *Mol Cell Neurosci* 48, 298-307.
- Barria**, A., and Malinow, R. (2002). Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 35, 345-353.
- Baudry**, M, Chou MM, Bi X. (2013). Targeting calpain in synaptic plasticity. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2013;17(5):579-592.
- Bayer**, K.U., De Koninck, P., Leonard, A.S., Hell, J.W., and Schulman, H. (2001). Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* 411, 801-805.
- Bellone**, C., and Nicoll, R.A. (2007). Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron* 55, 779-785.
- Bennett**, V. (1990). Spectrin: a structural mediator between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 2, 51-56.
- Bramham**, C.R., and Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76, 99-125.
- Cong**, J., Goll, D.E., Peterson, A.M., and Kapprell, H.P. (1989). The role of autolysis in activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J Biol Chem* 264, 10096-10103.
- Cui**, Y., Jin, J., Zhang, X., Xu, H., Yang, L., Du, D., Zeng, Q., Tsien, J.Z., Yu, H., and Cao, X. (2011). Forebrain NR2B overexpression facilitating the prefrontal cortex long-term potentiation and enhancing working memory function in mice. *PLoS One* 6, e20312.
- Cull-Candy**, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11, 327-335.
- Dingledine**, R., Borges, K., Bowie, D. and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews* 51, 7-61.
- Dore**, K., Labrecque, S., Tardif, C., and De Koninck, P. (2014). FRET-FLIM investigation of PSD95-NMDA receptor interaction in dendritic spines; control by calpain, CaMKII and Src family kinase. *PLoS One* 9, e112170.

- Drachman, D** (2005). "Do we have brain to spare?". *Neurology*. 64 (12): 2004–5.
- Erreger, K., Geballe, M.T., Dravid, S.M., Snyder, J.P., Wyllie, D.J., and Traynelis, S.F.** (2005). Mechanism of partial agonism at NMDA receptors for a conformationally restricted glutamate analog. *J Neurosci* 25, 7858-7866.
- Fukaya, M., Kato, A., Lovett, C., Tonegawa, S., and Watanabe, M.** (2003). Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4855-4860.
- Giese, K.P., Fedorov, N.B., Filipkowski, R.K., and Silva, A.J.** (1998). Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279, 870-873.
- Glading, A., Bodnar, R.J., Reynolds, I.J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D.A., Blair, H.C., and Wells, A.** (2004). Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol* 24, 2499-2512.
- Glees, P.** (2005). *The Human Brain*. Cambridge University Press, 2005, 204 pages.
- Greene, J.G., and Greenamyre, J.T.** (1996). Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* 48, 613-634.
- Gustin, R.M., Shonesy, B.C., Robinson, S.L., Rentz, T.J., Baucum, A.J., 2nd, Jalan-Sakrikar, N., Winder, D.G., Stanwood, G.D., and Colbran, R.J.** (2011). Loss of Thr286 phosphorylation disrupts synaptic CaMKIIalpha targeting, NMDAR activity and behavior in pre-adolescent mice. *Mol Cell Neurosci* 47, 286-292.
- Hajimohammadreza, I., Raser, K.J., Nath, R., Nadimpalli, R., Scott, M., and Wang, K.K.** (1997). Neuronal nitric oxide synthase and calmodulin-dependent protein kinase IIalpha undergo neurotoxin-induced proteolysis. *Journal of neurochemistry* 69, 1006-1013.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., and Bading, H.** (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5, 405-414.
- Harris, A.Z., and Pettit, D.L.** (2008). Recruiting extrasynaptic NMDA receptors augments synaptic signaling. *J Neurophysiol* 99, 524-533.
- Henley, JM, Wilkinson KA** (2013). AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2013;15(1):11-27.
- Herman, M.A., and Jahr, C.E.** (2007). Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J Neurosci* 27, 9736-9741.

- Ivanov**, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y., and Medina, I. (2006). Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of physiology* 572, 789-798.
- Kim**, D.Y., Kim, S.H., Choi, H.B., Min, C., and Gwag, B.J. (2001). High abundance of GluR1 mRNA and reduced Q/R editing of GluR2 mRNA in individual NADPH-diaphorase neurons. *Molecular and cellular neurosciences* 17, 1025-1033.
- Kristensen**, A.S., Jenkins, M.A., Banke, T.G., Schousboe, A., Makino, Y., Johnson, R.C., Haganir, R., and Traynelis, S.F. (2011). Mechanism of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. *Nat Neurosci* 14, 727-735.
- Kutsuwada**, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., *et al.* (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358, 36-41.
- Le Meur**, K, Galante M, Angulo MC, Audinat E. Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate of non-synaptic origin in the rat hippocampus. *J Physiol.* 2007;580:373–383.
- Leonard**, A.S., Lim, I.A., Hemsworth, D.E., Horne, M.C., and Hell, J.W. (1999). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3239-3244.
- Lim**, IA., Hall DD, Hell JW (2002). Selectivity and promiscuity of the first and second PDZ domains of PSD-95 and synapse-associated protein 102. *J Biol Chem.* 2002;277:21697–711
- Lisman**, J., and Raghavachari, S. (2006). A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2006, re11.
- Lu**, W., Shi, Y., Jackson, A.C., Bjorgan, K., During, M.J., Sprengel, R., Seeburg, P.H., and Nicoll, R.A. (2009). Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 62, 254-268.
- Lynch**, G., and Baudry, M. (1984). The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* 224, 1057-1063.
- Maravall**, M., Mainen, Z.F., Sabatini, B.L., and Svoboda, K. (2000). Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys J* 78, 2655-2667.
- Mierau**, S.B., Meredith, R.M., Upton, A.L., and Paulsen, O. (2004). Dissociation of experience-dependent and -independent changes in excitatory synaptic transmission during development of barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15518-15523.

- Momeni HR.** Role of Calpain in Apoptosis. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2011;13(2):65-72.
- Nieoullon, A.** (2010) Neurobiologie cellulaire et moléculaire. EMC (Elsevier Massin SAS, Paris), Neurologie, 17-003-A-10,2010
- Okamoto, K., Narayanan, R., Lee, S.H., Murata, K., and Hayashi, Y.** (2007). The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6418-6423.
- Opazo, P., Labrecque, S., Tigaret, C.M., Frouin, A., Wiseman, P.W., De Koninck, P., and Choquet, D.** (2010). CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* 67, 239-252.
- Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.** (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125, 775-784.
- Papouin T., L. Ladepeche.** (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists *Cell*, 150 (3) (2012), pp. 633–646
- Papouin, T, Oliet SHR.** (2014). Organization, control and function of extrasynaptic NMDA receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014;369(1654):20130601. doi:10.1098/rstb.2013.0601.
- Petralia, R.S., Wang, Y.X., Hua, F., Yi, Z., Zhou, A., Ge, L., Stephenson, F.A., and Wenthold, R.J.** (2010). Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* 167, 68-87.
- Purves, D.** (2005). Neurosciences. *De boek supérieur*, 2005-07-12, 840 pages
- Rauner, C., and Kohr, G.** (2011). Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *J Biol Chem* 286, 7558-7566.
- Roberts, E.B., and Ramoa, A.S.** (1999). Enhanced NR2A subunit expression and decreased NMDA receptor decay time at the onset of ocular dominance plasticity in the ferret. *J Neurophysiol* 81, 2587-2591.
- Roche, K.W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M.D., and Wenthold, R.J.** (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* 4, 794-802.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., and Stevens, C.F.** (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science (New York, NY)* 280, 1596-1599.
- Rust, MB, Gurniak CB, Renner M, et al.** (2010) Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *The EMBO Journal*. 2010;29(11):1889-1902.

- Schinder**, A.F., Olson, E.C., Spitzer, N.C., and Montal, M. (1996). Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 16, 6125-6133.
- Sheng**, M, Kim E. (2011) The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(12):a005678.
- Sheng**, M., Cummings, J., Roldan, L.A., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368, 144-147.
- Simpkins**, K.L., Guttman, R.P., Dong, Y., Chen, Z., Sokol, S., Neumar, R.W., and Lynch, D.R. (2003). Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *J Neurosci* 23, 11322-11331.
- Spruston**, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev, Neurosci*, 9(3), 206-221.
- Stout**, A., K., Y. Li-Smerin t, J. W. Johnson t and I. J. Reynolds. (1996) Mechanisms of glutamate-stimulated Mg<sup>2+</sup> influx and subsequent Mg<sup>2+</sup> efflux in rat forebrain neurones in culture. *Journal of Physiology* , 492.3, pp.641-657
- Triller**, A., and Choquet, D. (2005). Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends Neurosci* 28, 133-139.
- Tritsh**, D. (1999). Physiologie du neurone. *Wolters kluwer France*. 715 pages
- van Rossum**, D., Kuhse, J., and Betz, H. (1999). Dynamic interaction between soluble tubulin and C-terminal domains of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Neurochem* 72, 962-973.
- Vicini**, S., Wang, J.F., Li, J.H., Zhu, W.J., Wang, Y.H., Luo, J.H., Wolfe, B.B., and Grayson, D.R. (1998). Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* 79, 555-566.
- Vieira**, M.M., Schmidt, J., Ferreira, J.S., She, K., Oku, S., Mele, M., Santos, A.E., Duarte, C.B., Craig, A.M., and Carvalho, A.L. (2016). Multiple domains in the C-terminus of NMDA receptor GluN2B subunit contribute to neuronal death following in vitro ischemia. *Neurobiology of disease* 89, 223-234.
- von Engelhardt**, J., Coserea, I., Pawlak, V., Fuchs, E.C., Kohr, G., Seeburg, P.H., and Monyer, H. (2007). Excitotoxicity in vitro by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology* 53, 10-17.
- Vosler**, PS., Brennan CS, Chen J. (2008) Calpain-Mediated Signaling Mechanisms in Neuronal Injury and Neurodegeneration. *Molecular neurobiology*. 2008;38(1):78-100.

- Wang**, Y., Briz, V., Chishti, A., Bi, X., and Baudry, M. (2013). Distinct roles for mu-calpain and m-calpain in synaptic NMDAR-mediated neuroprotection and extrasynaptic NMDAR-mediated neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 18880-18892.
- Wang**, N., Chen, L., Cheng, N., Zhang, J., Tian, T., and Lu, W. (2014). Active calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates NMDA receptor mediated postischemic long-term potentiation (i-LTP) by promoting the interaction between CaMKII and NMDA receptors in ischemia. *Neural plasticity* 2014, 827161.
- Wang**, Y., Zhu, G., Briz, V., Hsu, Y.T., Bi, X., and Baudry, M. (2014). A molecular brake controls the magnitude of long-term potentiation. *Nature communications* 5, 3051.
- Wechsler**, A., and Teichberg, V.I. (1998). Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *EMBO J* 17, 3931-3939.
- Wu**, Y., Chen C, Yang Q, Jiao M, Qiu S. (2017) Endocytosis of GluN2B-containing NMDA receptor mediates NMDA-induced excitotoxicity. *Molecular Pain*. 2017;13:1744806917701921.
- Wyllie**, DJA, Livesey MR, Hardingham GE (2013). Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology*. 2013;74:4-17. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.01.016.
- Xu**, J., Kurup P, Zhang Y, et al. (2009). Extrasynaptic NMDA Receptors Couple Preferentially to Excitotoxicity via Calpain-mediated Cleavage of STEP. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(29):9330-9343. doi:10.1523/JNEUROSCI.2212-09.2009.
- Yashiro**, K., and Philpot, B.D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55, 1081-1094.
- Yu**, L, Rostamiani K, Hsu Y-T, Wang Y, Bi X, Baudry M. (2011). Calpain-mediated regulation of stargazin in adult rat brain. *Neuroscience*. 2011;178:13-20. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.01.026.
- Yuen** EY, Ren Y, Yan Z. (2008). PSD-95 and Calcineurin Control the Sensitivity of NMDA Receptors to Calpain Cleavage in Cortical Neurons. *Molecular pharmacology*. 2008;74(2):360-370. doi:10.1124/mol.108.046813.
- Zadran**, S., Akopian, G., Zadran, H., Walsh, J., and Baudry, M. (2013). RVG-mediated calpain2 gene silencing in the brain impairs learning and memory. *Neuromolecular medicine* 15, 74-81.

- Zhong**, J., Russell S. L., Pritchett D. B., Molinoff P. B., Williams K. (1994). Expression of mRNAs encoding subunits of the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* 45 846–853
- Zhou**, X., Hollern, D., Liao, J., Andrechek, E., and Wang, H. (2013). NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell Death Dis* 4, e560.
- Zhou**, Y., Takahashi, E., Li, W., Halt, A., Wiltgen, B., Ehninger, D., Li, G.D., Hell, J.W., Kennedy, M.B., and Silva, A.J. (2007). Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning. *J Neurosci* 27, 13843-13853.

## Annexe 1

Cleavage of NR2B by calpain

If cleavage at position 677-678: Nterm-77kDa /Cterm: 90kDa

If cleavage at position 884-885: Nterm-99kDa /Cterm: 67kDa

If cleavage at position 1019-1020: Nterm-114kDa /Cterm: 52kDa

If cleavage at position 1090-1091: Nterm-122kDa /Cterm: 44kDa

If cleavage at position 1111-1112: Nterm-125kDa /Cterm: 41kDa

If cleavage at position 1278-1280: Nterm-144kDa /Cterm: 22kDa

**MGVCSGKPGMVFSISR**GIYSCIHGVAIEERQSVMNSTPATMNNTHSN**ILR** 900  
last trans-mb domain 100/65kDa  
**LLRTAK**NMANL**SGVNGS**PQSALDFIRRESSVYDI**SEHRRS**FTHSDCKSYN 950

NPPCEENLFSDYI**SEVERT**FGNLQLKDSNVYQDHYHHHRPHSIGSTSSI 1000  
DGLYDCDNPPFTTQP**RSISKKPL**DIGLPSSKHSQSLSDLYGKFSFKSDRYS 1050  
114/52 kDa

GHDDLIRSDVSDISTHTVTYGNIEGNAA**KRRK**QQYK**DSLKKRPASAKSRR** 1100 **NLS**  
123/43kDa

EFDEIEL**AYRRRPP**RSPDHK#RYFRDKEGLRDFYLDQFRTKENS~~PHWEHVD~~ 1150  
125/41 kDa

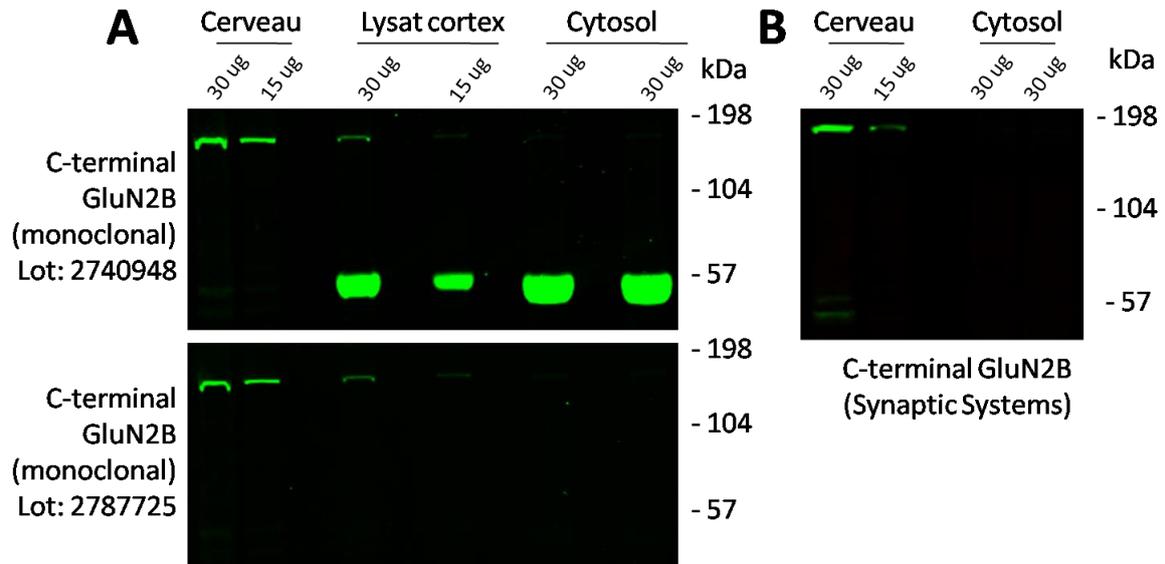
~~LTDIYKERSDDFKRDSVSGGGPCTNRSHLKHGTGEKHHGVVGGVPAPWEKN~~ 1200  
~~LTNVDWEDRSGGNFCRSCPSKLNYSSTVAGQNSGRQACIRCEACKAGN~~ 1250  
~~LYDISEDNSLQELDQPAAPVA\*\*VTSN~~(ha)ASSTKYPSPTNSKAQ**KKNRNKLRR** 1300  
142/23 kDa

**QHSYDTEV**D**LQ\*\*KEEAALA**PRSVSLKDKGRFMDGSP**Y**AHMFEMPAGESSEFA 1350  
147/18.6 kDa Fyn phosphorylation

~~NKSSVPTAGHHHNNPGSGYMLSKSLYPDRVTQNPFIPTFGDDQCLLHGSK~~ 1400  
~~SYFFRQPTVAGASKTRPDFRALVTNKPVVVTLHGAVPGRFQKDICIGNQS~~ 1450  
~~NPCVPNNKNPRA~~**FNGSSNGHVY****EKLSSIESDV**

**Annexe 1: Séquençage de la queue C-terminal de la sous-unité GluN2B:** Notre laboratoire a analysé la séquence de la partie c-terminal de GluN2B et il y a les acides aminés KKRXXXXKSRR entre la position 1090 et 1100 ayant un poids moléculaire de 43 kDa correspondant potentiellement à un signal de localisation nucléaire. Cette image propose également les potentiels sites de clivage par la calpaïne et les poids moléculaire correspondant à ces sites potentiels.

## Annexe 2



**Annexe 2: Détection de GluN2B dans le cytosol avec différent anticorps.** A) Détection de la sous-unité GluN2B, dans différentes fractions, avec un anticorps monoclonal spécifique à la sous-unité. Les résultats ont été dévoilés avec deux numéros de lots différents de l'anticorps monoclonal contre GluN2B. L'anticorps ayant le numéro de lot: 2740948 détecte une bande à ~55 kDa et l'autre non (B) Détection de GluN2B dans le cerveau complet et le cytosol avec un anticorps contre GluN2B de chez Synaptic Systems. La bande à ~55kDa n'est pas dévoilé par l'anticorps.