



HAL
open science

Identification d'une forme phosphorylée de BDNF : un nouveau mécanisme de régulation de la plasticité synaptique et de la mémoire ?

Julie-Anne Rodier

► To cite this version:

Julie-Anne Rodier. Identification d'une forme phosphorylée de BDNF : un nouveau mécanisme de régulation de la plasticité synaptique et de la mémoire ?. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV015 . tel-02905463

HAL Id: tel-02905463

<https://theses.hal.science/tel-02905463v1>

Submitted on 23 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Neurosciences Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Julie-Anne RODIER

Le 2 juillet 2018

Thèse dirigée par **Frédéric SAUDOU, P.U.P.H., Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U1216**, et
co-encadrée par **Maxime CAZORLA, C.R., Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U 1216**

préparée au sein du **Laboratoire « Dynamiques intracellulaires et neurodégénérescence »**, **Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U1216**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Identification d'une forme phosphorylée de BDNF : un nouveau mécanisme de régulation de la plasticité synaptique et de la mémoire ?

Thèse soutenue publiquement le **2 juillet 2018**,
devant le jury composé de :

Dr. Hélène MARIE

D.R., Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Rapportrice

Pr. Yves-Alain BARDE

Professeur, Cardiff University, Rapporteur

Dr. Servane TAUSZIG-DELAMASURE

C.R., Institut NeuroMyoGène, Examinatrice

Dr. Peter VANHOUTTE

D.R., Institut de Biologie Paris Seine, Examineur

Pr. Rémy SADOUL

Professeur, Grenoble Institut des Neurosciences, Président

Pr. Frédéric SAUDOU

P.U.P.H., Grenoble Institut des Neurosciences, Directeur

Dr. Maxime CAZORLA

C.R., Grenoble Institut des Neurosciences, Encadrant



Résumé

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor) est une protéine qui joue un rôle essentiel dans la survie et la différenciation des neurones, ainsi que dans l'induction et l'expression de la plasticité synaptique (Deinhardt and Chao, 2014; Lu et al., 2005). Le BDNF est très exprimé à l'âge adulte et la réduction de son expression est impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives et troubles psychologiques (Anastasia and Hempstead, 2014). Son action sur la plasticité synaptique est majeure pour la mise en place de fonctions cognitives et pour la mise en place de la mémoire (Bekinschtein et al., 2008; Egan et al., 2003).

Le BDNF existant sous deux formes ayant des fonctions opposées, on peut parler d'effet Yin et Yang du BDNF (Lu et al., 2005). En effet, le BDNF est synthétisé en tant que molécule précurseur, le proBDNF, qui a des effets négatifs « Yin ». Par sa liaison au récepteur p75^{NTR}, le proBDNF favorise l'apoptose, la rétraction dendritique et la dépression à long-terme. Au contraire, la forme clivée, le BDNF mature (mBDNF), se lie préférentiellement au récepteur TrkB qui active les voies de signalisation de survie cellulaire, de différenciation et de potentialisation à long terme. On parle alors d'effets positifs ou « Yang ». Le clivage de BDNF joue donc un rôle capital dans la régulation de sa balance fonctionnelle vers l'une ou l'autre voie. Il est généralement admis que le proBDNF est clivé en mBDNF par la furine dans le Golgi ou par la pro-protéine convertase 1/3 dans les vésicules de sécrétion (Mowla et al., 2001; Seidah et al., 1996). Le proBDNF restant n'ayant pas été clivé dans la cellule peut être sécrété et être rapidement clivé par la plasmine ou les métalloprotéases de matrice (MMP7) dans l'espace extracellulaire (Lee et al., 2001).

Par leurs rôles diamétralement opposés, le BDNF mature et le proBDNF permettent une régulation fine de la survie et la différenciation des neurones et leur plasticité synaptique en fonction de l'activité neuronale (Lu et al., 2014; Yang et al., 2014). BDNF ayant des rôles critiques dans la fonction neuronale, il n'est pas étonnant que son expression et son action soient extrêmement régulées dans le temps et dans l'espace. Cependant, si les enzymes de conversion du BDNF sont bien connues, les mécanismes de régulation du clivage ne sont pas encore compris.

Nous montrons ici un nouveau mécanisme de régulation de la maturation de BDNF via une phosphorylation qui impacte directement la balance fonctionnelle. En effet, nous montrons que la phosphorylation du résidu S130, localisé à l'interface entre le pro-domaine et le domaine mature, diminue l'efficacité du clivage du BDNF par la furine, régulant ainsi l'équilibre entre les formes immature et mature. Cette phosphorylation au site S130 est catalysée par les ectokinases FJX1 et FAM69B qui sont localisées dans l'appareil de Golgi avec BDNF. De plus, grâce à

l'utilisation de souris transgéniques knock-in phospho-mutantes, nous montrons que la phosphorylation de BDNF, en favorisant la forme proBDNF, inhibe la potentialisation à long-terme et diminue la dynamique de plasticité des épines dendritiques après stimulation neuronale. Ces résultats suggèrent ainsi une nouvelle voie de régulation de la balance fonctionnelle de BDNF et suggèrent un rôle critique de la phosphorylation S130 dans les processus d'apprentissage et de la mémoire.

En parallèle, la recherche de kinases potentielles de BDNF nous a amenés à identifier une exoPKA, localisée dans le Golgi et qui interagit directement avec BDNF. Cette exoPKA atypique phosphoryle BDNF au niveau de la sérine S130 et régule sa maturation et donc l'équilibre entre les formes pro et matures de BDNF. Cette exoPKA est différente de la PKA cytosolique ce qui suggère l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation de la plasticité par PKA via BDNF. Enfin, nous sommes en train de tester le rôle de l'exoPKA sur la régulation négative de la plasticité synaptique via la régulation du clivage de BDNF. Ces résultats permettront de déterminer l'existence d'une dichotomie d'action de PKA sur la plasticité en fonction de la forme activée, cytosolique ou golgienne/sécrétée.

Title

Identification of a phosphorylated form of BDNF: a new mechanism for the regulation of synaptic plasticity and memory?

Abstract

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a protein that plays an essential role in the survival and differentiation of neurons, as well as in the induction and expression of synaptic plasticity (Deinhardt and Chao, 2014; Lu et al., 2005). BDNF is highly expressed during adulthood and the reduction of its expression is implicated in many neurodegenerative diseases and psychological disorders (Anastasia and Hempstead, 2014). Its action on synaptic plasticity is critical for the establishment of cognitive functions and for the establishment of memory (Bekinschtein et al., 2008; Egan et al., 2003).

BDNF exists as two forms with opposite functions, or Yin and Yang effects (Lu et al., 2005). Indeed, BDNF is synthesized as a precursor molecule, proBDNF, which has negative effects "Yin". By binding to the p75NTR receptor, proBDNF promotes apoptosis, dendritic retraction and long-term depression. In contrast, the cleaved form, mature BDNF (mBDNF), binds preferentially to the TrkB receptor that activates the signaling pathways promoting cell survival, differentiation, and long-term potentiation. Thus, mBDNF has positive effects or "Yang". The cleavage of BDNF therefore plays a key role in regulating its functional balance towards one or the other pathway. It is believed that proBDNF is cleaved into mBDNF by furin in the Golgi network or by pro-protein convertase 1/3 in secretory vesicles (Mowla et al., 2001; Seidah et al., 1996). The remaining proBDNF that has not been cleaved in the cell can be secreted and rapidly cleaved by plasmin or matrix metalloproteases (MMP7) into the extracellular space (Lee et al., 2001).

Having diametrically opposite roles, together, mature BDNF and proBDNF allow fine regulation of neuronal survival and differentiation and of their activity-dependent synaptic plasticity (Lu et al., 2014; Yang et al., 2014). Since BDNF has critical roles in neuronal functions, it is not surprising that its expression and action are extremely regulated in time and space. However, even if the enzymes processing BDNF are well known, the mechanisms regulating BDNF cleavage are not yet understood.

Here we show a new mechanism for the regulation of BDNF maturation via phosphorylation which directly impacts the functional balance. Indeed, we show that phosphorylation of the S130 residue, located at the interface between the pro- and the mature domain, decreases the

efficiency of BDNF cleavage by furin, thus regulating the balance between immature and mature forms. This phosphorylation at the S130 site is catalyzed by ectokinases FJX1 and FAM69B which are localized in the Golgi apparatus with BDNF. Furthermore, by using phospho-mutant knock-in transgenic mice, we show that the phosphorylation of BDNF, by promoting the proBDNF form, inhibits the long-term potentiation and decreases the plasticity dynamics of the dendritic spines after neuronal stimulation. These results suggest a novel regulatory pathway for BDNF functional balance and suggest a critical role for S130 phosphorylation in learning and memory processes. In parallel, the search for potential kinases of BDNF led us to identify an exoPKA, located in the Golgi and interacting directly with BDNF. This atypical exoPKA phosphorylates BDNF at serine S130 and regulates its maturation and therefore the balance between the pro- and mature forms of BDNF. This exoPKA is different from the cytosolic PKA which suggests the existence of a new mechanism of regulation of plasticity by PKA via BDNF. Finally, we are testing the role of exoPKA on the downregulation of synaptic plasticity via the regulation of BDNF cleavage. These results will allow to determine the existence of a dichotomous action of PKA on plasticity whether cytosolic or Golgi/secreted PKA is activated.

Mots-clefs en français

Brain-derived neurotrophic factor, BDNF, Clivage, Phosphorylation, Golgi, Protein kinase A, Ectokinase, Hippocampe, Plasticité synaptique, Mémoire

Mots-clefs en anglais

Brain-derived neurotrophic factor, BDNF, Cleavage, Phosphorylation, Golgi, Protein kinase A, Ectokinase, Hippocampus, Synaptic Plasticity, Memory

Intitulé et adresse de l'unité où la thèse a été préparée

Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U1216, Bâtiment Edmond J. Safra, Chemin Fortuné Ferrini, 38700 La Tronche

Remerciements

Un grand merci à celles et à ceux qui m'ont soutenue et encouragée pendant ces trois ans et demi.

Je suis particulièrement reconnaissante envers les membres du jury, tout particulièrement Hélène Marie et Yves-Alain Barde qui ont pris le temps de relire mon manuscrit, ainsi que Servane Tauszig-Delamasure qui a accepté de participer à mes trois comités de suivi de thèse et qui a accepté de rejoindre le jury. Je remercie bien évidemment les autres membres du jury : Peter Vanhoutte et Rémy Sadoul qui ont volontiers accepté d'en faire partie.

Je remercie vivement Jean-Antoine Girault, Servane Tauszig-Delamasure, Sandrine Humbert et Homaira Nawabi pour leurs précieux conseils lors des comités de suivi de thèse.

Fred, merci de m'avoir accueillie dans ton labo et au sein de l'Institut. J'ai eu énormément de chance de pouvoir évoluer au sein de ton équipe. Malgré ton emploi du temps très chargé de directeur de l'institut, tu sais garder un œil attentif et bienveillant sur les projets en cours. Merci d'avoir mis à ma disposition les moyens techniques et financiers pour effectuer cette thèse dans de très bonnes conditions. Merci pour ton encadrement et tes conseils avisés.

Max, merci de m'avoir proposé ce sujet passionnant, merci pour ton encadrement, ton suivi, tes conseils exemplaires. Je peux imaginer qu'il a fallu de la patience, et je t'en remercie. J'espère avoir été à la hauteur de tes attentes.

Sandrine, merci pour ton soutien, tes encouragements et les discussions scientifiques au cours de cette thèse.

Jeff, I couldn't be more thankful. You were the one who made me want to continue in the field of neuroscience. I'm so lucky to have learnt what "research" was while I was in your lab. Thank you for sending me toward Fred and Sandrine's labs, even if I didn't end up studying HD...

Rory, thank you for your kindness and your patience during my own internship as an undergrad. I realize now how hard it is to have to mentor someone and to have to explain every single detail all day long!

L'ensemble des équipes Humbert-Saudou pour les discussions animées, les pauses café

Rachel, thank you for your hard work during your internship. I hope you enjoyed working with us on this amazing project and I'm glad you're the one who will continue what we've started!

Chiara, thank you for your friendship, for the emergency coffee breaks, you always understood when I needed to talk, thank you for adopting Margot, for the numerous gifts and especially the yummy moscato!

Elo, Gisela, thank you for your support and kindness. Also, thank you for teaching me stereotaxic injections, even if I didn't end up following this path...

Fabienne, Soumya, merci pour les nombreuses soirées, les randos et repas au resto passés ensemble. Grâce à vous, j'ai pu profiter des belles montagnes de Grenoble.

Eve, LN, Nagham, Max2, pour les discussions de bureau, pas toujours sérieuses !

Monia, merci pour les soirées « thé » qui n'en finissent plus.

Anne-Cécile, je suis vraiment heureuse d'avoir partagé le début de thèse avec toi, et je suis contente que l'on reste en contact, tu es top !

Julie, Aurélie, pour les (la) sortie(s) roller et les discussions qui allaient avec.

Laura, pour ta gentillesse et ton aide sur mon projet.

Whilelm, Anne-Sophie, merci pour vos conseils techniques et votre gentillesse.

Amandine, merci pour tout, tu as été mon premier contact dans l'équipe et tu m'en as laissé un très bon souvenir. Merci pour ton soutien pendant l'écriture, c'était sympa (et stressant) de partager ça avec toi.

Fabien, merci d'avoir levé un peu le voile sur les mystères de l'électrophysiologie ! C'était un plaisir de travailler avec toi.

Merci aux « anciens », Marine, Marc, Alexis, Murielle pour votre accueil chaleureux, merci pour vos conseils avisés. Et à Ben, Chrystelle, Elea, Rebecca, Adrien, pour les supers soirées.

Maëlle pour nos longues discussions et les escapades au centre équestre.

Elo, pour tellement de choses ! Ton amitié, ton soutien au jour le jour, au labo ou en-dehors, les livraisons de pizza des soirs où je finissais tard, les raids et les sorties à la poursuite de Pikachu et ses p'tits potes, les escape games, les (nombreux) restos, pic-nics improvisés...

Merci aux lyonnais, en particulier à Jessy, Cédric & Mymy et à Laëtitia et Marie, pour avoir gardé le contact même à la fin de la thèse malgré mon indisponibilité croissante.

Ma choupinette Sarah, Antoine & Vic, parce que vous savez me donner le sourire quand j'en ai besoin.

Maman, Papa pour votre soutien permanent toutes ces années, difficile d'exprimer en quelques mots seulement ma gratitude... Votre aide m'est plus que nécessaire, en particulier au cours de la thèse, que ce soit sous forme de visites, petits plats mitonnés, réparation de voiture/vélo/rollers... Ça y est, je quitte (enfin) le statut d'étudiant !

Rush, Quadrille, Perla, Swan, Gitane, Utopie, Rey Star, Ariane, Uranie, Bibiche, Tina, et l'éternel Jipsy qui m'ont permis de me changer les idées et oublier un peu le BDNF le temps d'une reprise de dressage ou d'un parcours de saut d'obstacle.

Mes poupinettes, avec moi à Grenoble depuis le jour 1, et sans qui j'aurais sûrement passé plus de nuits blanches. Votre présence m'est indispensable.

Et enfin mon Dani, l'homme de ma vie, mon meilleur ami et partenaire. J'ai très vite compris que tu étais mon meilleur allié dans ce marathon qu'est la thèse. Merci pour ton soutien incroyable, malgré les sacrifices que l'on a dû faire, tu as fait de ces années les plus belles de ma vie. Can't wait to see what's coming our way! A notre futur tous les deux. Love you, partner.

Table des matières

I	Liste des abréviations	11
II	Liste des figures.....	13
Chapitre 1 : État de l'art		14
I.	Le BDNF.....	16
I.A	Historique.....	16
I.B	Structure et expression du gène BDNF	18
I.B.1	Structure	18
I.B.2	Expression.....	20
I.B.3	Régulation de la transcription de BDNF	23
I.C	Synthèse et maturation	25
I.C.1	Synthèse	25
I.C.2	Maturation.....	27
I.D	Adressage, transport subcellulaire et sécrétion	30
I.D.1	Adressage.....	30
I.D.2	Transport subcellulaire.....	31
I.D.3	Sécrétion.....	33
I.E	Mécanismes d'action et fonctions du BDNF	34
I.E.1	Les récepteurs du BDNF.....	34
a	Le TrkB.....	34
b	Le p75 ^{NTR}	36
I.E.2	Effets positifs via Le récepteur TrkB.....	39
I.E.3	Effets négatifs via le récepteur p75 ^{NTR}	40
I.E.4	Importance de la balance pro/mature.....	42
I.F	Modifications pouvant influencer la fonction du BDNF	44
I.F.1	Les Polymorphismes nucléotidiques.....	44
a	Généralités sur les SNPs	44
b	Le SNP G196A : Val66Met	46
c	Le SNP C270T (rs56164415).....	48
I.F.2	Les Modification Post-Traductionnelles (PTMs)	49
a	Généralités.....	49
b	La PTM connue du BDNF : la N-glycosylation N121.....	49
II	Les régulations fonctionnelles par phosphorylation.....	50
II.A	Généralités	50
II.A.1	Les phosphorylations.....	50
II.A.2	Les kinases	52
II.A.3	Phosphatases	53
II.B	La PKA.....	54
II.B.1	Historique.....	54
II.B.2	Fonctionnement moléculaire de PKA.....	56
II.B.3	Régulation de l'activité de PKA.....	57
a	Activation via AMPc.....	57
b	Inhibition via PKI.....	58
II.B.4	Substrat de PKA (RRxS)	58
II.B.5	Fonction.....	60
II.B.6	Débat sur la localisation de PKA au niveau cellulaire	60
II.C	Les ectokinases.....	63
II.C.1	Généralités.....	63

II.C.2	Cas particulier du FJX1	63
II.C.3	Cas particulier du FAM69B	64
III	Plasticité et mémoire	66
III.A	Mémoire	66
III.A.1	Les différentes formes de mémoires	66
III.A.2	Cas particulier de la mémoire hippocampique	68
a	Structure de l'hippocampe	68
b	Les fonctions de l'hippocampe	68
III.B	Les bases moléculaires de la mémoire	70
III.B.1	La potentialisation et la dépression à long terme	71
III.B.2	Plasticité synaptique : mécanismes moléculaires	74
III.B.3	Plasticité synaptique : changements morphologiques	75
III.C	Rôle de BDNF dans la modulation de la mémoire	77
III.C.1	Le BDNF module l'efficacité synaptique	77
III.C.2	Les effets pré et post-synaptiques	78
III.C.3	La balance LTP/LTD : Rôle du BDNF	79
a	Rôle du clivage de BDNF dans la LTP	79
b	Le BDNF mature régule la LTP	81
c	Le proBDNF immature régule la LTD	82
III.C.4	Rôle du BDNF dans le remodelage morphologique	84
III.C.5	Rôles de BDNF et de proBDNF dans la mémoire	85
Chapitre 2 : Méthodologie		89
Chapitre 3 : Résultats		97
La phosphorylation de BDNF au site S130 régule la plasticité synaptique		98
I	Introduction	98
II	Résultats	99
II.A	Le BDNF est phosphorylé à la sérine S130	99
II.B	BDNF est phosphorylé par des ectokinases neuronales	102
II.C	La phosphorylation de S130 régule le clivage de BDNF par la furine	104
II.D	La phosphorylation de BDNF S130 régule la plasticité morphologique et anatomique de l'hippocampe	106
II.E	La phosphorylation de la sérine 130 de BDNF est critique pour la LTP hippocampique	108
II.F	La phosphorylation de BDNF régule-t-elle l'apprentissage et la mémoire ?	110
CONCLUSION		112
Identification d'une exoPKA régulant la maturation de BDNF : Implications dans la régulation de la plasticité synaptique		114
I	Introduction	114
II	Résultats	115
II.A	PKA phosphoryle BDNF au site S130	115
II.B	PKA existe dans la voie sécrétoire et co-localise avec BDNF et furine	117
II.C	PKA interagit avec BDNF et régule sa phosphorylation dans le Golgi	119
II.D	ExoPKA joue-t-elle un rôle opposé de la PKA cytosolique dans la plasticité synaptique ?	121

CONCLUSION	124
Chapitre 4 : Discussion et perspectives.....	125
I Discussion générale	126
I.A Le phospho BDNF : Mécanisme et fonction.....	126
I.B FJX1, FAM69B et exoPKA : Des kinases atypiques pour un nouveau mode de régulation de la plasticité par BDNF ?	132
I.C PhosphoBDNF, ectokinases, exoPKA : De nouvelles cibles pour les maladies du cerveau ?.....	137
II Perspectives	139
Références.....	143

I Liste des abréviations

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
AKAP	A-Kinase Anchoring Protein
ARNm	acide ribonucléique messenger
BAD	Bcl-2-Associated Death promoter
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BDNF-AS	Transcrit du brin anti-sens du BDNF
CA	Corne d'Ammon
CaMKII	Calcium/calmoduline-dependent Kinase II
Cas9	CRISPR associated protein 9
CNS	Central Nervous System
CHK	Csk-Homologous Kinase
CPE	CarboPeptidase E
CREB	Cyclic AMP Response Element Binding protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-
DCV	Dense Core Vesicles
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DG	Dentate Gyrus
E-LTP	Early-phase Long-Term Potentiation
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAM20C	Family with sequence similarity 20
FAM69B	Family with sequence similarity 69B
FJX1	Four-Jointed Box 1
FRS2	Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2
GABA	γ -Amino Butyric Acid
GFP	Green Fluorescent Protein
Grb2	Growth factor Receptor-Bound protein 2
HA	Haemagglutinin
HFS	High Frequency Stimulation
HIF1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
Ig	Immuno-Globuline
KO	Knock-Out
L-DOPA	Levo-DihydroxyPhenylAlanine
L-LTP	Late-phase Long-Term Potentiation
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long-Term Potentiation
mBDNF	BDNF mature
mCh	mCherry fluorescent protein
MeCP2	Methyl CpG binding Protein 2
MEK	MAPK or ERK Kinase
MSK1	Mitogen- and Stress-activated protein Kinase-1
MMP	Matrix MetalloProtease
NB	Neurobasal
NGF	Neurotrophic Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartic acid

NRSF	Neuron-Restrictive Silencing Factor
NT3	Neurotrophin-3
NT4/5	Neurotrophin-4 and 5
p75NTR	pan 75 kDa Neurotrophic Factor Receptor
PI3-K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PKI	Inhibiteur de PKA
PLC γ	Phosphoinositide phospholipase C-gamma
proBDNF	BDNF pleine longueur
pS130	phospho-sérine 130 de BDNF
PTB	PhosphoTyrosine Binding
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTM	Post-Translational Modification
RBP	RNA-binding protein
REST	RE1-Silencing Transcription factor
RSK2	Ribosomal S6 Kinase 2
SGK2	Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 2
SH2	Src Homology 2
SNP	Système Nerveux Périphérique
TBS	Theta-Burst Stimulation
TGN	Trans-Golgi Network
TNF	Tumor Necrosis Factor
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
USF	Upstream Stimulatory Factor
UTR	UnTranslated Region

II Liste des figures

Figure 1. Découverte du Nerve Growth Factor par Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen.	15
Figure 2. Structure du gène de BDNF.	17
Figure 3. Les terminaisons 3' UTR de l'ARNm de BDNF sont sensibles à l'activité.	17
Figure 4. Expression de BDNF dans le cerveau de souris adulte.	19
Figure 5. Résumé schématique des niveaux d'expression des isoformes de BDNF et de leurs récepteurs dans l'hippocampe des rongeurs en fonction du stade de développement.	21
Figure 6. Organisation des domaines de la protéine BDNF en fonction de la séquence nucléotidique.	26
Figure 7. La synthèse et l'adressage de BDNF dans un neurone.	29
Figure 8. Principales voies de signalisation activées par le récepteur TrkB.	35
Figure 9. Voies de signalisation activées par le récepteur p75 ^{NTR}	38
Figure 10. Le Yin et le Yang des fonctions des neurotrophines et de leurs récepteurs.	41
Figure 11. Conséquences du polymorphisme Val66Met sur la sécrétion du BDNF et la morphologie neuronale.	45
Figure 12. Conséquences du polymorphisme Val66Met sur la potentialisation à long terme.	45
Figure 13. Le kinome humain.	51
Figure 14. Mécanisme d'activation de PKA par l'AMP cyclique.	55
Figure 15. Les souris PKA knock-out ont des défauts de développement du tube neural de type Spina Bidifa.	59
Figure 16. La PKA est séquestrée à différentes localisations subcellulaires par une multitude d'AKAPs (A Kinase Anchoring Protein)	62
Figure 17. Les différents types de mémoire.	65
Figure 18. Structure et connectivité de l'hippocampe.	67
Figure 19. Henry Molaison, l'homme qui ne pouvait plus se souvenir.	69
Figure 20. Les effets à long terme lors d'une stimulation soutenue.	72
Figure 21. Remodelage des épines dendritiques lors de la LTP et de la LTD.	72
Figure 22. Le Yin et le Yang de la régulation synaptique à long terme par le proBDNF et le BDNF mature.	80
Figure 23. Le proBDNF régule négativement le remodelage des neurones et la transmission synaptique dans l'hippocampe.	83
Figure 24. Tests de mémoire hippocampique.	86
Figure 25. BDNF est phosphorylé à la sérine 130.	101
Figure 26. Phosphorylation de BDNF par les ectokinases FJX1 et FAM69B.	103
Figure 27. Modification du clivage de BDNF en fonction de la phosphorylation.	105
Figure 28. Influence de la phosphorylation de BDNF sur la structure et la fonction de l'hippocampe.	107
Figure 29. Analyse de la transmission synaptique et de la plasticité synaptique à court et à long terme.	109
Figure 30. PKA phosphoryle BDNF à la sérine S130.	116
Figure 31. PKA colocalise avec BDNF dans la voie sécrétoire.	118
Figure 32. PKA interagit avec BDNF dans le Golgi in vivo.	120
Figure 33. Modification du clivage de BDNF en présence de PKA.	122

Chapitre 1 : État de l'art

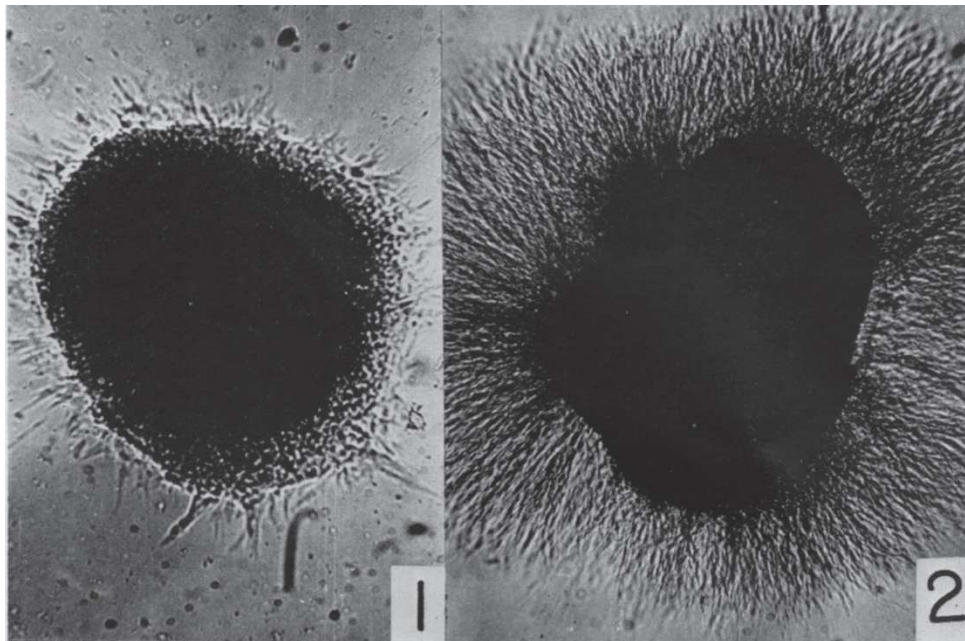


Figure 1. Découverte du Nerve Growth Factor par Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen.

(haut, gauche) Rita Levi-Montalcini, (haut, droite) Stanley Cohen, (bas) Ganglions sensoriels d'embryons de poulet cultivés 18 heures dans un milieu contrôlé (1) ou présence de venin de serpent qui contient du NGF (2). Le ganglion exposé au NGF révèle un halo dense de fibres nerveuses, tandis que le ganglion en milieu contrôlé a enclenché un processus de mort cellulaire. D'après The Nobel Assembly at the Karolinska Institute, Communiqué de presse du 15 Octobre 1986 et Cohen and Levi-Montalcini, 1956.

I. Le BDNF

I.A Historique

Le développement et la mise en place des réseaux neuronaux dans le cerveau se fait par l'intermédiaire de différents processus de migrations cellulaires, de différenciations et de maturations. L'ensemble de ces processus est rendu possible en partie grâce à des facteurs neurotrophiques. Ces protéines contrôlent la survie neuronale et régulent l'activité de populations spécifiques au sein des réseaux. Ces facteurs neurotrophiques, indispensables au développement et au fonctionnement du cerveau adulte, appartiennent à la superfamille des neurotrophines, découvertes il y a environ soixante ans.

En 1954, Rita Levi-Montalcini et Viktor Hamburger ont mis en évidence la sécrétion d'un facteur soluble favorisant la survie et le développement des fibres neuronales sympathiques à partir de tumeurs murines transplantées à proximité de ganglions de la moelle épinière d'embryons de poulet (Levi-Montalcini, 1987; Levi-Montalcini et al., 1954). La découverte de ce premier facteur de croissance a introduit l'idée que des protéines sécrétées pouvaient avoir un rôle majeur dans le développement des organismes. Par la suite, des études *in vitro* réalisées par Stanley Cohen ont permis d'isoler ce facteur à partir de glandes salivaires de souris et de l'identifier comme un facteur de croissance des nerfs, le *Nerve Growth Factor* ou NGF. La préparation de l'anticorps à partir de la purification du NGF a permis d'observer que l'injection de cet anti-sérum entraînait une atrophie et une destruction de parties bien spécifiques du système nerveux : les fibres neuronales sympathiques. Ce facteur neurotrophique était donc essentiel à la survie de ces fibres, mais pas de toutes, ce qui laissait supposer l'existence d'autres facteurs neurotrophiques (B. Y. S. Cohen and Levi-Montalcini, 1956; Cohen, 1960). Deux décennies plus tard, le NGF fut cloné dans plusieurs espèces dont le poulet, la vache, la souris et l'homme (Ebendal et al., 1986; Meier et al., 1986; Scott et al., 1983; Ullrich et al., 1983). Le prix Nobel de Physiologie ou Médecine sera accordé en 1986 à Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen pour leur découverte du NGF (**Figure 1**), ayant ouvert un nouveau champ de recherche en neurosciences consacré à l'identification et à la description des facteurs neurotrophiques.

En effet, dès 1978, Yves-Alain Barde et ses collaborateurs observent que le milieu conditionné d'une culture de gliomes a un effet positif sur la survie de neurones sensoriels de poulet en culture (Barde et al., 1978). Cet effet n'est pas aboli par l'anticorps anti-NGF, alors qu'il est réduit par l'addition de protéases, ce qui suggère que ce facteur neurotrophique est bien différent de NGF, et qu'il est un polypeptide. En 1982, Barde et al. isolent ce nouveau polypeptide, qu'ils nomment *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) puisqu'il est capable de promouvoir la survie et la

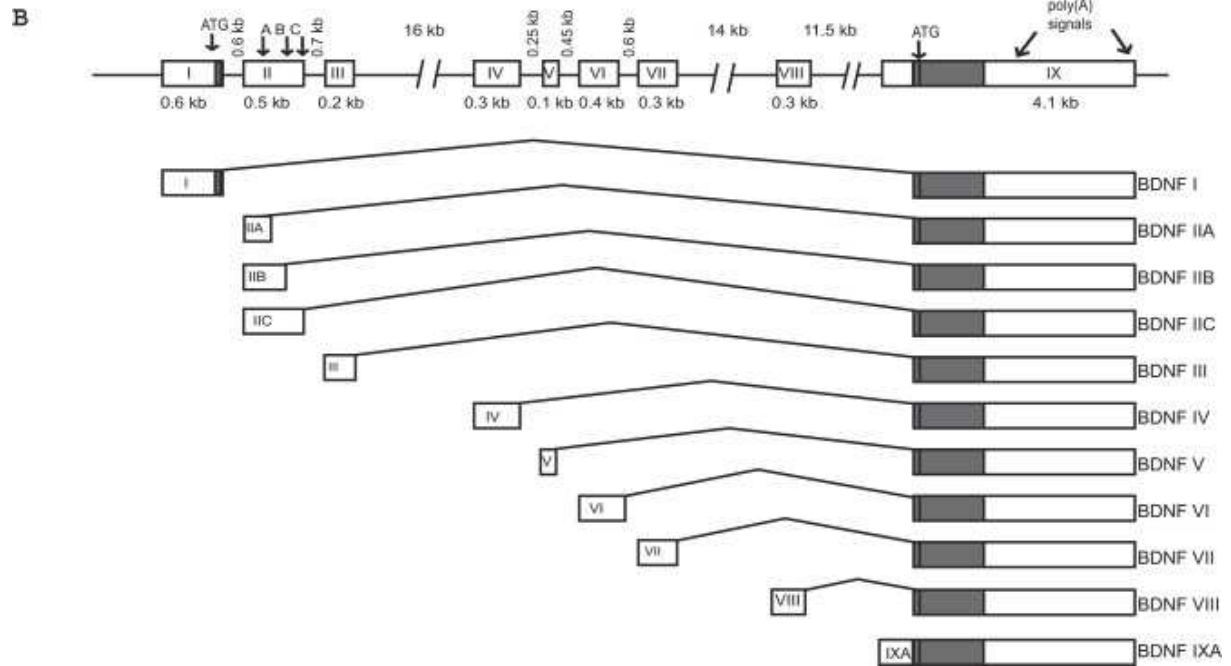


Figure 2. Structure du gène de BDNF.

Le gène BDNF de rat et de souris. Les exons sont représentés par des rectangles et les introns par des lignes. Au-dessous, les différents transcrits de BDNF sont représentés. Les régions codantes de la protéine sont représentées par les rectangles gris et les régions non-traduites en rectangles blancs. L'épissage alternatif conduit tous les ARNm à exprimer la même protéine finale codée par l'exon IX. De plus, les transcrits sont terminés par l'un des deux introns 3' alternatifs (indiqués par les flèches) qui sont capables de réguler l'adressage des ARNm. D'après Aid et al., 2007.

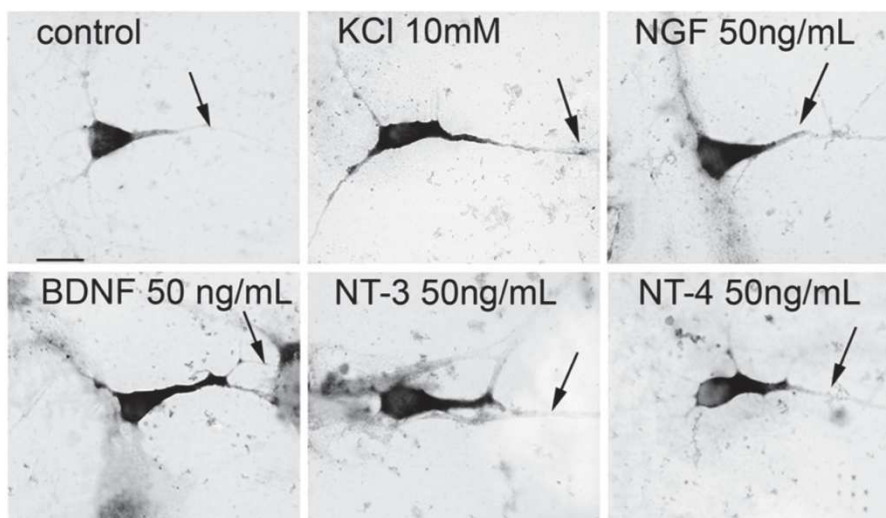


Figure 3. Les terminaisons 3' UTR de l'ARNm de BDNF sont sensibles à l'activité.

Les chimères de ont été construits à partir de GFP et des terminaisons 3'UTR du gène de BDNF. L'ajout de KCl pour potentialiser l'activité cellulaire ainsi que l'ajout de neurotrophines active le transport des ARNm le long des dendrites distales. Extrait de Vicario et al., 2015.

croissance de neurones en culture et qu'il a été purifié à partir de cerveaux de porc (Y A Barde et al., 1982).

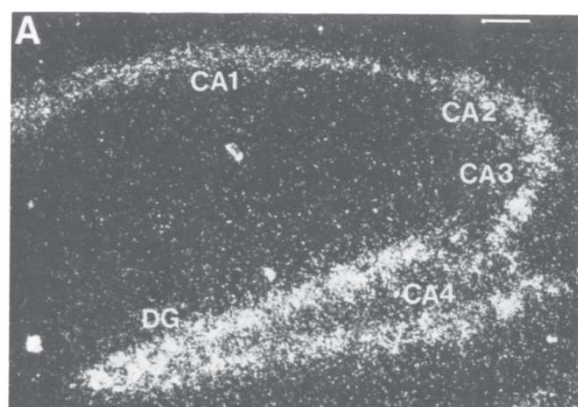
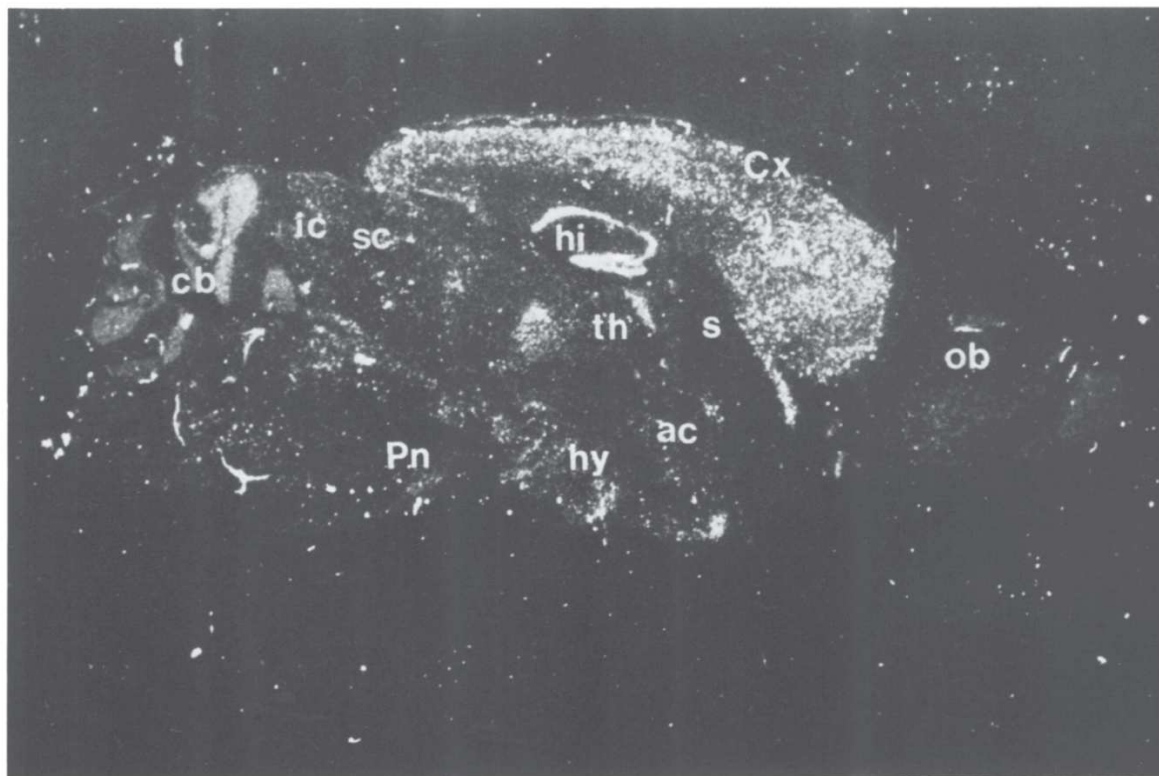
Depuis, de nombreux facteurs neurotrophiques ont été décrits et regroupés en différentes familles par similarités de structure. La famille des neurotrophines qui a été construite par ressemblance au NGF comprend alors le BDNF, la Neurotrophine-3 (NT3), la Neurotrophine-4 et la Neurotrophine-5 qui seront rassemblées sous une même dénomination, la Neurotrophine-4/5 (NT4/5).

I.B Structure et expression du gène BDNF

I.B.1 Structure

Le gène humain codant pour le BDNF est localisé sur le chromosome 11, dans la région p13-14 et s'étend sur environ 70 kb. Le gène BDNF a été cartographié sur le chromosome 2 chez la souris, et sur le chromosome 3 chez le rat (Ozçelik et al., 1991). Le gène *BDNF* a une structure complexe : il est composé de 11 exons (I à IX, Vh et VIIIh) sur la terminaison 5' et 9 promoteurs fonctionnels qui sont activés spécifiquement dans certains tissus ou régions du cerveau (**Figure 2**). Chez le rat et la souris, il n'y a que 9 exons, les exons Vh et VIIIh étant spécifiques au gène humain (Aid et al., 2007a; Hofer et al., 1990; West et al., 2014). Plus précisément, il existe les exons I, II (avec les transcrits IIa, IIb, et IIc), les exons III, IV, V (avec les transcrits Va, Vb, Vc et V-VIII-VIIIh), l'exon VI (avec les transcrits VIb, VIb-IXabd et VIb-IXbd), l'exon VII (avec les transcrits VIIa et VIIb) et l'exon IX (avec les transcrits IXabd et IXabcd). Grâce à l'épissage alternatif, chaque exon en 5' peut générer un isoforme spécifique. Tous ces isoformes contiennent la même séquence codante, se trouvant dans l'exon IX, et qui code pour la même protéine proBDNF. Les huit exons précédents codent pour des promoteurs qui régulent spécifiquement l'expression du BDNF dans différentes régions et différents types cellulaires. Les codons « start » sont situés au niveau des exons I, VII, VIII et IX, ce qui conduit à des variations dans la partie N-terminale de la séquence du peptide signal du pré-proBDNF.

L'existence de deux codons stop dans l'exon IX ajoute un niveau de complexité au gène du BDNF. Les ARNm peuvent ainsi être générés avec deux régions non-traduites 3' (UnTranslated Region, UTR) alternatives : soit une courte région 3' (~0.35 kb), soit une longue (~2.85 kb). La présence de l'une ou l'autre 3'UTR aurait une influence sur la distribution de ces ARNm. En effet, une hypothèse serait que les variants avec un court 3'UTR sont restreints au soma dans les neurones hippocampiques, alors que les variants avec une longue région non-traduite sont aussi observés dans les dendrites (An et al., 2008; Baj et al., 2011). Cependant, il a été montré que



Brain area	Level of expression
olfactory bulb	+
periglomerular/tufted/mitral/granule cells	+
cerebral cortex	+++
hippocampus: CA1	+++
hippocampus: CA2/CA3/CA4/dentate gyrus	++++
n. anterodorsal th.	++
n. parafascicular th.	++
n. medial th.	+
medial preoptic area	+++
ant. hypoth. area	++
n. ventromedial hypoth.	++
mamillary nuclei	++
inferior and superior colliculi	+
pontine nuclei	+++
cerebellar granule cell layer	++

++++very high, +++high, ++moderate, +low (arbitrary units)

Figure 4. Expression de BDNF dans le cerveau de souris adulte.

(haut) L'hybridation in situ de l'ARNm de BDNF sur un coupe sagittale de cerveau de souris montre une forte expression au niveau de l'hippocampe (hi), du cortex (Cx). Cb : cervelet, ic et sc : colliculus supérieur et inférieur, hi : hippocampe, Cx : cortex cérébral, th : thalamus, s : septum, ob : bulbe olfactif, ac ; commissure antérieure, hy : hypothalamus, Pn : noyaux du pont. (bas, gauche) L'ARNm est retrouvé dans toutes les régions de l'hippocampe (CA1 à 4 et DG). Corne d'Ammon (CA), Gyrus Denté (DG) (bas, droite) Quantification par hybridation in situ de l'expression des ARNm du BDNF dans le cerveau adulte de souris. D'après Hofer et al., 1990.

des ARNm de BDNF avec chacune des deux 3'UTRs peuvent être transportés dans les dendrites, en réponse à une activité neuronale (**Figure 3**) (Vicario et al., 2015) et que ces deux formes ont les mêmes effets sur la régulation de la pousse dendritique (O'Neill et al., 2018). Ces terminaisons 3'UTR pourraient également interagir différemment avec des protéines de liaison à l'ARN (RNA-binding protein, RBP). Par exemple, le NT3 est capable d'interagir avec les ARNm de BDNF à court 3'UTR et de favoriser leur transport dans les dendrites distales (Vicario et al., 2015). Le transport d'ARNm de BDNF dans les dendrites suggère donc un système complexe modulé par la terminaison 3' non traduite et ses interacteurs, et évoque la possibilité d'une traduction locale (Cattaneo et al., 2016).

1.B.2 Expression

Chez l'adulte, tous les transcrits alternatifs d'ARNm du *BDNF* sont fortement exprimés dans le cerveau mais certains sont aussi exprimés dans d'autres tissus (Mitchelmore and Gede, 2014; Pruunsild et al., 2007). Les transcrits contenant l'exon I, par exemple, sont aussi exprimés dans les testicules. Ceux contenant les exons Vh, VI, et IX sont plus largement exprimés dans les tissus périphériques (cœur, foie, prostate, estomac...), alors que les ARNm comprenant les exons II, III, IV, V et VII sont majoritairement restreints au cerveau. Les études sur le gène de BDNF chez le rat et la souris montrent que le profil d'expression est comparable à celui de l'humain (Aid et al., 2007; Hofer et al., 1990). Le BDNF est aussi abondamment distribué dans le système nerveux périphérique, ainsi que dans les motoneurones (Sendtner et al., 1992).

Il existe de fortes variations d'expression au sein même du cerveau. L'étude de l'expression protéique et des ARNm chez l'homme (Murer et al., 2001) et de l'ARNm chez les rongeurs (Conner et al., 1997; Hofer et al., 1990) révèle une expression importante dans le cortex, le cervelet et l'amygdale (**Figure 4**). Cependant, chez l'homme comme chez les rongeurs, l'expression de BDNF est la plus forte au niveau de l'hippocampe, ce qui est cohérent avec son rôle majeur dans cette région liée à la mémoire (voir Chapitre *Rôle de BDNF dans la modulation de la mémoire*). Dans l'hippocampe, ce sont les couches CA2 à CA4 et le gyrus denté (DG) qui expriment le plus fortement le BDNF, et plus spécifiquement les cellules pyramidales et granulaires glutamatergiques (Leßmann and Brigadski, 2009). De plus, si pendant longtemps les neurones ont été considérés comme la principale source de BDNF au niveau cérébral, on sait désormais que les cellules endothéliales, les épendymocytes, les astrocytes et la microglie sont également capables de le synthétiser (Béjot et al., 2011; Madinier et al., 2009).

Les cortex piriforme, frontal, cingulaire, pariétal, occipital et enthorinal révèlent également une forte expression de l'ARNm du BDNF particulièrement dans les couches II et V, ainsi qu'au niveau

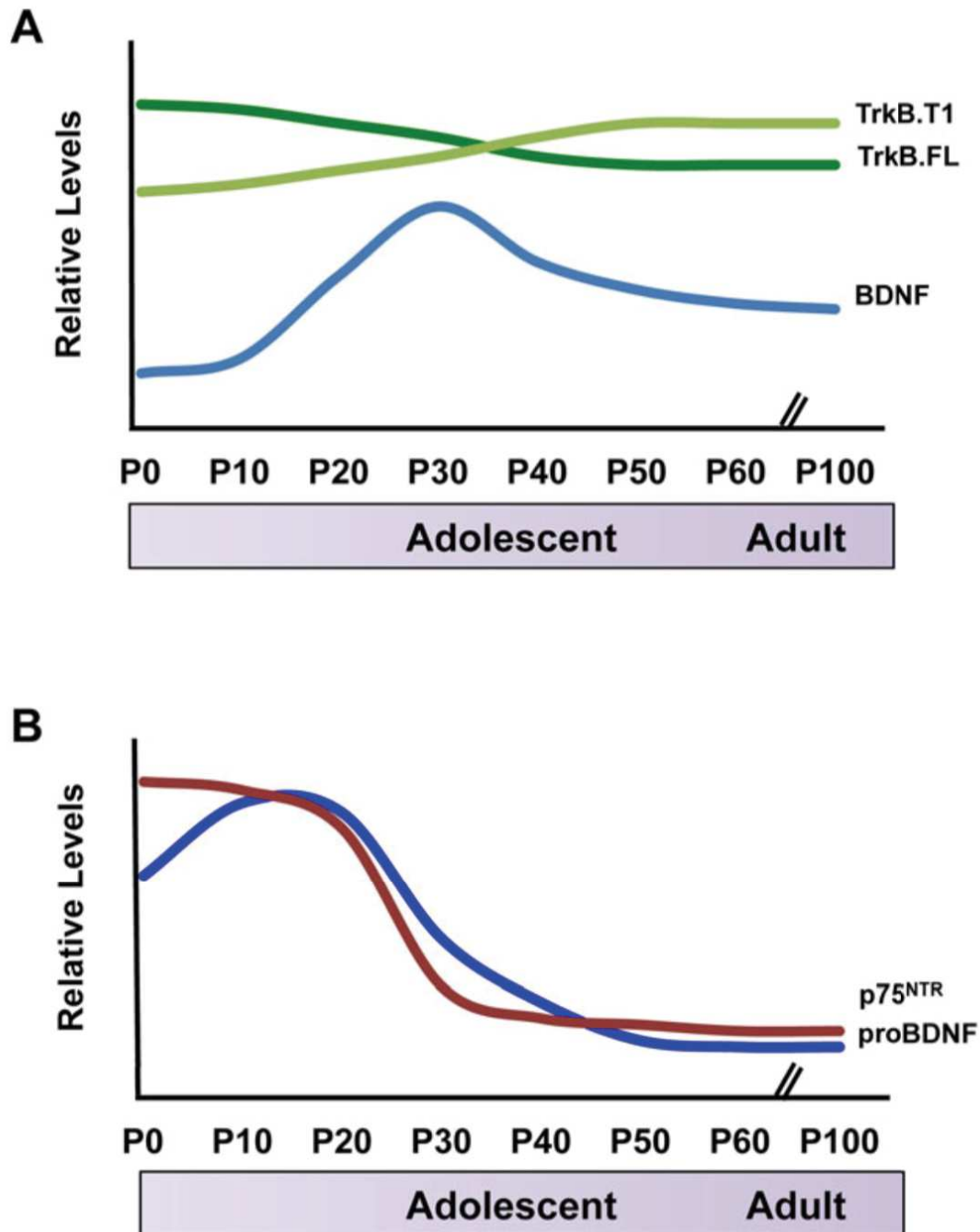


Figure 5. Résumé schématique des niveaux d'expression des isoformes de BDNF et de leurs récepteurs dans l'hippocampe des rongeurs en fonction du stade de développement.

(A) Les niveaux de BDNF mature atteignent un pic au début de l'adolescence, suivi d'un plateau à l'âge adulte. TrkB pleine longueur est l'isoforme récepteur prédominant dans le développement précoce, cependant, les niveaux de TrkB tronqués augmentent à la fin de l'adolescence. (B) Les niveaux de proBDNF et de son récepteur p75^{NTR} sont les plus élevés pendant les premières semaines de développement post-natal, après quoi l'expression diminue rapidement pour atteindre des niveaux faibles pendant la vie adulte. D'après Dincheva et al., 2016.

de l'amygdale, et du mésencéphale ventral (substance noire et aire tegmentale ventrale plus particulièrement) (Conner et al., 1997; Hofer et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990). Les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale expriment également l'ARNm et la protéine du BDNF (Conner et al., 1997; Seroogy et al., 1994).

Certaines régions du cerveau n'expriment pas BDNF et s'appuient sur l'apport par les neurones afférents. Après lésion des neurones dopaminergiques par la 6-hydroxydopamine, on observe une diminution de la majorité des signaux d'hybridation pour l'ARNm du BDNF (Seroogy et al., 1994). Ainsi, on peut estimer que, dans le mésencéphale ventral, 80% des cellules qui expriment l'ARNm du BDNF sont dopaminergiques. Les neurones de l'aire tegmentale ventrale qui expriment le BDNF envoient des fibres vers le noyau accumbens. Cependant, alors que la protéine du BDNF y est facilement détectée, son ARNm n'y est pas retrouvée (Conner et al., 1997). Cette observation suggère l'existence d'un transport antérograde du BDNF, qui a ensuite été démontré après lésion cortico-striatale. En effet, l'ARNm de BDNF n'est pas présent dans les neurones du striatum, pourtant on peut y retrouver la protéine en abondance. Le BDNF est en effet produit par les neurones corticaux et est transporté dans le striatum (Altar et al., 1997; Gauthier et al., 2004)

L'expression de BDNF varie au cours du temps. Au cours du développement, l'expression de la protéine de BDNF est plus abondante dans les neurones sensoriels dérivés de la crête et des placodes neurales que dans les autres tissus (Davies et al., 1986; Lindsay et al., 1985). Chez les rongeurs, le niveau d'expression des isoformes de BDNF dans l'hippocampe varie fortement au cours des premières semaines après la naissance. Le niveau de BDNF est très faible à la naissance, mais augmente fortement pour atteindre un pic d'expression au début de l'adolescence (~ à 30 jours), puis diminue légèrement pour se stabiliser à un niveau plateau tout au long de la vie (**Figure 5**) (Dincheva et al., 2016). Le niveau de proBDNF est le plus élevé lors des trois premières semaines de développement post-natal. Après la 4^{ème} semaine, l'expression de proBDNF diminue rapidement à un niveau stable au cours de la vie d'adulte (Dincheva et al., 2016).

Cependant, en termes de quantité mesurable, les niveaux d'expression de BDNF sont extrêmement faibles, tant au niveau de l'ARNm que de sa protéine. Pour identifier le BDNF, il a par exemple fallu utiliser 1.5 kg de cerveau de porc et le purifier 10^6 fois (Barde et al., 1982). Une quantification d'ARNm a établi qu'il y avait environ 1.2 copies d'ARNm de BDNF dans la rétine en développement (Herzog et al., 1994). C'est pourquoi de multiples études ont recours à la

surexpression de BDNF, ou utilisent des lignées de souris transgéniques knock-in pour exprimer un tag en aval du BDNF endogène, ce qui permet d'étudier la protéine à des niveaux physiologiques.

1.B.3 Régulation de la transcription de BDNF

La complexité du gène du BDNF due à ses multiples ARNm, tous traduits en une unique protéine, suggère une régulation de son expression à plusieurs niveaux. Une hypothèse a été émise que ces nombreux transcrits génèrent un « code » permettant une régulation fine de l'expression spatio-temporelle au niveau des différentes régions cérébrales, mais aussi plus précisément au sein même de chaque neurone. De plus, cette expression varie en fonction de l'activité de la région et du neurone. De façon intéressante, parmi les facteurs de croissance du système nerveux central, le BDNF est l'un des rares dont l'expression est régulée par l'activité neuronale (Song and Lee, 2016).

L'exon IV est le plus étudié et le mieux caractérisé car il régule l'expression de BDNF en fonction de l'activité neuronale (Martinowich et al., 2011; Timmusk et al., 1994, 1993). La production d'ARNm contenant l'exon IV est activée de façon sélective par l'influx de calcium via les canaux calciques dépendants d'un ligand (leur ouverture est déclenchée par une molécule spécifique) ou dépendants du voltage (leur ouverture a lieu lorsque le potentiel de membrane atteint un seuil). En effet, plus l'activité neuronale s'accroît, plus la concentration cytosolique en calcium est importante et plus la sécrétion régulée est augmentée. Par ailleurs, l'activité neuronale régule le transport des ARNm du BDNF et de la protéine vers les dendrites (Maynard et al., 2017). A l'inverse, une stimulation avec des facteurs de croissance, par exemple, n'induit pas d'activation significative du promoteur IV (Hong et al., 2008a). Des éléments sensibles au calcium ont été identifiés dans les régions promotrices en amont des exons (Tabuchi et al., 2002; Timmusk et al., 1999). L'expression de BDNF est contrôlée par différents facteurs de transcription, notamment CREB (*Cyclic adenosine monophosphate Response Element-Binding*) qui est régulé par l'activité, mais aussi CaRF (Calcium-Responsive transcription Factor) et USF (Upstream Stimulatory Factor) (Pruunsild et al., 2011; Tao et al., 2002, 1998).

Il existe un autre niveau de régulation du gène BDNF lié à la méthylation de l'ADN par la methyl-CpG binding Protein 2 (MeCP2) (Martinowich et al., 2003). Quand MeCP2 est sous forme phosphorylée, il est dissocié de l'ADN méthylé et les histones sont acétylées, la transcription de la chromatine est alors possible. MeCP2 est particulièrement intéressant dans le système nerveux central puisque des mutations de MeCP2 chez l'humain qui entraînent la perte de fonction de la protéine conduisent au trouble neurodéveloppemental appelé syndrome de Rett (Chahrour and

Zoghbi, 2007). La perte de régulation de l'expression de BDNF par MeCP2 pourrait contribuer au mauvais développement et fonctionnement des synapses (Sampathkumar et al., 2016).

Afin de mieux comprendre le lien entre le BDNF et l'activité neuronale, Hong et al. ont généré une souris avec une mutation dans le gène de BDNF qui bloque la liaison de CREB au promoteur IV du BDNF. Cette souris transgénique a permis de montrer que cette mutation était suffisante pour atténuer l'expression de BDNF dépendante de l'activité dans le cortex et que cette perturbation altère fortement l'induction du promoteur IV en réponse à des stimuli sensoriels (Hong et al., 2008b). Cette mutation a pour conséquence de diminuer le nombre et l'activité des synapses inhibitrices, ce qui suggère que l'expression de BDNF dépendante de l'activité neuronale est nécessaire au développement de l'inhibition dans le cortex (Hong et al., 2008a). Une autre lignée de souris mutées au niveau du promoteur IV a été générée. Cette fois-ci, le promoteur IV a été remplacé par une cassette GFP-STOP qui inhibe totalement la régulation de la transcription via ce promoteur (Sakata et al., 2009). Ces souris ont un déficit de transmission GABAergique et de plasticité, mais aussi une altération de flexibilité de la mémoire spatiale et d'extinction de peur contextuelle. Contrairement aux souris knock-out hétérozygotes $BDNF^{+/-}$ (Lyons et al., 1999), ces souris n'ont pas de modification de comportement agressif ou alimentaire. L'analyse de ces deux lignées de souris mutées au niveau du promoteur IV met en lumière la contribution d'un transcrite spécifique sur le développement neuronal et les déficits engendrés au niveau de circuits spécifiques et les conséquences comportementales qui en découlent.

D'autres études ont montré que l'expression du promoteur I du BDNF est aussi sensible à l'activité neuronale et qu'elle est régulée négativement par le répresseur neuronal REST (*RE1-silencing transcription factor*, aussi connu sous le nom de NRSF, *neuron-restrictive silencing factor*) (Hara et al., 2009). Ces études montrent que dans des neurones matures, le gène REST est réprimé par MeCP2 et que la transcription de BDNF via le promoteur I est régulée par l'activité, mais de façon différente du promoteur IV (Pruunsild et al., 2011; Tian et al., 2009). En revanche, en l'absence de MeCP2, comme dans le cas du syndrome de Rett, REST est surexprimé et inhibe la transcription de l'exon I malgré l'activité neuronale (Abuhatzira et al., 2007).

L'expression de BDNF peut également être régulée par d'autres facteurs, tels que les neuromodulateurs et neurotransmetteurs. Des études réalisées *in vivo* et *in vitro* montrent que le glutamate augmente la synthèse et la sécrétion du BDNF, tandis que le GABA (neurotransmetteur inhibiteur) l'inhibe (Zafra et al., 1991, 1990). D'autres neuromédiateurs comme l'acétylcholine (Knipper et al., 1994), la dopamine (Küppers and Beyer, 2001) et la sérotonine (Martinowich and

Lu, 2008) peuvent également augmenter les taux d'ARNm codant pour le BDNF. La synthèse du BDNF est également sensible aux hormones stéroïdiennes (les œstrogènes, la progestérone, la testostérone ou encore les glucocorticoïdes) qu'elles soient circulantes ou produites localement (Pluchino et al., 2013).

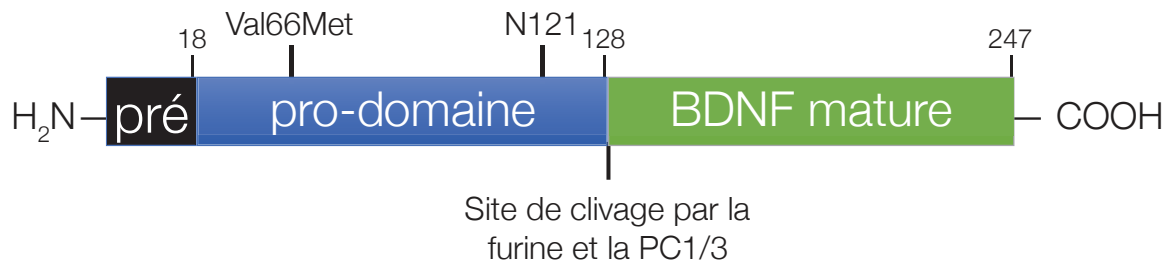
Enfin, il existe également un transcrit anti-sens non-codant (BDNF-AS) qui est synthétisé à partir du brin d'ADN complémentaire et pourrait réguler le niveau d'ARNm de *BDNF* chez l'humain (Pruunsild et al., 2011). L'existence de transcrits anti-sens chez la souris est débattu, ce qui suggère que les mécanismes de régulation pourraient être différents (Aid et al., 2007; Liu et al., 2006). La diminution d'expression de BDNF-AS à l'aide de siRNA résulte en une augmentation de l'ARNm de BDNF qui est conduit à une augmentation de la croissance des neurites (Modarresi et al., 2012). Cette étude montre aussi que BDNF-AS n'altère pas la stabilité de l'ARNm de BDNF.

La complexité de la régulation de BDNF, à différents niveaux, par de multiples voies de signalisations souligne l'importance de ses fonctions physiologiques au sein d'un réseau régulé par l'activité. En effet, BDNF étant un facteur critique pour la mise en place, la survie et le fonctionnement des neurones, il n'est pas étonnant que le système de régulation soit très complexe. De plus, les différents modes de régulation des différents exons de BDNF montrent la difficulté de l'étude du rôle de BDNF et de ses fonctions *in vivo*. En effet, on pourrait considérer qu'il existe des BDNF et non un seul.

I.C Synthèse et maturation

I.C.1 Synthèse

Les ARNm des neurotrophines codent pour des pré-pro-protéines de 252 acides aminés. Le BDNF est initialement synthétisé sous forme de précurseur protéique avec un peptide signal N-terminal : le pré-proBDNF. Le peptide signal (les 18 premiers acides aminés) adresse le peptide dans les voies de sécrétion et est clivé au moment du transfert dans le lumen du réticulum endoplasmique pour produire le proBDNF (Greenberg et al., 2009). Le proBDNF est l'ensemble du domaine « pro » composé de 112 acides aminés chez le rongeur et 110 chez l'homme, et du domaine « mature » composé de 119 acides aminés (**Figure 6**) (Mowla et al., 2001). Le proBDNF peut ensuite être clivé en BDNF mature sur son trajet le long de la voie sécrétoire (Mowla et al., 1999).



1 MTILFLTMVI SYFGCMKAAP MKEANIRGQG GLAYPGVRTH GTLESVNGPK
51 AGSRGLTSLA DTFEHVIEEL LDEDQKVRPN EENNKDADLY TSRVMLSSQV
101 PLEPPLLFLL EEYKNYLDAA NMSMRVRHS DPARRGELSV CDSISEWVTA
151 ADKKTAVDMS GGTVTVLEKV PVSKGQLKQY FYETKCNPMG YTKEGCRGID
201 KRHWNSQCRT TQSYVRALTM DSKKRIGWRF IRIDTSCVCT LTIKRGR

Figure 6. Organisation des domaines de la protéine BDNF en fonction de la séquence nucléotidique.

(haut) Le BDNF est composé d'un peptide signal (pré, en noir), d'un domaine pro (bleu) et d'un domaine mature (vert). Le pro-domaine est N-glycosylé sur la séquence consensus localisée six résidus avant le site de clivage. Le polymorphisme humain sur l'acide aminé 66 entraîne l'échange d'une valine en méthionine (Val66Met). Toutes les neurotrophines connues à ce jour présentent la même organisation. **(bas)** Séquence primaire du pré-proBDNF humain. Le code couleur correspond à celui présenté au-dessus. Le domaine de reconnaissance pour le clivage est en gras. Les séquences de souris et de rat présentent deux thréonine (T) supplémentaires en position 57-58 par rapport à la séquence humaine.

1.C.2 Maturation

La maturation du proBDNF se fait en deux étapes : une glycosylation et un clivage. Après son entrée dans l'appareil de Golgi, le proBDNF subit une N-glycosylation du résidu N123, au niveau du pro-domaine, six résidus avant le site de clivage (Leßmann and Brigadski, 2009). Ce site serait le seul site possible de N-glycosylation sur le BDNF dont la séquence consensus est NX(T/S). Ce site de glycosylation est conservé à la même position dans toutes les neurotrophines, ce qui suggère un rôle majeur de cette glycosylation dans la maturation ou le trafic des neurotrophines. En effet, bloquer la N-glycosylation de NGF avec la tunicamycin revient à empêcher l'entrée de NGF dans l'appareil de Golgi, et donc sa sécrétion (Seidah et al., 1996). De même, le blocage de la glycosylation du proBDNF réduit les niveaux de proBDNF et de BDNF mature, ce qui pourrait être dû au mauvais repliement de la protéine qui diminuerait leur temps de demi-vie (Mowla et al., 2001). Récemment, Koppel et al. ont montré que lorsque la N-glycosylation de BDNF est inactivée par la mutation du résidu N123 en Q123, le BDNF mature devient indétectable, ce qui suggère une implication de ce site dans la maturation de BDNF (Koppel et al., 2015).

La deuxième étape de la maturation du BDNF est le clivage de proBDNF en BDNF mature. La présence de proBDNF, ainsi que de BDNF mature, a été montrée dans l'appareil de Golgi de neurones hippocampiques, ainsi qu'au niveau de leurs axones, dans les grosses vésicules à cœur dense (DCV, *Dense Core Vesicles*) (Dieni et al., 2012). En effet, à partir de son entrée dans les voies de sécrétion, la pro-protéine peut être clivée après la séquence consensus $^{125}\text{R}\text{xRR}^{128}$. Le clivage de proBDNF en BDNF mature peut être effectué par différentes protéases, selon l'organelle où a lieu la maturation (Hempstead, 2014). Le proBDNF peut être clivé par la furine (une endoprotéase membranaire) et la pro-protéine convertases 7 (PC7) dans le Golgi, mais aussi par les pro-protéines convertases 1/3 (PC1/3) dans les vésicules de sécrétion, avant d'être sécrété sous forme mature (Mowla et al., 2001; Seidah et al., 1996; Wetsel et al., 2013). L'activité de ces protéases nécessite une concentration en calcium comprise entre 10 μM et 10 mM et un pH d'une valeur comprise entre 5 et 7, conditions que l'on retrouve dans le réseau trans-golgien et dans les vésicules de sécrétion (Shennan et al., 1995; Williamson et al., 2015). Cependant, aucune de ces pro-protéines convertases ne serait vraiment efficace sur le proBDNF, laissant une partie de la pro-protéine intracellulaire non clivée (Farhadi et al., 2000; Mowla et al., 1999). Des études *in vitro* sur du BDNF surexprimé ont montré que du proBDNF pouvait être sécrété (Lu et al., 2005; Woo et al., 2005; Yang et al., 2009). Cependant, ces données ne font pas l'unanimité dans la communauté scientifique et la question reste encore largement débattue (Barker, 2009; Matsumoto et al., 2008). En effet, le BDNF étant exprimé en très petite quantité et sa production étant extrêmement régulée, il est difficile d'observer la protéine endogène. Si

certaines laboratoires ont observé du proBDNF sécrété, d'autres montrent que la totalité du proBDNF est converti en BDNF mature lors de processus intracellulaires, avant sa sécrétion (Matsumoto et al., 2008). Pourtant, il a été montré que dans l'espace extracellulaire, la proprotéine peut être clivée par les métalloprotéinases matricielles 3 et 7 (MMP3 et MMP7) (Lee et al., 2001; Mizoguchi et al., 2011). Le zinc présent dans le milieu extracellulaire permettrait de réguler l'activation des MMPs et de réaliser la conversion du proBDNF en mature (Hwang et al., 2005). L'autre protéase capable de cliver le proBDNF dans le milieu extracellulaire est la plasmine (Lee et al., 2001). Cette enzyme est généralement exprimée sous sa forme inactive, le plasminogène, et peut être activée par clivage par le tPA (tissue Plasminogen Activator) (Pang et al., 2016). De façon intéressante, le tPA est sécrété par les synapses axonales lors de forte activité neuronale (Nagappan et al., 2009).

Le pro-domaine est essentiel à la protéine. En effet, en l'absence du pro-domaine, les neurotrophines matures, actives biologiquement, ne peuvent pas être synthétisées en quantités physiologiques. En effet, le pro-domaine des neurotrophines agit comme une chaperonne moléculaire et permet le bon repliement de la protéine (Suter et al., 1991). Cependant, ces pro-domaines ne semblent pas être spécifiques à leur propre neurotrophine. En effet, Jungbluth et al. ont montré que l'échange des pro-domaines de BDNF et NT3, conduit à la formation des deux neurotrophines matures et fonctionnelles (Jungbluth et al., 1994). Cependant, si la séquence primaire du pro-domaine du BDNF est conservée entre les espèces, elle diffère significativement de celle des autres neurotrophines, ce qui indique que le pro-domaine de BDNF pourrait avoir des fonctions uniques (Mizui et al., 2015). En effet, une étude récente révèle une nouvelle fonction pour le pro-domaine (Uegaki et al., 2017). Une fois clivé, le pro-domaine serait capable de se lier avec une haute affinité au BDNF mature spécifiquement (et pas aux autres neurotrophines) afin de réguler son action.

Le clivage du BDNF présente donc un nombre élevé de "points de contrôle", dû à ses différentes pro-protéases (et leur propre régulation). Cette observation met en évidence l'importance de ce clivage, en plus de la régulation de l'expression, dans la fonction de BDNF. Pourtant, à ce jour, les mécanismes de régulation du clivage de BDNF par ces enzymes ne sont pas connus.

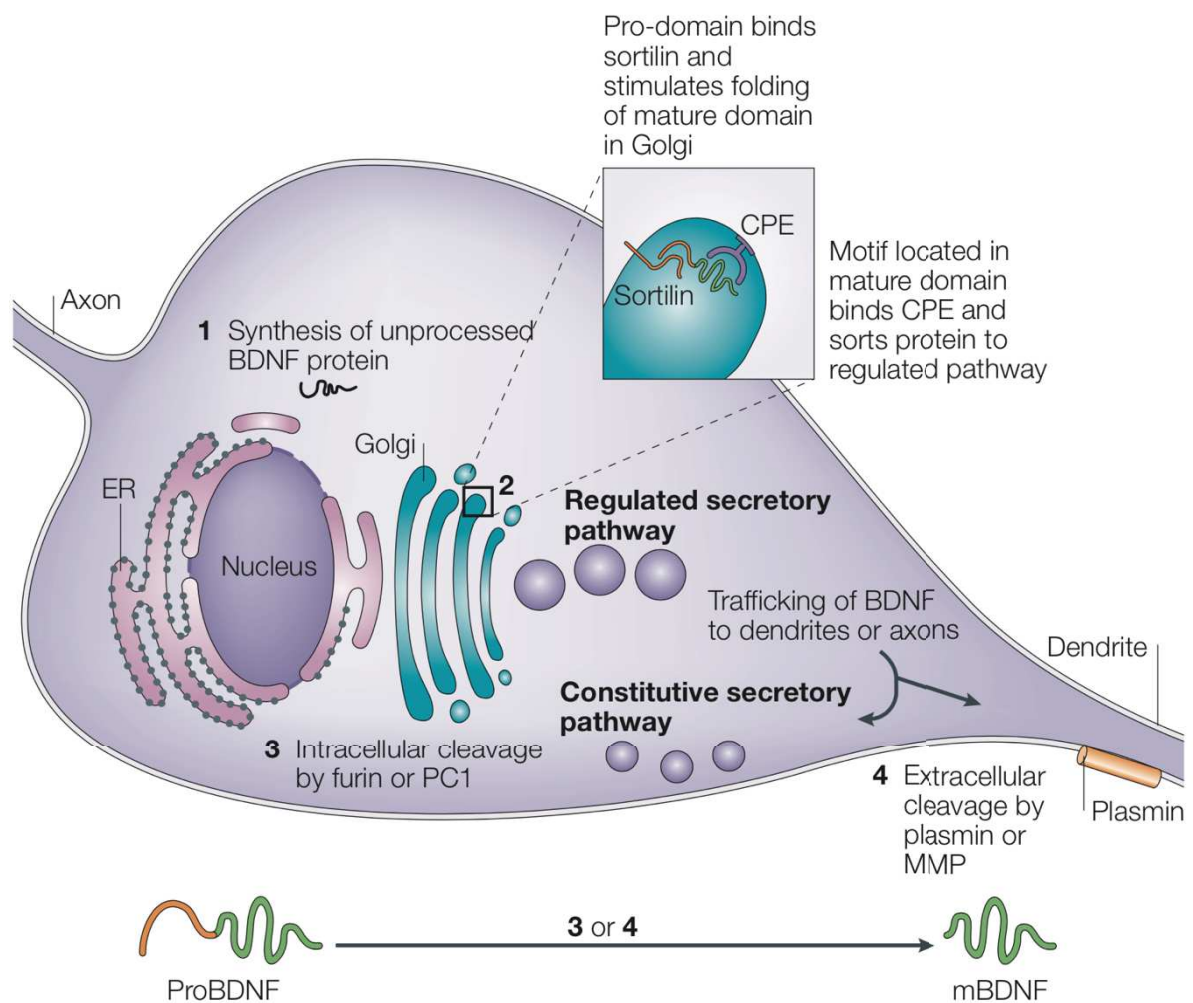


Figure 7. La synthèse et l'adressage de BDNF dans un neurone.

Le BDNF est synthétisé dans le réticulum endoplasmique (1). Dans l'appareil de Golgi, le proBDNF se lie à la Sortiline qui facilite le repliement du domaine mature (2). La carboxypeptidase E (CPE) reconnaît le domaine mature et adresse le BDNF dans des vésicules à cœur dense qui font partie de la voie de sécrétion régulée. Le BDNF peut aussi être adressé dans la voie de sécrétion constitutive. Le BDNF est ensuite transporté le long de l'axone ou des dendrites. Le clivage du BDNF peut avoir lieu dans le Golgi ou les vésicules de sécrétion et est effectué par la furine ou la pro-convertase PC1 (3). Le proBDNF entier peut aussi être sécrété et est clivé par des protéases extracellulaires comme la plasmine et des métalloprotéases de matrice (MMP) (4). D'après Lu et al., 2005.

I.A Adressage, transport subcellulaire et sécrétion

I.A.1 Adressage

A la sortie de l'appareil de Golgi, le BDNF peut être adressé dans deux voies de sécrétion distinctes : la voie constitutive et la voie régulée (**Figure 7**) (Leßmann and Brigadski, 2009).

La voie constitutive est présente dans tous les types cellulaires et est constituée de petites vésicules transportées jusqu'à la membrane cellulaire, qui libèrent leur contenu par défaut, sans mécanisme d'induction, lorsqu'elles atteignent la membrane. Au contraire, la voie régulée existe uniquement dans les cellules excitables, telles que les neurones. Elle est constituée de granules de sécrétion transportées dans les dendrites jusqu'au niveau des épines dendritiques où elles pourront être sécrétées, ainsi que de grosses vésicules à cœur dense (DCV), transportées le long de l'axone et capables de fusionner à la membrane de façon calcium-dépendante (Leßmann and Brigadski, 2009). L'adressage du BDNF dans l'une ou l'autre des voies serait déterminé par des séquences présentes sur le pro-domaine de la protéine. En effet, l'échange des pro-domaines entre différentes neurotrophines altère leur adressage dans l'une ou l'autre des voies de sécrétion. La liaison du pro-domaine de BDNF au NT4/5 augmente drastiquement son adressage vers les voies de sécrétion régulées (Brigadski, 2005). Dans les neurones, le BDNF est majoritairement adressé vers les voies de sécrétion régulées, et est donc empaqueté dans les vésicules à cœur dense (Dieni et al., 2012).

Le NGF et la NT4/5 sont transportés de façon constitutive alors que le BDNF et la NT3 sont libérés selon un mode régulé (Brigadski, 2005; Mowla et al., 1999). Le choix du mode de sécrétion dépendrait également de l'efficacité du clivage par la furine (Mowla et al., 1999). Le proBDNF ne serait pas aussi sensible à la furine que l'est le proNGF. Le site de clivage du proBDNF (RVRR|H) serait moins adapté que le site analogue du proNGF (RSLR|S) à cause du remplacement de la sérine en position +1 du NGF en histidine (Seidah et al., 1996). Le niveau de furine exprimé dans les cellules aurait donc une influence sur le taux de BDNF clivé. Dans des cellules qui expriment des niveaux élevés de furine, comme les fibroblastes, le proBDNF serait majoritairement clivé, et peu de pro-protéine serait sécrétée de façon constitutive. En revanche, dans les cellules avec des niveaux plus faibles de furine, telles que les neurones de l'hippocampe, le proBDNF serait peu clivé et serait majoritairement adressé dans les voies de sécrétion régulées tandis qu'une partie du précurseur serait sécrétée de façon constitutive (Mowla et al., 1999; Seidah et al., 1996). Cependant ce mécanisme n'est toujours pas très bien compris et le rôle de la furine sur le clivage BDNF est encore largement débattu. Quoiqu'il en soit, il semblerait qu'une légère modification du site de clivage pourrait avoir des conséquences majeures sur le traitement de la protéine et donc sur sa fonction.

L'adressage du BDNF nouvellement synthétisé dans les voies de sécrétion régulées semble se faire en deux étapes grâce à deux molécules de tri (Lou et al., 2005). La sortiline est une chaperonne intracellulaire qui se lie au pro-domaine de BDNF pour l'adresser dans la voie de sécrétion régulée (Evans et al., 2011). La carboxypeptidase E (CPE) peut également interagir sur un domaine spécifique du BDNF mature et dicter l'adressage de BDNF (Lou et al., 2005). Cette interaction, qui n'existe pas avec le NGF, permettrait ainsi d'adresser le BDNF vers la voie régulée (Park et al., 2008; Thomas and Davies, 2005).

1.A.2 Transport subcellulaire

Une étude en microscopie électronique sur des neurones hippocampiques de la région du CA1 a permis de localiser avec précision la localisation subcellulaire du BDNF : on le retrouve ainsi au niveau des terminaisons présynaptiques axonales, mais aussi au niveau post-synaptique, dans les dendrites et les épines dendritiques (Harward et al., 2016). Cette observation a été faite dans une lignée de souris mutées pour exprimer un tag HA (haemagglutinin) sur le BDNF, ce qui facilite la détection de la protéine endogène dont les niveaux d'expression sont relativement faibles. Cette localisation suggère qu'après sa sortie du Golgi, le BDNF peut être transporté en direction des dendrites distales et le long de l'axone.

Le BDNF produit au niveau du corps cellulaire, est adressé majoritairement dans des vésicules de la voie de sécrétion régulée qui, dans des neurones hippocampiques en culture, sont transportés préférentiellement dans les dendrites (Goodman et al., 1996; Thomas and Davies, 2005). De plus, l'ARNm du BDNF peut être transporté le long des dendrites jusqu'aux synapses, où il peut alors être synthétisé localement. Comme mentionné précédemment (voir *Partie Structure et Expression du gène BDNF*), les ARNm peuvent être générés avec deux régions non-traduites 3' UTR alternatives. L'utilisation d'animaux transgéniques n'exprimant que la version tronquée de l'ARNm de BDNF, a permis de montrer que l'absence d'UTR 3' longs altère l'adressage dendritique des ARNm de BDNF et a des conséquences sur la fonction de BDNF : la potentialisation à long terme (LTP, *Long Term Potentiation*) est diminuée et la morphologie des épines dendritiques est altérée (An et al., 2008). Cette observation permet de montrer l'importance du rôle de la sécrétion post-synaptique de BDNF. Une autre étude montre que la stimulation des synapses, couplée à des potentiels d'action post-synaptiques entraînaient l'élargissement des têtes des épines dendritiques dans les neurones du CA1, par un mécanisme régulé par le BDNF et qui impliquerait la synthèse de protéines (Tanaka et al., 2008).

Les DCVs contenant le BDNF sont transportées le long de l'axone jusqu'à la région présynaptique (Matsuda et al., 2009; Poo, 2001). Ce flux antérograde a été montré grâce à la détection de BDNF marqué dans les vésicules de transport antérograde des cellules endocrines (Möller et al., 1998), mais également dans des synptosomes (fractions obtenues après homogénéisation de tissu cérébral et contenant toutes les caractéristiques structurales de l'élément présynaptique) préparés à partir de cortex de rat adulte (Fawcett et al., 1997). La première preuve directe de l'existence du transport antérograde et de la sécrétion présynaptique de BDNF a été apportée par une étude sur le transfert inter-neuronale du système visuel de l'embryon de poulet (Bartheld et al., 1996). Les auteurs ont injecté du BDNF iodé dans la rétine et observé la capture de la radioactivité par les cellules de la rétine et une accumulation dans leurs vésicules synaptiques dans le tectum optique, indiquant un transport antérograde. De plus, le [¹²⁵I]-BDNF a été retrouvé dans les dendrites et le corps cellulaire des neurones post-synaptiques, suggérant non seulement un transport du BDNF exogène par le flux axonal antérograde mais également sa libération active à la synapse. Cette voie "transneuronal" requiert ainsi l'internalisation du BDNF dans le soma, les dendrites et les terminaisons axonales, une sécrétion aux terminaisons axonales et un transport en complexe avec son récepteur selon les flux rétrograde et antérograde. D'autres études ont également démontré le transport antérograde de BDNF. En effet, la protéine de BDNF est détectée dans des régions cérébrales ne contenant pas son ARNm, comme le striatum. Altar et al. ont ainsi démontré que la protéine est en fait synthétisée par les neurones de cortex innervant le striatum où le BDNF est relargué à la synapse et endocyté par les neurones striataux (Altar et al., 1997; Conner et al., 1997). En effet, l'immunoréactivité BDNF dans le striatum est fortement diminuée lors du blocage du flux axonal par la colchicine, ce qui indique que le BDNF est synthétisé dans le cortex frontal homolatéral et transporté par le flux axonal antérograde pour être libéré dans le striatum (Altar et al., 1997). La génération d'une lignée de souris avec un knock-out conditionnel de BDNF (Emx-BDNF^{KO}), c'est-à-dire des souris qui n'expriment pas BDNF au niveau du cortex, a permis aussi de montrer l'aspect critique du transport antérograde axonal de BDNF. Ces souris subissent une perte majeure de neurones du striatum, une région qui n'exprime pas de BDNF et dont la survie dépend donc du BDNF sécrété par les neurones afférents, les neurones du cortex (Baquet et al., 2004). Il a été montré que la CPE, protéine membranaire résidente des vésicules de sécrétion antérogades, joue aussi un rôle dans le transport des DCVs contenant du BDNF le long des microtubules. La terminaison cytoplasmique de CPE (qui dépasse en-dehors des vésicules, du côté cytoplasmique) interagit avec le système de transport associé aux microtubules et permet de recruter les moteurs moléculaires (Park et al., 2008). La Huntingtine fait partie de ce complexe moléculaire de transport des vésicules et permet également de promouvoir le trafic axonal des vésicules de BDNF du cortex vers le striatum par

recrutement du complexe moteur (Gauthier et al., 2004). Lorsque la Huntingtine est mutée dans la maladie de Huntington, elle n'est plus capable de transporter efficacement les vésicules de BDNF, ce qui engendre un déficit en BDNF striatal et donc une vulnérabilité de ces neurones, ce qui pourrait être l'une des premières étapes de cette maladie neurodégénérative (Gauthier et al., 2004; Humbert and Saudou, 2004). A l'inverse, une augmentation du transport de BDNF peut aussi être délétère. En effet, un traitement de longue durée avec la L-DOPA (levo-Dihydroxyphenylalanine), traitement symptomatique antiparkinsonien, entraîne des mouvements incontrôlés appelés dyskinésies qui seraient dus à une hypersensibilisation des récepteurs (Kostrzewa et al., 2005). Il a ainsi été démontré que les dyskinésies étaient produites par une suractivation dopaminergique qui entraînait en retour une surexpression de BDNF dans le cortex, suivie d'une augmentation de sa libération dans le striatum via son transport cortico-striatal antérograde ce qui entraîne à son tour une surexpression striatale du récepteur D3 (Guillin et al., 2001). Le BDNF serait donc à l'origine du lien existant entre dyskinésie due à la L-DOPA et hypersensibilisation dopaminergique.

1.A.3 Sécrétion

Les mécanismes de la régulation de la sécrétion du BDNF sont activement étudiés. L'exocytose des vésicules contenant le BDNF (et/ou le proBDNF) peut être déclenchée par une augmentation de calcium cytoplasmique (Blöchl and Thoenen, 1996; Leßmann et al., 2003). L'augmentation du niveau intracellulaire de calcium peut faire suite à une dépolarisation membranaire due à l'activation des synapses glutamatergiques via les canaux récepteurs NMDA et/ou de l'activation des canaux calciques voltage-dépendants (Hartmann et al., 2001; Matsuda et al., 2009). Le calcium active CaMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II) qui entraîne la fusion des granules de sécrétion (Kolarow et al., 2007). La sécrétion peut aussi être déclenchée par des facteurs extracellulaires, y compris par les neurotrophines elles-mêmes (Krüttgen et al., 1998). La sécrétion de BDNF est provoquée par des stimulations à haute fréquence (HFS) ou encore par les stimulations Theta-Burst (TBS) (Balkowiec and Katz, 2002; Gärtner and Staiger, 2002).

La sécrétion des neurotrophines peut avoir lieu à partir des terminaisons présynaptiques, comme observé dans des neurones en culture (Kohara et al., 2001) et *in vivo* (Altar et al., 1997; Baquet et al., 2004; Bartheld et al., 1996). Cependant, des études plus récentes ont utilisé un BDNF lié à un tag fluorescent sensible au pH sur des neurones d'hippocampe en culture (Matsuda et al., 2009). Ce tag permet de voir le BDNF quand il est sécrété. Grâce à cet outil, les auteurs ont montré que la sécrétion axonale de BDNF nécessite une activité neuronale à haute fréquence (> 100 Hz), alors que la sécrétion dendritique a lieu même après une stimulation de basse fréquence (1-10 Hz). Ceci suggère que dans des conditions physiologiques, l'activité neuronale est plus

susceptible d'induire l'exocytose du BDNF stocké dans le compartiment post-synaptique. De plus, les vésicules contenant les neurotrophines ont des différences selon qu'elles sont axonales ou dendritiques, notamment par les isoformes de synaptotagmine qui leur sont associées (Dean et al., 2012), ce qui pourrait changer leur sensibilité au calcium local et donc leur sécrétion. Au niveau des terminaisons présynaptiques, synaptotagmin-IV (Dean et al., 2009), et les SNAREs Syb2, SNAP25 et SNAP47 (Shimojo et al., 2015) régulent la sécrétion de BDNF dépendante de l'activité.

Lors de la différenciation en axone, le BDNF sécrété au niveau du cône de croissance de l'axone pourrait agir de façon autocrine afin de favoriser l'initiation et la croissance de l'axone. Les mécanismes impliqués seraient une boucle de rétroaction positive de sécrétion de BDNF induite par la neurotrophine elle-même, ainsi que le recrutement du récepteur de BDNF, TrkB, à la membrane (Cheng et al., 2011). Un effet autocrine sur la pousse des dendrites a aussi été observé (Wang et al., 2015).

Le BDNF extracellulaire peut également être recyclé par endocytose au niveau postsynaptique. Ces vésicules d'endocytose constituent une réserve de neurotrophines prêtes à être libérées lorsque l'activité neuronale augmente (Santi et al., 2006; Wong et al., 2015).

I.B Mécanismes d'action et fonctions du BDNF

Les neurotrophines agissent via l'activation des récepteurs membranaires de la famille des Trk (Tropomyosin-related kinase) mais également via le récepteur p75^{NTR} (pan 75 kDa neurotrophin receptor). Le récepteur TrkB est spécifique du BDNF et a une forte affinité pour sa forme mature (Lu et al., 2005). Le p75^{NTR} est quant à lui activé par toutes les pro-neurotrophines, dont le proBDNF, avec une plus faible affinité (Lee et al., 2001).

I.B.1 Les récepteurs du BDNF

a Le TrkB

Le récepteur TrkB est une protéine transmembranaire hautement glycosylée qui appartient à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase et à la famille des récepteurs Trk constituée de TrkA, TrkB et TrkC. Chacun de ces homologues tend à se lier spécifiquement à une neurotrophine : TrkA est le récepteur de NGF, TrkB celui de BDNF et NT4/5 et TrkC celui de NT3, même s'il a été noté certains chevauchements dans certaines populations cellulaires (le NT3 peut se lier à TrkB par exemple) (Barbacid, 1994).

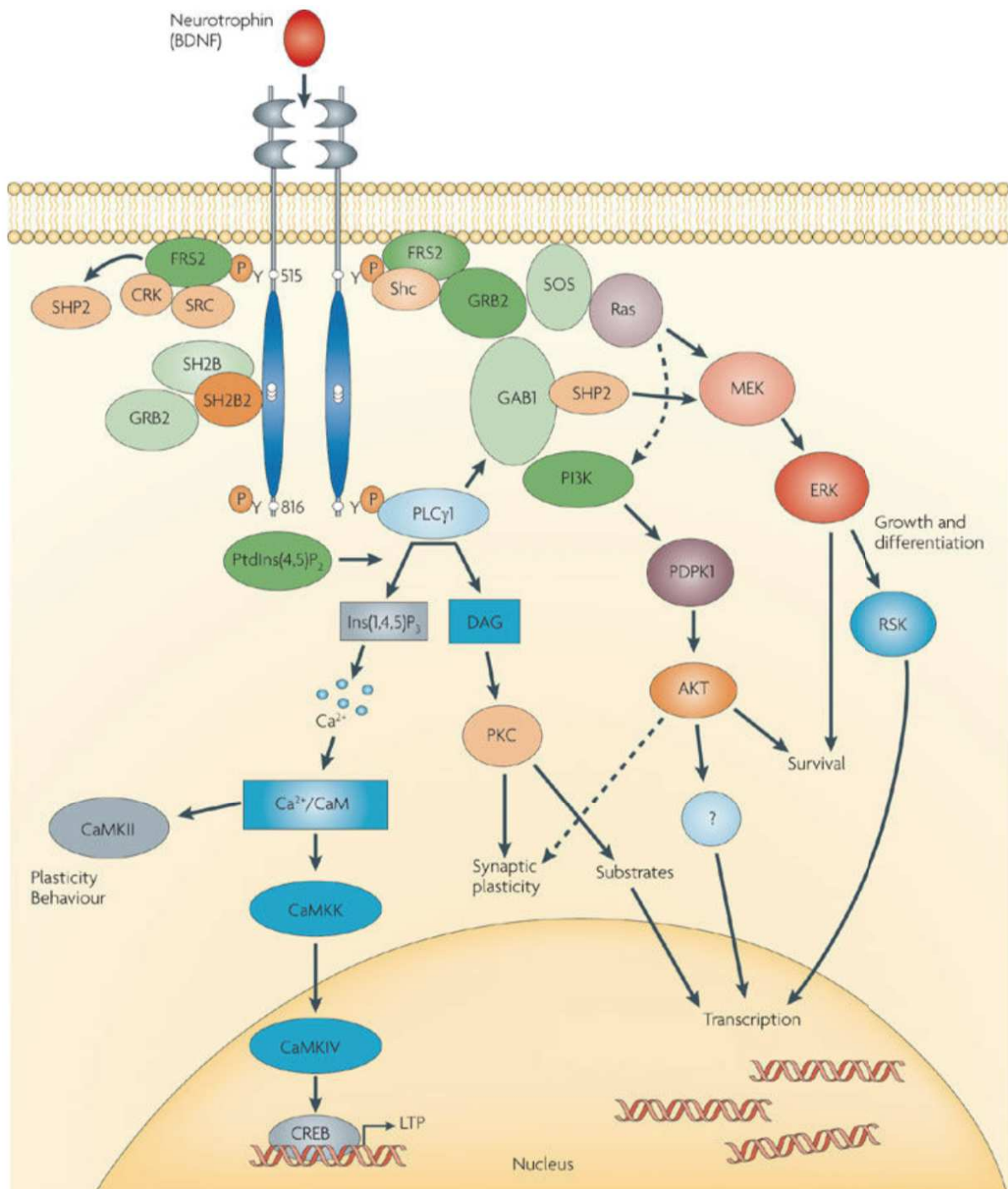


Figure 8. Principales voies de signalisation activées par le récepteur TrkB.

L'interaction entre BDNF et le récepteur active trois principales voies de signalisation. La phosphorylation de TrkB au niveau de la tyrosine 515 active la voie ras/MEK/ERK qui induit des mécanismes de croissance, de différenciation et de survie. La voie Pi3K/Akt participe également à la survie et aussi à la régulation transcriptionnelle de gènes importants. La voie PLCγ qui favorise la plasticité synaptique et active le facteur de transcription CREB. D'après Minichiello, 2009.

Le récepteur TrkB est exprimé dans toutes les régions où on trouve BDNF, telles que le cortex, l'hippocampe, le striatum, le cervelet, le thalamus et l'hypothalamus, dans les SNP ainsi que dans le cœur et les vaisseaux périphériques (Klein et al., 1990; Wagner et al., 2005; Yan et al., 1997). Au niveau de l'hippocampe, le TrkB est retrouvé essentiellement dans les neurones pyramidaux glutamatergiques et dans les cellules granulaires du gyrus denté (Bramham and Messaoudi, 2005)

Le TrkB est composé d'une région extracellulaire liant le BDNF, une région transmembranaire et une région cytoplasmique contenant le domaine kinase effecteur (Skaper, 2008). La région extracellulaire consiste en trois domaines riches en leucines entre lesquels d'intercalent deux domaines riches en cystéines, suivis de deux domaines de type immunoglobuline. Cette région extracellulaire est la région d'interaction avec le BDNF même si les sites de liaisons spécifiques ne sont pas connus avec exactitude. La région transmembranaire relie la région extracellulaire à la région cytoplasmique. Cette dernière comprend un site de fixation à la protéine adaptatrice Shc (Y515), un cœur tyrosine kinase (Y701, Y705 et Y706) et une partie terminale contenant le site de fixation de la phospholipase C-gamma (PLC- γ) (Y816).

Suite à la fixation de l'homodimère de BDNF mature, le récepteur TrkB forme un dimère avec un autre TrkB. Les deux récepteurs dimérisés autophosphorylent alors les résidus tyrosine de leur cœur tyrosine kinase cytoplasmique (Cunningham and Greene, 1998). Les tyrosines au cœur du domaine catalytiques (Y701, Y705 et Y706) sont tout d'abord phosphorylées, puis les tyrosines juxtamembranaires Y515 et C-terminales Y816 sont phosphorylées à leur tour, ce qui permet le recrutement de protéines partenaires de signalisation. La tyrosine Y515 est reconnue par les protéines possédant un domaine PTB (PhosphoTyrosine Binding), notamment les protéines Shc (Src homology collagen), FRS2 (Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2) et Grb2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2). La tyrosine C-terminale Y816 est quant à elle reconnue par les protéines à domaine SH2 (Src Homology 2) telles que PLC- γ 1 (PhosphoLipase C- γ 1) et CHK (Cst-Homologous Kinase) (Skaper, 2008). La phosphorylation des protéines partenaires entraîne leur activation et la propagation du message selon trois cascades de signalisation majeures : la voie des PI3-kinases (PI3-kinase/Akt) et la voie MEK/ERK (Ras/Raf/MEK/ERK) en aval du site Y515, et la voie de la phospholipase C gamma 1, en aval du site Y816 (**Figure 8**) (Minichiello, 2009).

b Le p75^{NTR}

Le p75^{NTR} est le membre fondateur de la superfamille des récepteurs aux facteurs de nécrose tumorale (TNF, *Tumor Necrosis Factor*) et a d'abord été identifié comme un récepteur de faible

affinité au NGF, le NGFR (Skaper, 2008). Après la découverte des autres membres de la famille des neurotrophines, il a été montré que NGFR avait la même affinité pour toutes les pro-neurotrophines et fut renommé p75^{NTR} pour récepteur aux neurotrophines de 75 kDa (Rodriguez-Tébar et al., 1990).

L'expression du p75^{NTR} est similaire à celle du proBDNF : il est fortement exprimé dans de nombreuses régions du système nerveux au cours du développement post-natal, puis dans le cerveau adulte, son expression est stabilisée à un niveau plus faible que celui des Trk (Dincheva et al., 2016). Le profil d'expression de p75^{NTR} est souvent superposable à celui des Trk, de nombreux types de neurones expriment les deux récepteurs (Chao and Hempstead, 1995). Ces neurones peuvent répondre à des doses de neurotrophines beaucoup plus faibles *in vitro* que les neurones exprimant seulement un Trk (Hantzopoulos et al., 1994). L'expression de p75^{NTR} peut être stimulée suite à des traumatismes cérébraux dans les neurones corticaux, le striatum, le cortex entorhinal, les cellules de Purkinje et la moelle épinière (Roux and Barker, 2002).

Le p75^{NTR} est un récepteur transmembranaire de type I composé d'un domaine extracellulaire interagissant avec les neurotrophines, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire effecteur. Le domaine extracellulaire est caractéristique de la superfamille des TNF par le fait qu'il est composé de quatre motifs riches en cystéines (Roux and Barker, 2002). Chacun de ces domaines riches en cystéines, numérotés de 1 à 4 à partir de l'extrémité N-terminale, contient 3 ponts-disulfures conférant sa conformation tridimensionnelle au récepteur et permettant la liaison des ligands. D'après l'étude de la structure cristalline obtenue par Christopher Garcia et son équipe, la formation du complexe NGF/p75^{NTR} modifie la conformation du NGF qui devient dissymétrique (He and Garcia, 2004). Le domaine transmembranaire joue un rôle important dans la dimérisation du récepteur, dans le changement de conformation induit par la liaison du ligand et dans la transduction du signal (Vilar et al., 2009). Le p75^{NTR} diffère cependant des autres membres par sa tendance à se dimériser plutôt qu'à se trimériser et par la nature de ses ligands, les neurotrophines, qui ne partagent aucune similarité avec les ligands des autres récepteurs de la famille (Roux and Barker, 2002).

Contrairement aux récepteurs Trk, le récepteur p75^{NTR} ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque. Après la liaison des pro-neurotrophines, le p75^{NTR} peut recruter plusieurs protéines adaptatrices (**Figure 9**). Le récepteur possède un domaine de mort cellulaire, commun aux autres membres de cette superfamille, un domaine Chopper et une séquence de liaison aux protéines à domaines PDZ (*Post-synaptic Disc-large Zona*) située à l'extrémité C-terminale. Ces protéines permettent l'assemblage de complexes protéiques servant de plateforme de signalisation pour l'activation de différentes voies (Roux and Barker, 2002). Le domaine intracellulaire est également

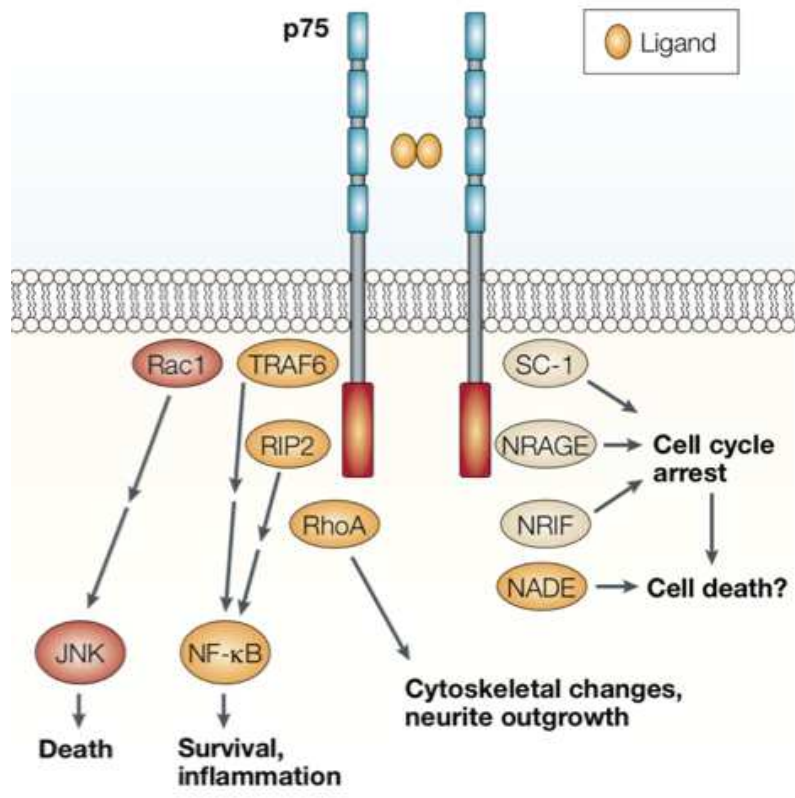


Figure 9. Voies de signalisation activées par le récepteur p75^{NTR}.

La liaison des proneurotrophines sur p75^{NTR} active NF-κB et c-Jun N-terminal kinase (JNK) et module l'activité de RhoA. Ces réponses sont médiées par le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices, qui se lient à la partie cytoplasmique de p75^{NTR}, notamment neurotrophin-receptor interacting factor (NRIF), neurotrophin-associated cell death executor (NADE), neurotrophin-receptor-interacting MAGE homologue (NRAGE), Schwann cell 1 (SC1) et receptor-interacting protein 2 (RIP2) qui ont des effets sur l'apoptose, l'élongation des neurites de l'arrêt de la croissance. D'après Chao, 2003.

sujet à des modifications post-traductionnelles telles que diverses phosphorylations qui sont impliquées dans le recrutement de multiples partenaires protéiques.

1.B.2 Effets positifs via Le récepteur TrkB

La phosphorylation de la tyrosine Y515 de TrkB active deux voies de signalisation : la voie PI3-K/Akt qui favorise la survie cellulaire ainsi que la voie MEK/ERK qui stimule la différenciation et la pousse neuritique (Figure 8).

La voie des PI3-kinases aboutit à l'activation de la Sérine/Thréonine kinase Akt (aussi connue sous le nom de Protein kinase B, PKB). Cette enzyme joue un rôle majeur dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans la survie cellulaire en inhibant les gènes pro-apoptotiques via l'inactivation de BAD (Bcl-2-Associated Death promoter). La voie des MEK/ERK peut être activée par Shc ainsi que par FRS2. Une fois phosphorylées, ces deux protéines partenaires activent chacune leur voie de signalisation qui conduit à l'activation des petites protéines Ras et Raf, puis MEK puis ERK (Minichiello, 2009). Ces protéines sont impliquées dans la différenciation neuronale au cours du développement du système nerveux central (Qian et al., 1998). La complexité des voies utilisées permet à la fois une activation soutenue de la voie MEK/ERK en réponse aux neurotrophines mais aussi une régulation fine et complète de la différenciation neuronale.

La phosphorylation de tyrosine Y816 active la voie de la PLC- γ qui régule la plasticité synaptique. Cette voie permet la régulation des taux intracellulaires de Calcium et de l'activité de PKC (*Protein Kinase C*) via le clivage de son substrat, le PIP2 (Phosphatidyl-Inositol-diPhosphate), en IP3 (Inositol-1,4,5-triPhosphate) et DAG (DiAcyl Glycerol). Cette voie de signalisation a été impliquée dans la libération neurotrophine-dépendante des neurotrophines et dans la plasticité synaptique (Minichiello, 2009).

Ces voies convergent vers le noyau pour induire ou réprimer la transcription génique. Les facteurs de transcription CREB (Cyclic AMP Response Element Binding protein) et c-fos sont impliqués dans les réponses rapides suite à l'interaction BDNF-TrkB (Finkbeiner et al., 1997). La voie MEK/ERK active RSK (Ribosomal S6 Kinase), qui à son tour active CREB. CREB contrôle la transcription de gènes essentiels à la prolifération, la survie et la différenciation des neurones, ainsi qu'à la formation des neurites (Reichardt, 2006). Notamment, CREB régule la transcription du gène *BDNF*, ce qui implique une régulation BDNF-dépendante de ces propres taux (Tao et al., 1998). D'autres voies de survie ont été proposées, impliquant par exemple Forkhead 1, facteur de transcription qui induit l'apoptose en augmentant les taux de FasL. En effet, Akt phosphoryle directement Forkhead 1, ce qui l'inhibe et permet la survie de la cellule (Brunet et al., 1999).

Il est important de noter que le récepteur TrkB peut exister sous deux formes tronquées. Contrairement à la forme entière TrkB-FL (pour *Full Length*), les deux formes tronquées (TrkB-T1 et TrkB-T2) n'ont pas l'extrémité C-terminale de la protéine. Les formes tronquées de TrkB sont capables de lier le BDNF mature avec la même affinité que le TrkB-FL, mais l'absence de domaine tyrosine kinase et de site de fixation à des protéines adaptatrices rend leur fonction difficile à élucider. Certaines études suggèrent que TrkB-T1 permettrait d'inhiber l'induction des cascades de signalisation déclenchées lors de l'activation de TrkB par BDNF (Biffo et al., 1995; Fenner, 2012). Une autre étude propose que l'activation des TrkB tronqués pourrait être impliquée dans la survie et la prolifération neuronale via un mécanisme impliquant le calcium (Islam et al., 2009). D'une manière générale, les TrkB tronqués sont supposés servir de leurres en interagissant avec le BDNF sans être activés. Les TrkB tronqués sont ensuite internalisés, retirant ainsi le BDNF du milieu extracellulaire (Biffo et al., 1995).

L'ensemble de ces études montre donc que le BDNF mature, en se fixant au récepteur TrkB, induit l'activation de cascades favorisant la survie, la différenciation et la plasticité neuronale, ce que l'on peut qualifier d'effets positifs du BDNF ou effet « Yang » du BDNF (Lu et al., 2005).

1.B.3 Effets négatifs via le récepteur p75^{NTR}

Ce récepteur, capable de lier toutes les pro-neurotrophines avec la même affinité, a des effets diamétralement opposés de ceux de TrkB. Les voies de signalisation qui en découlent sont nombreuses et régulées par plusieurs protéines adaptatrices telles que Traf6, NRIF (*Neurotrophin Receptor-Interacting Factor*), NRAGE (*Neurotrophin Receptor p75 interacting MAGE homologue*), SC1 (*Schwann Cell factor 1*), RhoGDI et d'autres protéines (Yamashita et al., 2005). L'une des voies majeures déclenchées par p75^{NTR} est la cascade de signalisation de la kinase Jun, qui aboutit à l'activation de p53 et l'induction de l'expression du ligand Fas, capable d'activer le récepteur Fas et activant la mort par apoptose (Haase et al., 2008).

Le récepteur p75^{NTR} est également capable de s'associer à d'autres récepteurs membranaires. Alors que la sortiline intra-golgiennne est essentielle à l'adressage correct du proBDNF dans les vésicules de sécrétion, la sortiline présente au niveau des synapses peut jouer le rôle de co-récepteur essentiel pour la transmission du message pro-apoptotique du proBDNF via p75^{NTR} (Teng et al., 2005). En se liant au pro-domaine du proBDNF, la sortiline régule la mort cellulaire et la rétractation des cônes de croissance (Deinhardt et al., 2011). De plus, l'utilisation de souris knock-out de la sortiline suggère que la sortiline est aussi capable d'interagir directement avec

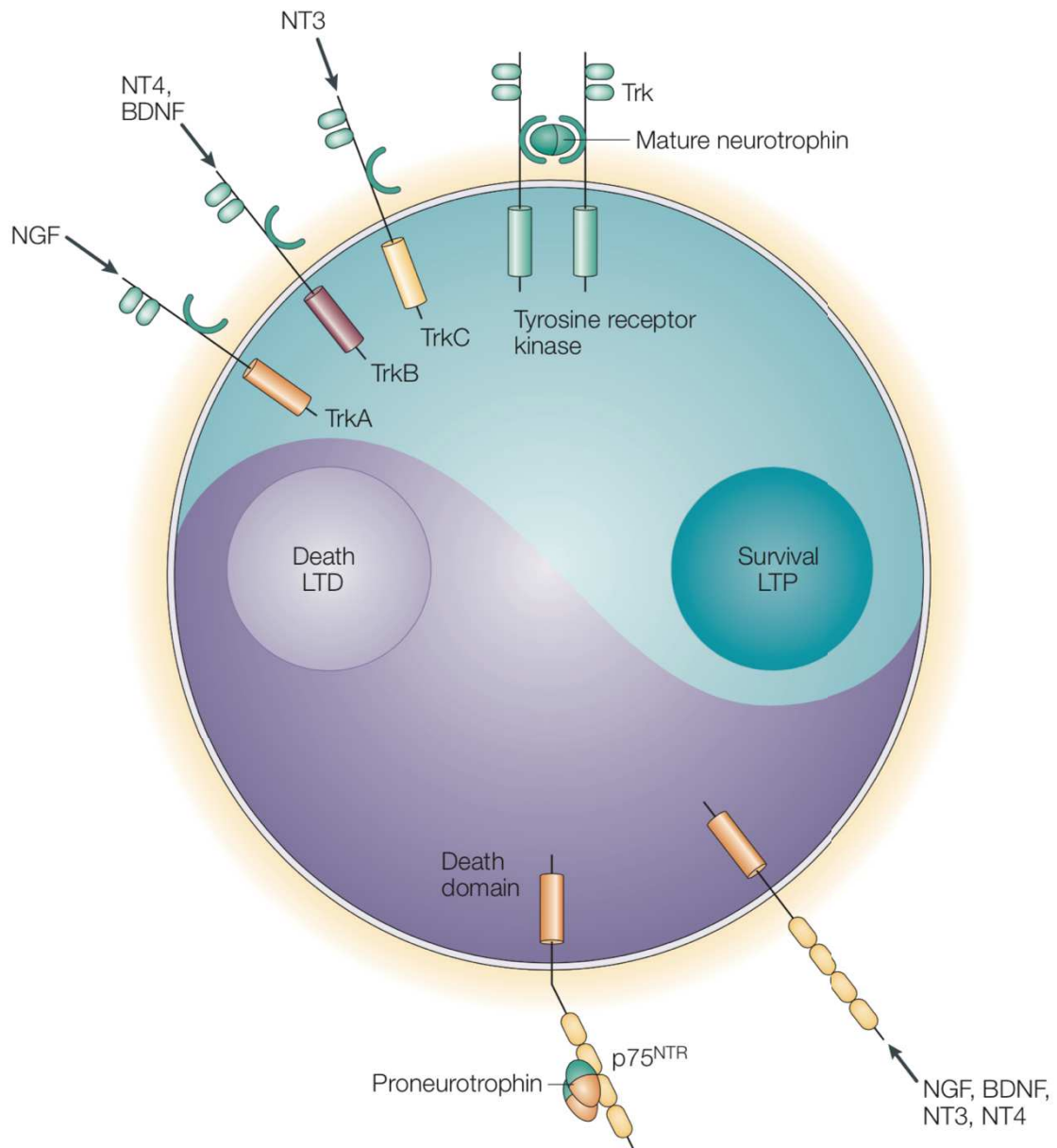


Figure 10. Le Yin et le Yang des fonctions des neurotrophines et de leurs récepteurs.

L'action des neurotrophines est médiée par deux types de récepteurs. Les pro-neurotrophines se lient au récepteur p75^{NTR} qui active les voies de signalisation d'apoptose et de dépression à long-terme, alors que les neurotrophines matures reconnaissent préférentiellement les Trk qui déclenchent les voies de signalisation de survie, différenciation et potentialisation à long terme (LTP). Le nerve growth factor (NGF) reconnaît TrkA, BDNF et la neurotrophine 4/5 (NT4/5) activent TrkB et la neurotrophine 3 (NT3) se lie à TrkC. D'après Lu et al., 2005.

les Trk pour améliorer le transport antérograde et les effets des neurotrophines (Vaegter et al., 2011). En parallèle de ces effets propres, le p75^{NTR} est également capable d'interagir avec les récepteurs Trk et d'agir en tant que corécepteur pour améliorer leur affinité et la spécificité de liaison avec les neurotrophines matures et ainsi renforcer leur action pro-survie (Chao, 2003). Alors que le TrkB exprimé seul est capable de répondre au BDNF, au NT3 et au NT4/5, seul le BDNF peut l'activer efficacement lorsque le p75^{NTR} est co-exprimé (Bibel et al., 1999). Le p75^{NTR} peut aussi interagir avec NogoR et Lingo1 pour réguler la croissance axonale (Mi et al., 2004), mais aussi Neurophilin-1 et Ephrin-A (Teng et al., 2010).

Ainsi, le proBDNF, contrairement au BDNF mature, en se fixant préférentiellement au récepteur p75^{NTR}, active les cascades de signalisations qui induisent la mort (Teng et al., 2005), la rétraction des cônes de croissance cellulaire (Anastasia et al., 2013) et la LTD synaptique (Woo et al., 2005). Ces effets dits négatifs constituent alors le rôle « Yin » du BDNF.

1.B.4 Importance de la balance pro/mature

La théorie du Yin et du Yang des neurotrophines a été évoquée pour la première fois par Bai Lu en 2005 lors d'une revue sur les rôles et le fonctionnement des neurotrophines (Lu et al., 2005). En effet, comme abordé précédemment, les neurotrophines peuvent être retrouvées sous leur forme de précurseur protéique et sous leur forme mature. Ces deux formes se lient à des récepteurs ayant des fonctions diamétralement opposées. Le clivage protéolytique des pro-neurotrophines est donc une étape clé qui gouverne les fonctions des neurotrophines. De plus, bien que de multiples études supportent l'action « Yang » des neurotrophines matures, relativement peu se sont intéressées à l'aspect « Yin » du modèle selon lequel les pro-neurotrophines agissent via le récepteur p75^{NTR} (**Figure 10**). Il reste donc encore de nombreuses questions à élucider.

L'équilibre entre les deux formes est crucial pour le bon fonctionnement de BDNF. En effet, cette balance est déséquilibrée dans plusieurs pathologies (Carlino et al., 2013). Des modifications dans les niveaux de BDNF ont été associées à des maladies neurodégénératives (notamment maladie d'Alzheimer, de Huntington) et dans des troubles neuropsychiatriques (dépression, anxiété, épilepsie, troubles bipolaires, schizophrénie et addiction) et dans les cas d'obésité (Anastasia and Hempstead, 2014). La détection du ratio mBDNF/proBDNF pourrait donc servir de biomarqueur de neuropathologies.

Lorsque la forme mature est plus faiblement exprimée, la mort neuronale est plus importante, comme dans le cas des maladies neurodégénératives. Par exemple, l'étude d'une souris modèle

de la maladie de Huntington (zQ175 hétérozygotes) montre une réduction de 50% de BDNF mature dans le striatum spécifiquement à 6 mois et une réduction de 50% et 60% respectivement dans le cortex et le striatum à 12 mois, sans induction de proBDNF (Ma et al., 2015). Puisque le proBDNF n'augmente pas au niveau du striatum, mais que le BDNF mature diminue fortement, la mort neuronale observée peut donc être attribuée à un défaut de BDNF mature, donc à un défaut de signaux de survie plutôt qu'une induction de la mort en tant que telle. Toutefois, il faut noter que l'étude de BDNF dans les cas de pathologies est difficile puisque la balance entre les deux isoformes n'est pas le seul paramètre altéré. En effet, le niveau global de BDNF est aussi souvent modifié. D'ailleurs, chez les souris zQ175, les niveaux de proBDNF sont réduits d'environ 50% dans l'hippocampe et le cortex dès 6 mois alors que le proBDNF n'est pas détecté dans le striatum, même chez des souris plus jeunes (P15).

Dans la maladie d'Alzheimer, les niveaux de proBDNF et mBDNF ont été mesurés chez des patients et varient au cours de la progression de la maladie. A l'apparition de symptômes (déficience cognitive légère), le proBDNF est réduit de 20% alors que le mBDNF est réduit de 30% ; lorsque les symptômes sont modérés, le proBDNF est réduit de 30% alors que le mBDNF est réduit de 62% (Peng et al., 2005). Les niveaux en phase terminale montrent une réduction dramatique de l'ARNm de BDNF, de ces deux isoformes protéiques ainsi que de TrkB (Ferrer et al., 1999; Michalski and Fahnstock, 2003). La diminution des niveaux de BDNF et la diminution du ratio mBDNF/proBDNF pourraient donc précéder le déclin qui apparaît plus tard dans la maladie.

Dans plusieurs troubles neurodégénératifs, comme la sclérose en plaque, les niveaux de BDNF sont également réduits (Azoulay et al., 2005). Il en est de même dans le plasma des patients schizophrènes (Tan et al., 2005a, 2005b), chez lesquels le BDNF mature est spécifiquement réduit (>40% de réduction) (Weickert et al., 2003). Une autre étude semble confirmer ce postulat à partir de cerveaux post-mortem de patients montrant une réduction de 23% de BDNF mature (Wong et al., 2010). La diminution de BDNF mature a aussi été observé dans l'hippocampe et le cortex préfrontal chez les victimes de suicide (Karege et al., 2005)

Certaines études montrent également des variations d'expression de proBDNF. En effet, une diminution de proBDNF est observée dans les cerveaux post-mortem de patients atteints de dépression ou de troubles bipolaires (Dunham et al., 2009). Cependant, d'autres études montrent au contraire que les niveaux de proBDNF restent inchangés tandis que les niveaux de BDNF matures sont plus faibles chez les patients dépressifs (Yoshida et al., 2012). Globalement, le niveau de BDNF a été reporté comme étant diminué chez les patients souffrant de dépression,

et de nombreuses études montrent qu'un niveau de BDNF bas est associé à des troubles dépressifs en cours (Castrén et al., 2007; Molendijk et al., 2014).

Ainsi, il semblerait que des altérations du clivage de BDNF pourraient avoir un effet additif et/ou multiplicateur participant à l'évolution des événements neurodégénératifs. Cette question reste cependant très peu étudiée, notamment à cause du manque d'outil spécifique permettant de discriminer les 2 formes chez les patients. Ainsi il serait intéressant de comprendre comment ce clivage est contrôlé et dans quel contexte cette régulation peut favoriser la balance Yin ou Yang.

I.C Modifications pouvant influencer la fonction du BDNF

Le site de clivage du proBDNF (RVRR|H) diffère de celui du proNGF (RSLR|S) en ce que la sérine en position +1 du NGF est remplacée par une histidine (Seidah et al., 1996). Cette légère modification du site de clivage, rend le proBDNF moins sensible à la furine, ce qui affecte son taux de clivage et engendre des différences sur le ratio proBDNF/BDNF et donc sur sa fonction. La question est de savoir s'il existe des modifications au sein du BDNF qui influent sur son clivage, et donc sa fonction.

I.C.1 Les Polymorphismes nucléotidiques

a Généralités sur les SNPs

Le polymorphisme nucléotidique (SNP, *Single-Nucleotide Polymorphism*) est une variation d'une seule paire de base du génome, entre individus d'une même espèce. Ces variations sont très fréquentes puisqu'en moyenne, un SNP est rencontré tous les 100 à 1000 nucléotides, ce qui signifie que le génome humain pourrait en compter de 5 à 10 million (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015). Ces SNPs peuvent survenir dans un exon et possiblement avoir des conséquences sur la protéine exprimée, ou dans un intron et peuvent alors modifier la régulation du gène. La plupart des SNPs sont silencieux, de par la redondance du code génétique, ou n'ont tout simplement pas de conséquences fonctionnelles. En revanche, certains SNPs modifient (et parfois permettent de prédire) les réponses de certains individus à des traitements ou à des facteurs environnementaux comme des toxines, ou encore les prédispositions à certaines maladies. Chez l'Homme, deux polymorphismes ont été décrits dans le gène du BDNF : G196A plus connu sous le nom de Val66Met et le C270T (ou rs56164415). Il existe une trentaine d'autres variants nucléotidiques identifiés sur le BDNF : Val66Met (exon2), rs8192466 G/C ou G/A ou G/T C270T, G712A, G11757C, rs1519480 C/T, rs11030104 A/G, rs7103411 C/T, rs7127507 C/T, rs988748 C/G, rs2030324 C/T, rs12273363 C/T, rs2049045 C/G, etc. (Kitts and Sherry, 2011;

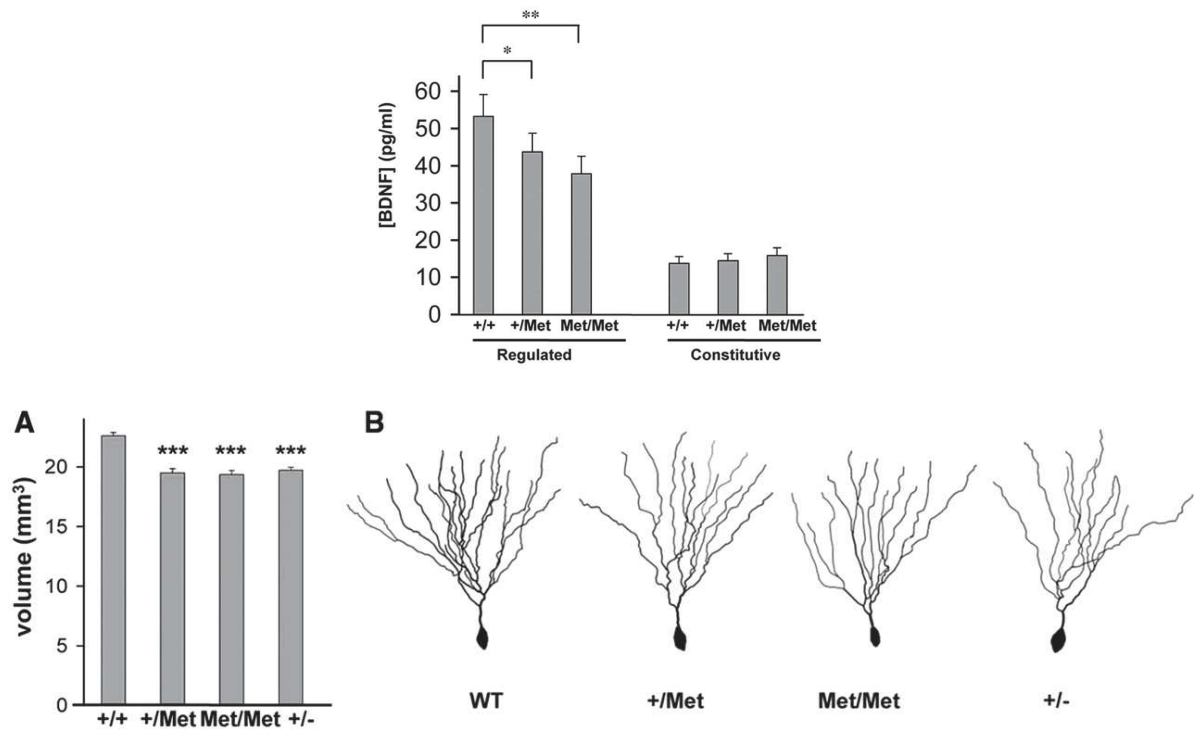


Figure 11. Conséquences du polymorphisme Val66Met sur la sécrétion du BDNF et la morphologie neuronale.

Des neurones d'hippocampe et de cortex d'embryons (E18) de souris BDNF^{+Met} (+/Met), BDNF^{Met/Met} (Met/Met) et de souris sauvages ont été mis en culture. **(haut)** Après 72 heures, les milieux ont été collectés dans des conditions de sécrétion provoquée (par dépolarisation) ou basale (constitutive) et analysés par ELISA BDNF. **(milieu)** Altération de la morphologie de l'hippocampe chez les souris transgéniques BDNF^{Met}. **(A)** Estimations des volumes totaux de l'hippocampe de souris adultes sauvages (+/+), hétérozygotes (+/Met), homozygotes (Met/Met) et hétérozygotes KO pour le BDNF (+/-). **(B)** Exemples de neurones de gyrus denté de souris adultes sauvages (+/+), hétérozygotes (+/Met), homozygotes (Met/Met) et hétérozygotes KO pour le BDNF (+/-). Extrait de Chen et al., 2006.

Figure 12. Conséquences du polymorphisme Val66Met sur la potentialisation à long terme.

La potentialisation à long terme a été étudiée sur des hippocampes issus de souris BDNF^{Met/Met} de 4 mois et de leurs contrôles au niveau des synapses CA3-CA1. La LTP induite par une stimulation en thêta-burst est altérée chez les souris BDNF^{Met/Met}. Extrait de Ninan et al., 2010.

Liu et al., 2008; Weinstock-Guttman et al., 2011; You et al., 2010). Cependant, seuls le Val66Met et le C270T ont été étudiés et reliés à des risques pour des maladies psychiatriques (Guo et al., 2018).

b Le SNP G196A : Val66Met

L'échange de la guanine à la position 196 par une adénine cause le remplacement du résidu valine par un résidu méthionine au niveau du codon 66. Ce SNP est ainsi nommé Val66Met (ou G196A) et se retrouve dans la région codant pour le pro-domaine du gène. Ce polymorphisme est relativement fréquent au sein de la population caucasienne : 27-43% des individus sont hétérozygotes Val/Met et 4-8% sont homozygotes Met/Met (Egan et al., 2003; Ventriglia et al., 2002). La population asiatique est particulièrement concernée puisque 65% de la population exprime ce SNP (50% Val/Met et 15% Met/Met) (Itoh et al., 2004). Le polymorphisme Val66Met n'existe pas chez les animaux, mais ses effets ont été étudiés *in vitro* en utilisant des méthodes de transfection et *in vivo* avec des animaux knock-in, mutés pour exprimer le polymorphisme (Chen et al., 2006).

Comment la substitution Val66Met altère-t-elle la fonctionnalité du BDNF ? Comme mentionné précédemment, le pro-domaine du BDNF est impliqué dans l'adressage de la protéine dans les voies de sécrétion. Les mutants met-BDNF ne sont pas adressés efficacement dans la voie régulée, alors que la voie de sécrétion constitutive n'est pas affectée (Egan et al., 2003). La sécrétion de BDNF dépendante de l'activité est donc fortement affectée chez les individus portant la mutation. Il est intéressant de remarquer que la Huntingtine régule le transport des vésicules contenant le val-BDNF, mais ne régule pas les vésicules contenant du met-BDNF, qui ont déjà un nombre réduit de vésicules (del Toro et al., 2006). Cependant, le mécanisme par lequel la huntingtine discrimine les vésicules contenant l'un ou l'autre des SNP reste à élucider. D'autre part, le remplacement de la guanine par une adénosine perturbe l'interaction de l'ARNm de BDNF avec la translin, ce qui restreint le transport des ARNm en direction des dendrites (Chiaruttini et al., 2009). Ces observations ont été confirmées grâce à des lignées de souris mutées pour exprimer le polymorphisme sur l'un (Val/Met) ou les deux (Met/Met) allèles (Chen et al., 2006). Les cultures primaires de neurones issus de ces souris knock-in ont permis de mettre en évidence des déficits sévères dans la sécrétion de BDNF dépendante de l'activité, alors que le niveau global de BDNF dans le cerveau reste similaire à celui des souris val-BDNF (**Figure 11**). Chez l'homme, le constat est similaire : les individus porteurs de l'un ou des deux allèles Met ont les mêmes niveaux de BDNF circulant que les individus Val/Val (Trajkovska et al., 2007; Tramontina et al., 2007). Même si les niveaux de BDNF ne semblent pas altérés, la sécrétion l'est. Cependant, il

semblerait que les déficits observés dans le cas du polymorphisme de BDNF ne dépendent pas seulement du déficit de sécrétion régulée. Le met-proBDNF serait capable d'interagir avec le récepteur SorCS2 (un autre membre de la famille des récepteurs à domaine VPS10, comme la sortiline) qui serait impliqué dans la mise en place des connexions dopaminergiques (Anastasia et al., 2013; Deinhardt et al., 2011). Au niveau cellulaire, les conséquences du polymorphisme sont révélées par l'altération de la morphologie et de la physiologie des neurones chez les souris knock-in Val66Met au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal. L'hippocampe exprime alors moins de BDNF, la neurogenèse est diminuée (Bath et al., 2012), les ramifications dendritiques sont moins complexes, ce qui se traduit en un volume hippocampique réduit (**Figure 11**) (Chen et al., 2006). L'activité de ces neurones est aussi altérée, la LTP est altérée chez les porteurs d'allèles Met/Met (**Figure 12**) (Ninan et al., 2010; Pattwell et al., 2012).

Chez l'homme, des études de neuroimagerie ont montré que chez des individus sains, l'expression d'un allèle Met était lié à des volumes réduits du cortex préfrontal et de l'hippocampe (Hajek et al., 2012; Molendijk et al., 2012; Pezawas et al., 2004). Les individus avec un allèle Met présentent aussi une déficience de mémoire épisodique, des niveaux de N-acétylaspartate (NAA, un moyen présumé de mesurer l'intégrité des neurones et l'abondance synaptique) réduits dans l'hippocampe. Des mesures par fMRI (*functional Magnetic Resonance Imaging*) montrent également une activation anormale de l'hippocampe (Egan et al., 2003). Le volume de l'amygdale, une région liée à la peur et aux émotions, est aussi diminué chez les individus portant un allèle Met en fonction de leur âge (Montag et al., 2009).

Selon des études génétiques, des variations à différents loci de BDNF seraient associées à des troubles anxigènes et anxiolytiques (Jiang et al., 2005). De plus, Chen et al ont montré que les souris Met/Met avaient un phénotype d'anxiété contrairement au Val/Val (Chen et al., 2006). Cependant, de nombreuses études précliniques ont été réalisées sur des patients atteints de troubles obsessionnels compulsifs (J. Wang et al., 2015) ou de troubles anxieux (Notaras et al., 2015) mais elles n'ont pas montré qu'il y avait une association significative avec le polymorphisme Met (Frustaci et al., 2008). L'allèle Met serait donc lié à une susceptibilité accrue envers certains troubles neuropsychiatriques, mais pas à un diagnostic psychiatrique (Gratacòs et al., 2007; Hong et al., 2011).

Les porteurs de l'allèle Met auraient aussi des prédispositions aux troubles liés à la peur, comme les troubles de stress post-traumatiques (Notaras et al., 2015). Ils sont aussi plus susceptibles de développer des troubles de l'humeur tels que la dépression ou des troubles bipolaires, tous deux caractérisés par des troubles cognitifs, une dérégulation affective et à l'anhédonie (Notaras et al., 2015; Tsai et al., 2004). Le Val66Met a aussi été associé à des troubles dépressifs dans le

cas d'autres maladies comme la schizophrénie ou dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Borrioni et al., 2009; Terracciano et al., 2013). Des troubles du comportement alimentaires sont aussi observés, les adultes Val/Met et Met/Met ont des indices de masse corporelle faibles à cause de leur tendance à développer une anorexie mentale ou une boulimie (Hong et al., 2012; Koizumi et al., 2004; Ribasés et al., 2004). D'autres études montrent au contraire une prévalence d'obésité chez les porteurs de l'allèle Met (Martínez-Ezquerro et al., 2017). De nombreuses études ont cherché une association possible entre le Val66Met et la schizophrénie, les résultats étaient fortement contradictoires. Mais des études récentes suggèrent que le Val66Met augmenterait le risque de développer un tel trouble lorsque les individus hériteraient de prédispositions liées à d'autres gènes (Lin et al., 2013; Skilleter et al., 2014; Whalley et al., 2010). Il en va de même pour les comportements suicidaires, de nombreuses études ont été faites, mais elles s'accordent seulement à évoquer un facteur de risque plus élevé par les porteurs de l'allèle Met (Perroud et al., 2008; Schenkel et al., 2010; Zai et al., 2015).

Globalement, hormis les troubles alimentaires, aucun des troubles psychiatriques liés au BDNF ne peut être associé au Val66Met sans équivoque. Pourtant, ce polymorphisme constituerait une susceptibilité envers des troubles psychiatriques, en particulier chez des individus ayant d'autres prédispositions génétiques ou environnementales, comme c'est souvent le cas avec des maladies multifactorielles et multigéniques que sont les troubles psychiatriques (Notaras et al., 2015).

c Le SNP C270T (rs56164415)

Un autre SNP connu du BDNF dans lequel la Cytosine 270 est remplacée par une Thymine (C270T) est localisé dans une région non codante (intron 1) et pourrait affecter l'expression de BDNF dans les neurones (Nagata et al., 2011). Une méta-analyse de 18 articles évaluant au total plus de 4 200 individus atteints de la maladie d'Alzheimer et 4 300 individus contrôles a été effectuée pour évaluer le lien entre l'hétérozygotie C270T et la maladie d'Alzheimer (Ji et al., 2015). Cette étude révèle une association entre le polymorphisme C270T et la maladie d'Alzheimer au sein de la population asiatique, mais pas dans les autres populations. L'allèle est plus présent dans la population chinoise, et 88% des asiatiques hétérozygotes présentent un risque plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer. L'allèle T a aussi été associé à la schizophrénie et à la sclérose latérale amyotrophique chez la population asiatique, mais pas dans la population caucasienne (Watanabe et al., 2013; Xu et al., 2017). Il est aussi impliqué dans les stress post-traumatiques (Guo et al., 2018). L'allèle C quant à lui jouerait un rôle de protection contre les déficits cognitifs visuels progressifs (Weinstock-Guttman et al., 2011).

Si ces deux SNPs font l'objet de nombreuses études, aucune d'entre elles n'a reporté de changement dans la balance entre le proBDNF et le BDNF mature. Il serait pourtant intéressant d'étudier ce paramètre, surtout concernant le SNP Val66Met qui se situe dans le pro-domaine de la protéine et qui semble modifier sa conformation tridimensionnelle (Anastasia et al., 2013).

1.C.2 Les Modification Post-Traductionnelles (PTMs)

a Généralités

Un autre type de variation qui peut avoir une influence sur la fonction d'une protéine sont les modifications post-traductionnelles (PTM, Post-Translational Modifications). Une PTM est une modification chimique d'une protéine qui a lieu après sa synthèse et qui est catalysée par une enzyme. Une telle modification peut avoir des conséquences sur la fonction de la protéine, en terme d'activité, de demi-vie, d'interaction ou de localisation cellulaire. Les PTMs sont des processus très dynamiques qui se produisent en réponse à de nombreux types de stimuli, ce qui permet d'adapter la réponse de la cellule à son environnement. Les enzymes représentent approximativement 5% du protéome humain (soit ~5 000 enzymes) et sont capables de catalyser plus de 200 types de PTMs (Jensen, 2006). Il existe de nombreuses familles d'enzymes catalysant des PTMs, dont les kinases, les méthyltransférases et les glycosylases par exemple.

b La PTM connue du BDNF : la N-glycosylation N121

Il n'existe qu'une PTM décrite pour le BDNF, la N-glycosylation sur le résidu N121. La glycosylation est une réaction enzymatique consistant à lier de façon covalente un glucide (N-acétyl-glucosamine) à une protéine. Le processus débute dans le réticulum endoplasmique et se termine dans le Golgi. La glycosylation concerne donc essentiellement les protéines sécrétées et les protéines membranaires. La glycosylation rend les protéines ou peptides plus résistants à la protéolyse. La séquence de reconnaissance est NXS/T où X n'est pas une Proline. L'action est catalysée par une enzyme membranaire de type glycosyltransférase. Mkhikian et ses collègues ont montré qu'une baisse de N-glycosylation chez des souris entraînait une démyélinisation inflammatoire et une neurodégénérescence, symptômes observés dans le cas de sclérose en plaque (Mkhikian et al., 2011).

Mowla et al. ont montré que le traitement du proBDNF avec la N-glycanase modifiait son poids moléculaire, mais pas celui du BDNF mature (Mowla et al., 2001). Ils ont mis en évidence que cette glycosylation était importante dans la stabilité de la protéine car en présence de tunicamycin, un inhibiteur de N-glycosylation, la quantité de protéine était grandement réduite. Dans la même étude, une autre modification est mise en évidence : la glycosulfatation (sulfatation de glucides), mais sa fonction est inconnue.

Les autres neurotrophines sont aussi N-glycosylées. La glycosylation a été montrée sur le NGF : en mutant le résidu Asparagine (N) 144 en Glutamine (Q) afin d'empêcher la glycosylation, les auteurs ont montré que le niveau d'expression de la protéine est réduit de 40%, mais qu'elle est toujours fonctionnelle et correctement clivée (Suter et al., 1991). Par similarité de séquence, il est supposé que la NT3 est N-glycosylée au résidu 131 et la NT4/5 au résidu N76 et que NGF contient un deuxième site de N-glycosylation sur le résidu N69. Aucune autre modification post-traductionnelle n'a été mise en évidence sur les neurotrophines.

Si une seule PTM a pu être décrite pour le BDNF, il est intéressant de noter qu'une analyse *in silico* de la séquence humaine de BDNF suggère d'autres PTMs possibles telles que des palmitoylations et phosphorylations. La palmitoylation joue un rôle dans le trafic subcellulaire et dans les interactions entre protéines, ce qui peut influencer la localisation et la fonction de la protéine palmitoylée (Chavda et al., 2014). La phosphorylation quant à elle, joue souvent un rôle de régulation de la fonction des protéines, en les activant ou inhibant mais également en régulant leurs interactions avec des partenaires.

II Les régulations fonctionnelles par phosphorylation

II.A Généralités

II.A.1 Les phosphorylations

La phosphorylation est probablement la PTM réversible la plus fréquente. Il est estimé qu'environ un à deux tiers des protéines eucaryotes sont phosphorylées, soit plus de 10 000 chez l'homme (Cohen, 2001; Vlastaridis et al., 2017). La phosphorylation est connue pour sa capacité à réguler l'activité enzymatique, la conformation tridimensionnelle, la dégradation, la localisation subcellulaire et les interactions des protéines phosphorylables. Le processus de phosphorylation est catalysé par une protéine kinase et consiste au transfert d'un groupe phosphoryl (PO_3^{2-}) d'une molécule d'adénosine-5'-triphosphate (ATP) sur un résidu sérine, thréonine ou tyrosine (ou plus rarement un résidu aspartate, histidine ou arginine). Une analyse de protéomique de 6 600 sites de phosphorylation sur 2 244 protéines humaines a montré que les phosphosérines, phosphothréonines et phosphotyrosines représentent respectivement 86.4%, 11.8% et 1.8% des résidus phosphorylés (Olsen et al., 2006). La déphosphorylation au contraire est catalysée par les phosphatases qui retirent le groupe phosphate du résidu phosphorylé. Les PTMs, et plus particulièrement la phosphorylation, permettent aux cellules de réguler les fonctions des protéines de façon dynamique en réponse à des signaux intra- et extracellulaires (Seet et al., 2006). L'équilibre entre les états phosphorylé/déphosphorylé permet d'agir comme un interrupteur

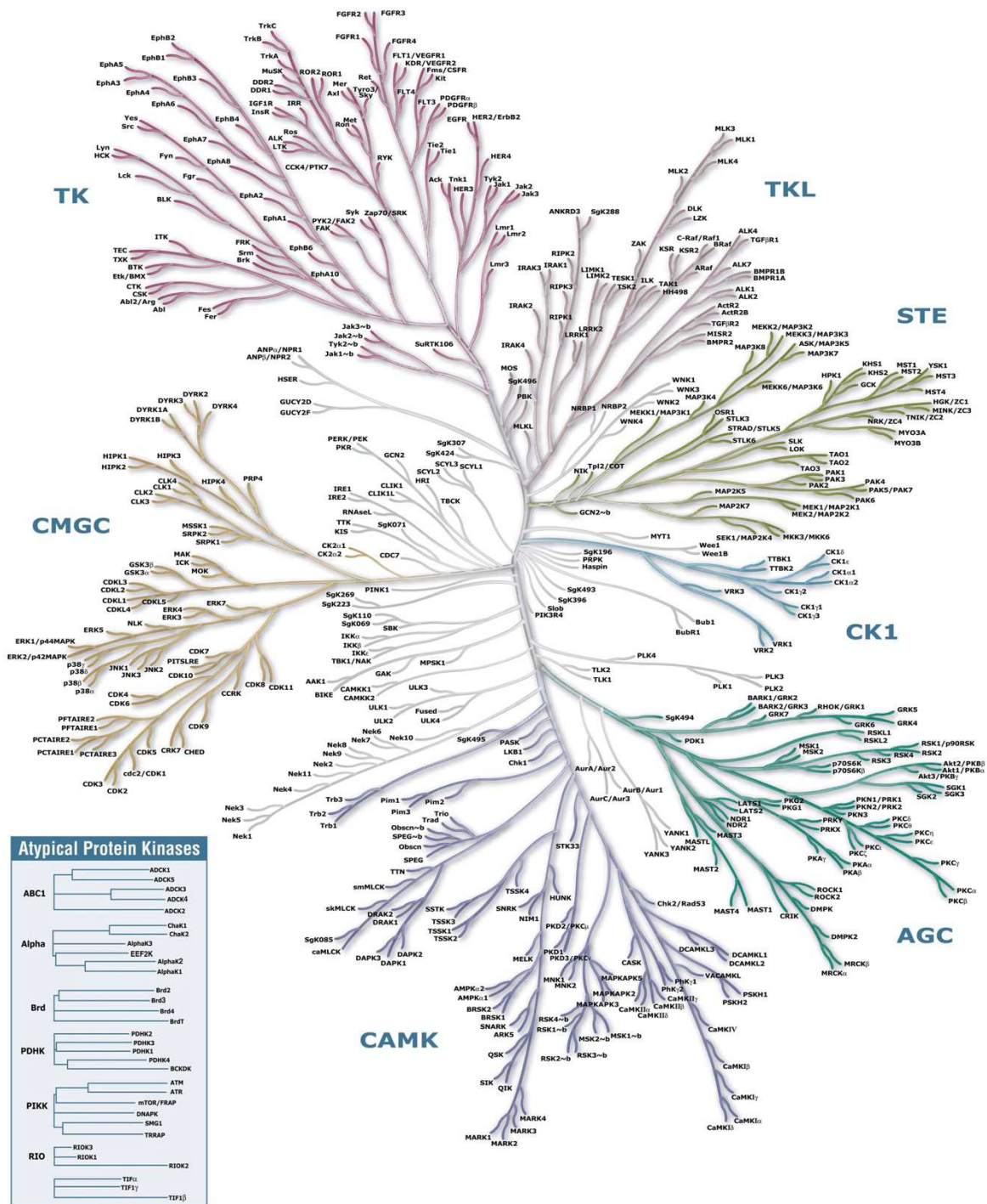


Figure 13. Le kinome humain.

Il existe plus de 500 kinases humaines, elles peuvent être classées en familles selon leur similarités de séquence. La classe des AGC contient notamment la protéine kinase A (PKA), les Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase (SGK), les Mitogen- and Stress-activated protein Kinase (MSK), et les Ribosomal S6 Kinase (RSK). Les ecto-kinases comme FAM20, FAM69 et FJX1 sont classées comme Protein Kinase-Like (PKL) et ne figurent pas sur cette représentation. Extrait de Manning, 2002.

moléculaire actionné par différents stimuli (Dueber et al., 2007). De cette façon, la cellule répond de façon dynamique à son environnement en activant par exemple la prolifération, la différenciation, la migration ou l'apoptose en réponse à un stimulus externe.

Les protéines CREB et p53 sont des exemples standards de protéines neuronales activées par phosphorylation. La phosphorylation de la première conduit à une augmentation de la transcription de certains gènes (dont le BDNF) et a un rôle dans la plasticité neuronale et la mémoire à long terme (Tao et al., 1998). Le p53 est un facteur de transcription hautement régulé et comprend au moins 18 sites de phosphorylation (Ashcroft et al., 1999). Dans les cellules endommagées ou dérégulées, la protéine p53 peut être activée et bloquer le cycle cellulaire et entraîner l'apoptose. La déphosphorylation de ces deux protéines bloque leurs fonctions respectives. Une phosphorylation peut aussi bloquer l'occurrence d'une autre modification post-traductionnelle. Par exemple, le clivage de la protéine Tau par la caspase-3 est bloquée par une phosphorylation sur une sérine localisée juste après le site de clivage (Sandhu et al., 2017). Lorsque la phosphorylation (ou la déphosphorylation) d'une protéine est endommagée, il peut en résulter des dysfonctionnements cellulaires à l'origine de cancers (Yalak and Vogel, 2012). Enfin, l'hyperphosphorylation des protéines peut avoir des conséquences importantes. Par exemple, l'hyperphosphorylation de Tau, une protéine associée aux microtubules, conduit à la perte d'affinité de Tau envers les microtubules et à une agrégation de la protéine en filaments appelés *neurofibrillary tangles* et qui sont retrouvés dans le cas de la maladie d'Alzheimer (Sandhu et al., 2017).

II.A.2 Les kinases

Les kinases sont les enzymes qui catalysent la réaction de phosphorylation. C'est une très grande famille regroupant plus de 500 enzymes différentes (**Figure 13**) (Manning, 2002). Leur fonction leur donne un rôle central dans la cellule puisqu'elles permettent la transmission des signaux et sont impliquées dans des processus de régulation complexes.

La première kinase identifiée est l'enzyme que l'on connaît actuellement sous le nom de *casein kinase 2* (CK2). Elle avait été identifiée à partir d'extraits de foie, en utilisant la caséine comme substrat artificiel (Burnett and Kennedy, 1954). En 1956, Edmond Fischer et Edwin Krebs ont mis en évidence la Phosphorylase Kinase, qui était capable de transférer un groupe phosphoryl d'un ATP à une protéine (Krebs, 1983; Krebs and Fischer, 1956). A la fin des années 60, la découverte de la Protéine Kinase A (PKA) a permis d'identifier la première cascade de kinases (PKA phosphoryle la Phosphorylase Kinase), mais aussi de montrer qu'une phosphorylation pouvait résulter en une inhibition de phosphoprotéines (*glycogen synthase*, *pyruvate dehydrogenase*), ce qui laissait suggérer un rôle de la phosphorylation dans la régulation de voies du métabolisme

(Linn et al., 1969). Dans les décennies qui ont suivi, la découverte et la caractérisation des kinases a explosé de façon exponentielle (on en connaît maintenant plus de 500 dans le génome humain), ce qui a encouragé Steven Hanks et al. à les classer en 5 groupes selon leur phylogénie (Hanks et al., 1988; Hanks and Hunter, 1995). En 2002, la classification des kinases a été revue et étendue à 8 groupes de protéines kinases dites « conventionnelles » et 4 groupes de protéines kinases dites « atypiques » (Manning, 2002). Malgré la diversité de séquence, les kinases ont toutes le même cœur catalytique fortement conservé. L'homologie de cette séquence a été observée pour la première fois par Hanks et Hunter lorsqu'ils ont aligné les séquences des 65 kinases connues (Hanks et al., 1988). Les résidus les plus conservés sont considérés comme critiques pour l'activité catalytique de la protéine.

Il existe d'autres types de kinases capables d'ajouter un groupe phosphate sur des lipides, des glucides, de l'ARN, de l'ADN ou encore des petites molécules comme la créatine (Voet et al., 2016)

II.A.3 Phosphatases

Les phosphatases sont les opposées nécessaires aux kinases ; ensemble, elles rendent la phosphorylation/déphosphorylation dynamique. De façon surprenante, la phosphatase complémentaire de la Phosphorylase Kinase avait été découverte une dizaine d'années plus tôt, mais la nature de la réaction chimique resta énigmatique jusqu'à ce que Fischer et Krebs montrent que le groupe phosphate venait de l'ATP (Krebs and Fischer, 1956; Sutherland and Wosilait, 1955).

Contrairement aux kinases qui ont toutes le même domaine actif, les phosphatases peuvent reconnaître un plus large éventail de substrats et catalyser un plus grand nombre de réactions. Elles sont moins nombreuses que les kinases, mais plus diverses (Chen et al., 2017). Les Ser/Thr phosphatases sont 10 fois moins nombreuses que les Ser/Thr kinases chez l'homme (Li et al., 2013). Les phosphatases sont classées en 10 groupes selon la structure de leur région catalytique (Chen et al., 2017; Sacco et al., 2012). Parmi les phosphatases des sérines/thréonines, on retrouve la famille des Phospho-Protéines Phosphatases (PPP), qui comprend PP2A et PP2B (aussi connue sous le nom de Calcineurine), la famille des PPMs (*Metal-dependent Proteins Phosphatases*) comme PP2C et des phosphatases basées sur l'aspartate telles que Fcp1 et Scp1 (Shi, 2009).

Les kinases et les phosphatases sont donc essentielles à l'équilibre homéostatique de la signalisation cellulaire. Leur étude a gagné un grand intérêt au cours des dernières décennies par rapport à leur implication dans des maladies comme le cancer, le diabète, l'hypertrophie

cardiaque ou encore la neurodégénérescence (Cohen, 2001; De Munter et al., 2013). La compréhension des mécanismes de phosphorylation, l'étude de leurs substrats et le développement de petits composés chimiques permettant de moduler leur activité pourrait avoir un intérêt thérapeutique majeur.

Parmi les nombreuses kinases exprimées dans les neurones, l'enzyme prototypique PKA représente une cible intéressante concernant la régulation fonctionnelle de BDNF. En effet, l'analyse *in silico* de la séquence humaine de BDNF révèle un site de reconnaissance classique de PKA (RRXS) qui se trouve au niveau du site de clivage de BDNF.

II.B La PKA

L'un des groupes de kinases « conventionnelles » est le groupe AGC, qui inclut les protéines kinase A, G et C qui sont des kinases de sérine/thréonine. La particularité de ces kinases est qu'elles répondent toutes à un changement de concentration de seconds messagers tels que l'AMPc ou des lipides (Manning, 2002). Ce groupe compte 63 kinases qui régulent de nombreux procédés cellulaires tels que le métabolisme des glucides, la division cellulaire, le développement, les réponses au stress, et les aspects cellulaires de la transmission synaptique et de la mémoire contextuelle (Turnham and Scott, 2016). L'une de ces kinases est la Protéine Kinase A (PKA), aussi connue sous le nom de protéine kinase dépendante de l'Adénosine 3'-5'-MonoPhosphate cyclique (AMPc).

II.B.1 Historique

La PKA a été découverte en 1968 par Fisher et Krebs lors de leurs travaux sur le métabolisme des glucides et la phosphorylation des protéines (Walsh, 1978). En 1992, ils remportèrent le prix Nobel de Physiologie ou Médecine pour leurs travaux sur la phosphorylation et la déphosphorylation et l'activité de la protéine kinase A (Krebs and Fischer, 1956). La PKA est l'une des kinases les plus étudiées. Elle est responsable de la phosphorylation d'une multitude de substrats qui diffèrent en fonction de la localisation subcellulaire (Sim and Scott, 1999; Taskén and Aandahl, 2004).

La structure en tétramère du PKA la rend unique ; parmi les plus de 500 kinases connues, seules PKA et la Caséine Kinase 2 (CK2) existent sous forme de complexes tétramériques (Turnham and Scott, 2016). La diversité des sous-unités de PKA a été mise en évidence par G. Stanley McKnight au début des années 80. Quatre gènes codent pour les sous-unités C α , C β , C γ et la protéine C χ et quatre gènes pour les sous-unités R, qui sont divisées en deux classes : les RI

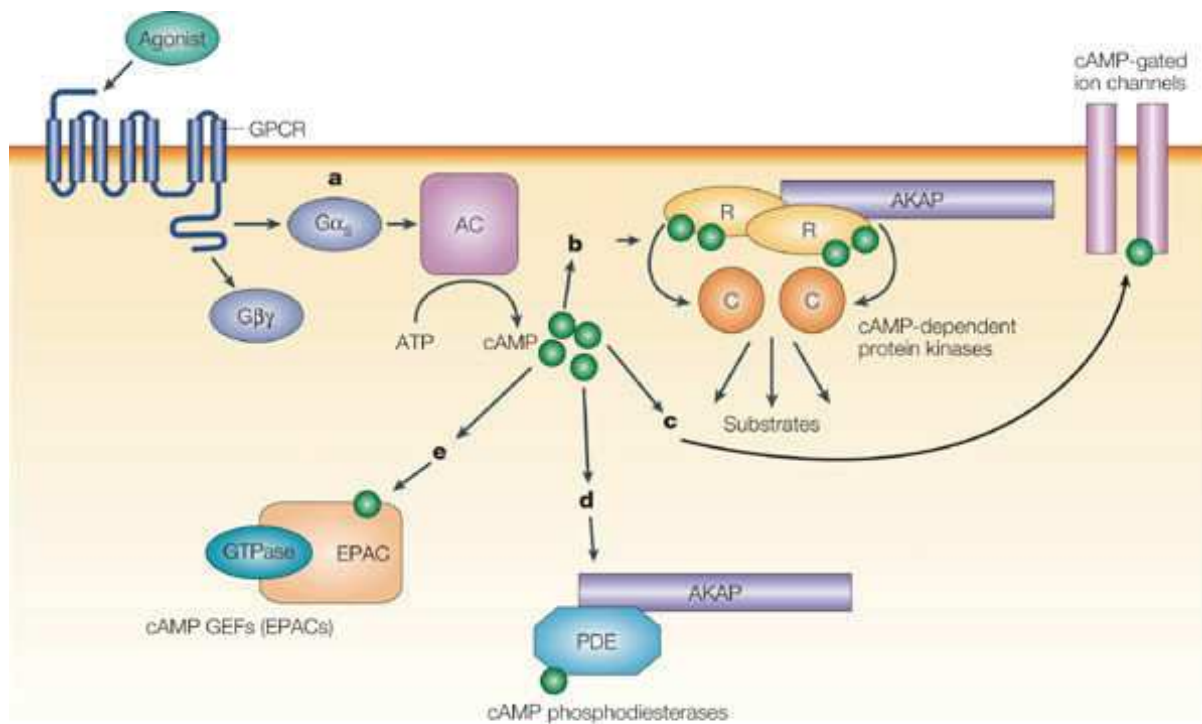


Figure 14. Mécanisme d'activation de PKA par l'AMP cyclique.

(a) La stimulation des récepteurs couplés aux protéines G contenant $G\alpha$ (GPCR) active l'adénylyl cyclase (AC), qui catalyse la synthèse de l'AMP cyclique à partir de l'ATP. (b) L'AMPc se lie aux sous-unités régulatrices (R) de la protéine kinase A, ce qui provoque un changement conformationnel qui libère la sous-unité catalytique active (C). La sous-unité catalytique de la PKA peut ensuite phosphoryler les substrats avoisinants. La PKA représente l'effecteur intracellulaire principal de la signalisation AMPc. AKAP, A- Kinase Anchoring Protein. D'après Wong and Scott, 2004.

(RI α et RI β) et les RII (RII α et RII β) (Skroblin et al., 2010). De plus, pour chaque protéine, des isoformes issues de l'épissage alternatif ont été identifiées. Une autre étape importante fut la cristallisation de la sous-unité Ca en 1991 par Susan Taylor et ses collègues. Cette cristallisation a révélé, pour la première fois, la structure en bi-lobes du cœur catalytique de la kinase (Knighton et al., 1991). Cette structure étant hautement conservée entre les kinases, cette découverte a permis de mieux comprendre la poche catalytique de plus d'une centaine des kinases (Taskén et al., 1996).

II.B.2 Fonctionnement moléculaire de PKA

PKA est constituée de deux sous-unités régulatrices (R) et deux sous-unités catalytiques (C) qui forment ensemble une holoenzyme tétramérique (Bechtel et al., 1977; Krebs and Beavo, 1979). Sous cette forme, l'enzyme est inactive. Suite à une activation de signalisation cellulaire, deux molécules d'AMPc se fixent à chacune des deux sous-unités R, ce qui induit un changement de conformation des sous-unités R qui libère les deux sous-unités C sous forme de monomères (**Figure 14**) (Johnson and Wong, 1989). La phosphorylation est réalisée par les sous-unités catalytiques C. Il existe deux types de sous-unités catalytiques (Ca et C β) chez la souris qui sont encodées par les gènes (Prkaca et Prkacb) et une troisième (Cy) identifiée chez les primates (Uhler et al., 1986). Malgré leur homologie (93%), Ca et C β ont des cinétiques et des expressions différentes, ce qui suggère un rôle différent pour ces sous-unités (Cadd and McKnight, 1989). La sous-unité Ca est la sous-unité la plus largement et la plus fortement exprimée, et son activité est très régulée. En effet, les sous-unités R n'ont pas la même affinité pour les sous-unités Ca et C β , la constante d'activation de l'holoenzyme C β étant plus basse que celle de Ca. De plus, Ca est plus sensible à la régulation par PKI que C β (IC₅₀ plus basse) (Gamm et al., 1996).

Le gène humain de PRKACA est localisé sur le chromosome 19 à la position p13.1, sur le brin inverse (Taskén et al., 1996). Ce gène code pour la sous-unité catalytique alpha (Ca). PRKACA comporte 10 exons qui sont transcrits en une protéine de 351 acides aminés d'environ 40 kDa (Søberg et al., 2013).

Les isoformes Ca sont divisées en trois variants d'épissage : Ca1, Ca2 et Ca3. La forme Ca1 est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus humains alors que la forme Ca2 est restreinte aux cellules germinales (Turnham and Scott, 2016). Un troisième variant Ca3 a été identifié mais n'est pas encore caractérisé (Strausberg et al., 2002). L'isoforme C β , issue du gène PRKACB, compte dix variants : C β 1, C β 2, C β 3, C β 4, C β 3ab, C β 3b, C β 3abc, C β 4ab, C β 4b, and C β 4abc (Kvissel et al., 2004). C β 1 est exprimée dans tous les tissus, alors que C β 2 et C β 3 sont uniquement exprimés au niveau du cerveau, en particulier dans l'hippocampe et l'amygdale

(Guthrie et al., 1997). L'isoforme $C\gamma$, codée par le gène PRKACG, a été localisée dans les testicules mais sa fonction reste à être élucidée (Beebe et al., 1990). Il existe une quatrième sous-unité C qui provient du gène PRKX, mais sa fonction physiologique n'est pas connue.

Il existe deux types de sous-unités R (RI et RII), ayant chacune deux isoformes : RIa, RIb, RIIa et RIIb. Les holoenzymes contenant les sous-unités RI ou RII sont respectivement appelées PKA type I ou type II. Les sous-unités R sont exprimées à des niveaux et à des localisations différentes et pourraient avoir des sensibilités à l'AMPc différentes (Cadd and McKnight, 1989; Corbin et al., 1977).

Les sous-unités RIa et RIIa sont exprimées de façon ubiquitaire, alors que RI β est majoritairement exprimé dans le système nerveux, et RII β est surtout exprimé dans les tissus neuronaux et adipeux, dans les testicules et dans le cœur (Ilouz et al., 2017). Les sous-unités R comprennent un site de liaison avec la famille des A-Kinase Anchoring Protein (AKAPs) dont nous reparlerons dans la partie sur la localisation cellulaire de PKA (voir *II.B.6. Débat sur la localisation de PKA au niveau cellulaire*) (Torres-Quesada et al., 2017).

II.B.3 Régulation de l'activité de PKA

a Activation via AMPc

L'AMP cyclique est un second messenger qui contrôle de nombreux processus cellulaires. Une fois activés par leur ligand, les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) activent (G_s) ou inhibent (G_i) l'adénylate cyclase, qui convertit l'ATP en AMPc (**Figure 14**) (Wong and Scott, 2004). L'AMPc peut se lier aux sous-unités régulatrices du PKA. Lorsque deux molécules d'AMPc se lient à chacune des deux sous-unités régulatrices, les sous-unités catalytiques sont libérées et actives (Koschinski and Zaccolo, 2017). L'AMPc et la PKA sont tous deux ubiquitaires dans le cytosol. Afin que l'AMPc ait une action spécifique aux stimuli extracellulaires, il est nécessaire que les éléments de cette voie de signalisation soient compartimentalisés, et que la concentration locale d'AMPc soit contrôlée. Les AKAPs participent à cette compartimentalisation en formant localement des complexes multi-protéiques (**Figure 16**) (Wong and Scott, 2004). La phosphodiesterase, qui est capable de dégrader l'AMPc et les phosphatases permettent au contraire de garder la PKA sous forme de complexe (Maurice et al., 2014).

Dans le système nerveux, de nombreux récepteurs couplés aux protéines G (G Protein-Coupled Receptor, GPCR) tels que les récepteurs dopaminergiques, GABAergiques, adrénérgiques, aux cannabinoïdes, sont couplés à l'adénylate cyclase et vont donc pouvoir réguler la voie de signalisation de l'AMPc/PKA.

b Inhibition via PKI

Lors de leurs travaux sur la caractérisation de PKA, Krebs et ses collègues ont découvert un inhibiteur endogène de PKA qui agit indépendamment de l'AMPc, à partir d'extrait de muscles squelettiques (Walsh et al., 1971). Cet inhibiteur de 75 acides aminés, nommé PKI, régule l'activité de la sous-unité catalytique une fois qu'elle est libérée du complexe formé avec les sous-unités R (Scott et al., 1986, 1985). Cette protéine est capable d'inhiber la sous-unité catalytique avec une grande affinité par compétition avec le substrat (Demaille et al., 1977). En effet, le PKI comporte un motif de « pseudo-substrat » (RRNRAI) capable de se lier avec une haute affinité au site actif de PKA (Scott et al., 1986). Ainsi, un peptide qui comprend les résidus 5 à 24 du PKI est capable d'inhiber efficacement la sous-unité catalytique (Cheng et al., 1985; Scott et al., 1986).

Les monomères de PKA-C peuvent être adressés dans le noyau, bien que le signal de localisation nucléaire n'ait pas encore été identifié dans la séquence du PKA-C (Langeberg and Scott, 2015; Nigg, 1990). La sous-unité C libre peut être exportée en dehors du noyau par un mécanisme impliquant PKI. Ainsi, la liaison du PKI sur la sous-unité catalytique la rend non seulement inactive, mais elle peut également réguler sa localisation subcellulaire (Wen et al., 1995).

II.B.4 Substrat de PKA (RRxS)

La spécificité de substrat de PKA a été mise en évidence lors de l'observation que PKA pouvait phosphoryler la sérine 124 de la β caséine B dont la séquence est **TERQSLT**, mais pas de la β caséine A² où l'arginine (R) en position 122 est remplacée par une sérine **TESQSLT** (Kemp et al., 1975). Cette expérience suggérait que le motif de reconnaissance du substrat était **RXS**. Des études avaient déjà montré l'importance de l'arginine dans la séquence de phosphorylation, sur des peptides *in vitro* (Daile et al., 1975; Humble et al., 1975). Le premier substrat synthétique de PKA à avoir été mis en évidence et dont la séquence est **LRRASLG** est connu sous le nom de Kemptide et a été synthétisé à partir de la séquence de phosphorylation de la pyruvate kinase (Kemp et al., 1977, 1976). Ce peptide est phosphorylé avec la même cinétique que des protéines natives, ce qui suggère que toute l'information nécessaire à PKA pour reconnaître un site de phosphorylation est présente sur ce peptide synthétique. Il en a été déduit que le motif préféré de PKA est **RRXS**, où X représente un résidu quelconque (Kemp and Pearson, 1990, 1990). Il est intéressant de noter que la séquence de BDNF contient un site **RRHS** situé dans la région de clivage du pro-domaine.

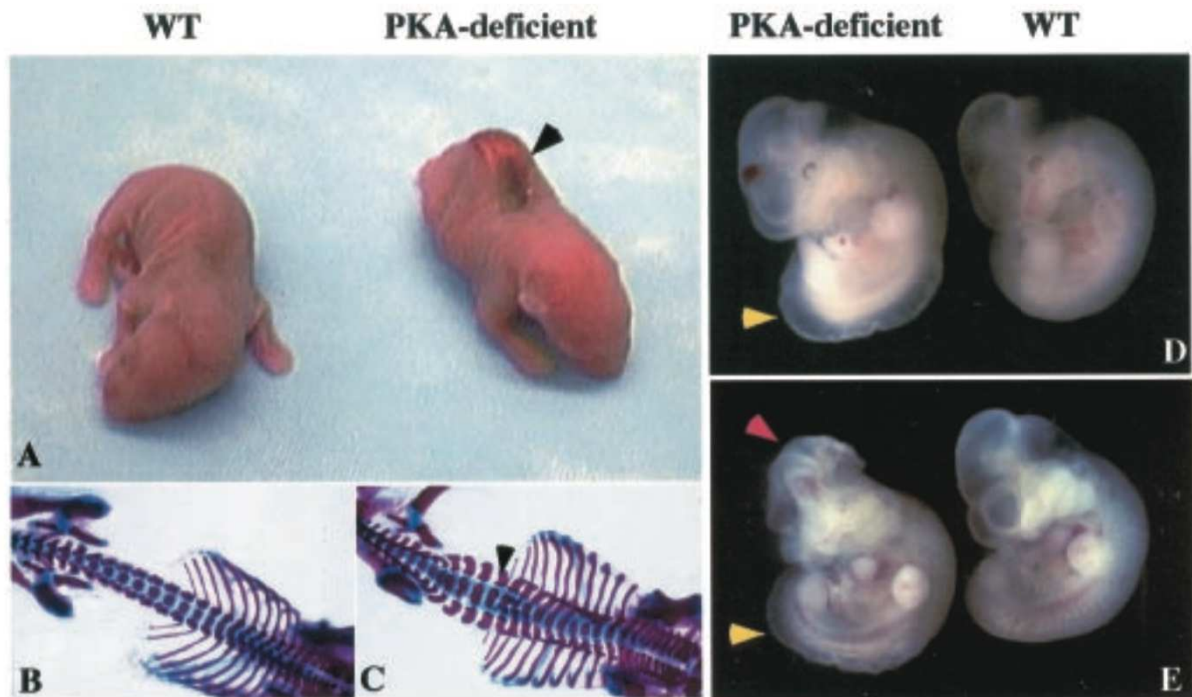


Figure 15. Les souris PKA knock-out ont des défauts de développement du tube neural de type Spina Bidifa.

(A) A droite, une souris PKA KO à P0 avec une malformation au niveau de la colonne vertébrale. En vue dorsale, on remarque une ouverture des arcs des vertèbres entre les pattes avant et arrière de la souris PKA KO (C) en comparaison de la souris contrôle (B). Le cartilage est coloré en bleu et les os en violet. (D et E) Des défauts de tube neural (flèches jaunes) sont observés dans la partie postérieure des bourgeons de membres avant chez les embryons PKA KO, ainsi qu'une exencéphalie (flèche rouge). L'exencéphalie est observée uniquement chez les souris n'ayant qu'un allèle $C\beta$. D'après Huang et al., 2002.

II.B.5 Fonction

Les fonctions de PKA sont évidemment multiples. Ainsi, l'expression de la sous-unité Ca (PKA α) est critique pour le développement d'un organisme. En effet, la suppression de l'expression du gène *Prkaca* dans une souris knock-out (*Prkaca*^{-/-}) entraîne des défauts de formation du tube neural de type *spina bifida* (**Figure 15**) (Huang et al., 2002). Seulement 30% des souris *Prkaca*^{-/-} survivent jusqu'à l'âge adulte et leur phénotype est très sévère : fort retard de croissance, défaut de fermeture du tube neural, les mâles ne sont pas fertiles, et les adultes sont trop frêles pour effectuer des tests comportementaux. L'évaluation biochimique de plusieurs tissus révèle une déficience dramatique dans la stimulation dépendante de l'AMPc. Les tissus exprimant aussi la sous-unité C β , notamment le cerveau, ont un déficit atténué quant à l'activité basale de PKA par rapport aux autres tissus (Skålhegg et al., 2002). Le niveau d'expression de C β est plus élevé chez ces souris, ce qui indique un mécanisme compensatoire lorsque Ca n'est pas exprimé. Les souris double knockout pour Ca et C β meurent à l'état embryonnaire. Au contraire, les souris KO pour PKAC β ont d'apparence un phénotype normal, mais ont des déficits en termes de plasticité hippocampique et leur potentialisation à long-terme est réduite (Howe, 2002; Qi et al., 1996; Skålhegg et al., 2002). Globalement, les souris *Prkacb*^{-/-} ont une activité basale de PKA réduite, mais la stimulation de PKA par l'AMPc n'est pas affectée, probablement par une action compensatoire de Ca. Ces résultats font état d'une redondance entre gènes des sous-unités C et montrent l'importance de la régulation des sous-unités catalytiques (Brandon et al., 1995).

Comme suggéré par les souris KO, le PKA est impliqué dans la mémoire via, notamment, l'activation du facteur de transcription CREB. Une étude sur la drosophile montre qu'une augmentation de l'activité de PKA augmente les capacités mnésiques alors qu'une diminution de son activité altère l'apprentissage et la mémoire (Horiuchi et al., 2008).

Le PKA est aussi impliqué dans la fonction et l'organisation de l'appareil de Golgi. L'inhibiteur de PKA détériore le transport de protéines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Mavillard et al., 2010; Tenorio et al., 2015).

Cependant, selon les types cellulaires, le PKA peut être impliqué dans bien d'autres voies comme la glycolyse dans les hépatocytes ou encore dans la lipolyse dans les adipocytes. De par son rôle central dans la physiologie cellulaire, il n'est pas étonnant que les dérèglements de PKA soient impliqués dans des maladies cardiovasculaires, ou des cancers (Turnham and Scott, 2016).

II.B.6 Débat sur la localisation de PKA au niveau cellulaire

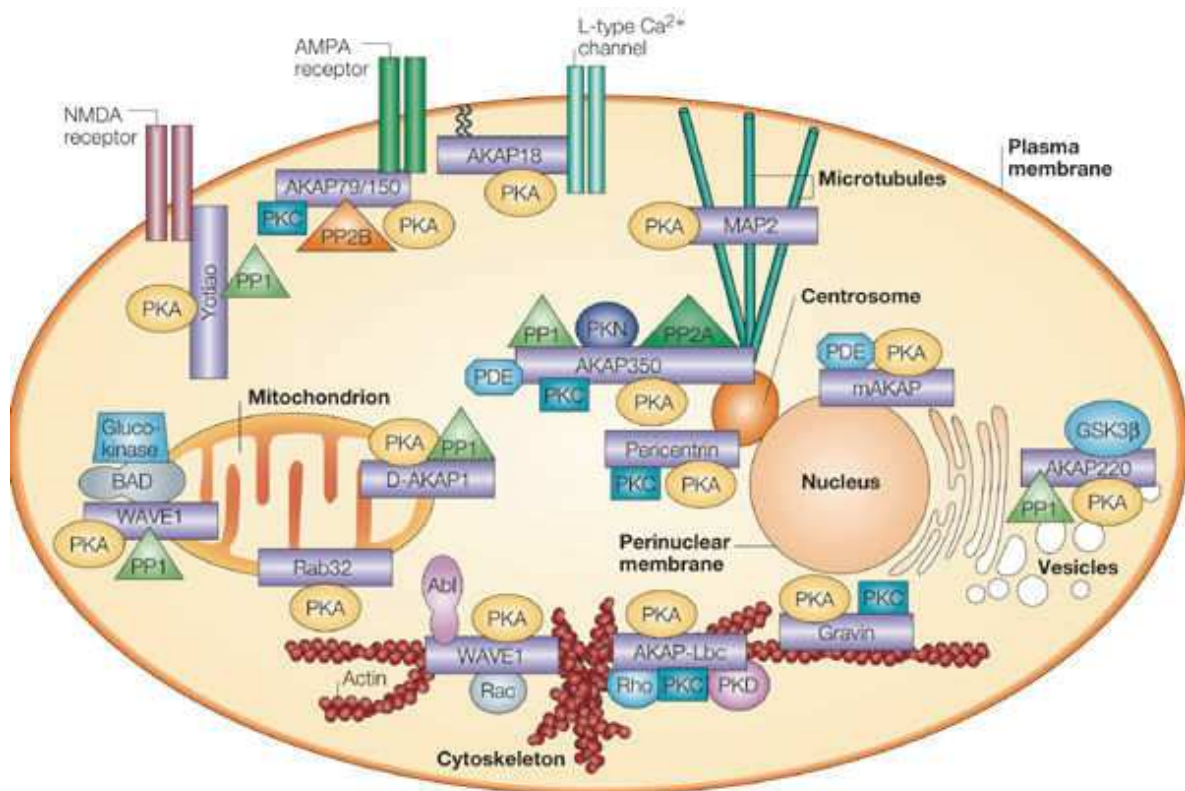
Le PKA peut être retrouvé « libre » dans le cytosol, ou bien confiné dans des localisations subcellulaires précises à l'aide de la famille des protéines d'ancrage appelées A Kinase Anchoring Proteins (AKAPs) (Torres-Quesada et al., 2017). Les AKAP se lient aux sous-unités régulatrices

de PKA et permettent à l'holoenzyme de rester à proximité de ses substrats (**Figure 16**). Il existe une cinquantaine d'AKAP dont la localisation et la structure varient mais qui sont toutes capables de se lier aux sous-unités régulatrices de PKA via leur hélice amphipathique (Torres-Quesada et al., 2017). Bien que la majorité des AKAP interagissent préférentiellement avec les sous-unités RII, il semblerait que les sous-unités RI puissent aussi être ancrées par des protéines (Kovanich et al., 2010; Means et al., 2011).

Cette organisation spatiale permet de réguler finement, et de façon localisée, la phosphorylation de protéines. En effet, des études récentes indiquent que, même liée à la sous-unité R, la sous-unité C de PKA a un certain degré de flexibilité lorsque R est liée à une AKAP, ce qui suggère qu'elle pourrait agir localement (Langeberg and Scott, 2015). Les AKAP121 par exemple, permettent de lier le PKA à la membrane externe des mitochondries, à proximité de substrats locaux (Means et al., 2011). Récemment, des équipes ont mis en évidence l'existence d'une PKA à l'intérieur des mitochondries et dont la régulation est indépendante de la PKA cytosolique (Dagda et al., 2011; Lefkimmatis et al., 2013). L'AKAP350 quant à elle, permet de garder PKA à proximité de l'appareil de Golgi (Shanks et al., 2002).

Il est important de remarquer que la localisation majoritairement cytosolique de PKA n'en fait pas un interacteur potentiel de BDNF, qui chemine le long de la voie sécrétoire. Cependant, quelques indices vont à l'encontre de cette idée. En effet, au début des années 1990, certaines études suggèrent un rôle d'ecto- (membranaire) ou d'exo- (libre) kinase pour PKA. Par exemple, il a été observé que le Kemptide ajouté dans le milieu de culture de plusieurs types cellulaires (HeLa et CHO notamment) était phosphorylé par une protéine dépendante de l'AMPc et que cette phosphorylation était spécifiquement inhibée par PKI (Kübler et al., 1989). Le PKA est aussi capable de phosphoryler le peptide natriurétique atrial (ANP) au niveau d'un site RRSS. L'ANP est clivé de la partie C-terminale de sa pro-hormone avant d'être sécrété par les cellules cardiaques. Cette phosphorylation est inhibée par IP20, aussi connu sous le nom de PKI-fragment 5-24amide, qui est un inhibiteur spécifique à PKA qui peut entrer dans les cellules (Kübler et al., 1992). PKA peut aussi phosphoryler la vibronectine circulant dans le sang (Shaltiel et al., 1993).

Plus récemment, une PKA extracellulaire a été retrouvée dans des tissus cancéreux (Cho et al., 2000b; Cvijic et al., 2000; Kita et al., 2004; Wang et al., 2007). Cette kinase n'est pas régulée par l'AMPc ce qui indique que c'est la partie catalytique uniquement qui serait sécrétée (Cvijic et al., 2000). En effet, l'AMPc active la protéine uniquement lorsqu'elle est complexée avec les sous-unités régulatrices. En revanche, les sous-unités catalytiques peuvent être inhibées par le PKI, ce qui en accord avec les précédentes observations de Kübler. Cho et ses collègues montrent en



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 16. La PKA est séquestrée à différentes localisations subcellulaires par une multitude d'AKAPs (A Kinase Anchoring Protein)

Les AKAPs gouvernent la régulation spatiale de PKA dans le cytosol. Par exemple, l'AKAP150 maintient la PKA au niveau des épines dendritiques dans les neurones et régule son activité sur les récepteurs NMDA. D'autres AKAPs sont localisées au niveau d'organelles comme l'AKAP350 qui retient PKA à la membrane du Golgi, et l'AKAP121 qui séquestre PKA à la membrane des mitochondries. Les AKAPs peuvent interagir avec d'autres partenaires de PKA et contrôler son activité. Extrait de Wong and Scott, 2014.

effet que la PKA extracellulaire correspond à la forme catalytique libre, et donc active, et qui peut être inhibée par PKI (Cho et al., 2000b). Ils observent qu'une mutation dans le gène de Ca qui bloque la myristoylation de PKA bloque aussi l'augmentation de la PKA extracellulaire, malgré l'élévation du niveau de PKA intracellulaire. Cela suggère que le groupe myristyl N-terminal est nécessaire pour la sécrétion de PKA dans le compartiment extracellulaire.

Enfin, une ecto-PKA a été observée dans des neurones de tranches de cervelet (Cabrera-Pastor et al., 2016). Cette ecto-PKA phosphoryle (et active) les récepteurs NMDA. L'inhibition de l'ecto-PKA restaure la voie de signalisation Glutamate-Nitric Oxide-cGMP et donc le niveau de cGMP dans des rats hyperammonémiques (qui ont un excès d'ammoniaque dans le sang dû à la dérégulation de cette voie de signalisation). L'inhibition de l'ecto-PKA dans les rats contrôle altère cette voie et réduit le niveau de cGMP. L'utilisation d'un PKI non-myristoylé, qui ne pénètre donc pas dans la cellule, suggère ainsi l'existence d'une ecto-PKA extracellulaire.

II.C Les ectokinases

II.C.1 Généralités

Il existe des kinases qui appartiennent à la voie de sécrétion et qui peuvent être sécrétées. Elles sont nommées exo-kinases si elles sont sécrétées sous forme libre, et ecto-kinases si ce sont des protéines membranaires dont le domaine kinase est du côté extracellulaire. Elles sont encore peu décrites et il est parfois difficile de faire la distinction entre exo- ou ecto-kinase pour le moment.

Il est intéressant de noter que la première phosphoprotéine a été identifiée par Olof Hammarsten en 1883 (Hammarsten O., 1883) en détectant du phosphore dans la protéine caséine, qui est une protéine sécrétée. De plus, une kinase enrichie dans le Golgi, et capable de phosphoryler la caséine avait été mise en évidence (Bingham et al., 1972; Moore et al., 1985) mais n'a été purifiée et caractérisée qu'en 2012 (Tagliabracci et al., 2012). Cette kinase appartenant à la voie de sécrétion est FAM20C (family with sequence similarity 20). Cette étude (ré)ouvre ainsi la voie de la recherche sur des kinases, et leurs substrats, qui sont sécrétés (Tagliabracci et al., 2015).

II.C.2 Cas particulier du FJX1

FJX1 (Four-Jointed Box 1) est une kinase encodée par le gène FJX1 (Ashery-Padan et al., 1999), orthologue de la protéine *four-jointed* (*ff*) identifiée chez la Drosophile. Chez la drosophile, cette ectokinase a été identifiée comme régulant la croissance et la différenciation des pattes et des ailes ainsi que le développement des yeux (Brodsky and Steller, 1996; Villano and Katz, 1995).

A ce jour, la fonction de cette protéine reste à être élucidée, peu d'études se sont intéressées à sa fonction chez les mammifères.

FJX1 contient un domaine C-terminal similaire à celui de FAM20C. Elle est fortement exprimée dans le cerveau des souris adultes, particulièrement au niveau de l'hippocampe (Ashery-Padan et al., 1999). Cette protéine transmembranaire de type II est exprimée dans le Golgi et est sécrétée (Rock et al., 2005). Elle a un domaine kinase du côté du lumen de la voie de sécrétion. Il n'existe à ce jour qu'une seule étude décrivant le rôle fonctionnel de Fjx1 dans le cerveau. Dans cette étude, les auteurs montrent qu'elle est principalement impliquée dans la régulation négative de l'arborisation dendritique (Probst et al., 2007). En effet, le knock-out de FJX1 résulte en une augmentation de la longueur et de la ramification des dendrites. Au contraire, l'ajout de FJX1 sur des neurones en culture, inhibe la croissance et la ramification des dendrites (Probst et al., 2007). Récemment, il a été montré que FJX1 est capable de stabiliser une protéine impliquée dans l'endométrie. HIF1 α (Chang et al., 2018). Cependant, l'étude ne montre pas si c'est la phosphorylation de HIF1 α par FJX1 qui la stabilise.

II.C.3 Cas particulier du FAM69B

FAM69B appartient à la famille des FAM69 qui sont des protéines transmembranaires de type II et qui sont localisées dans le réticulum endoplasmique (Tennant-Eyles et al., 2011). FAM69B est fortement exprimée dans le cerveau, au niveau du cortex et du cervelet, mais surtout au niveau de l'hippocampe (Tennant-Eyles et al., 2011). La surexpression de FAM69B entraîne une augmentation de l'expression de calnexine, ce qui pourrait indiquer un rôle de chaperonne (Tennant-Eyles et al., 2011). Des prédictions bio-informatiques basées sur l'analyse de la structure de FAM69B indiquent qu'elle pourrait être sensible au calcium via son domaine EF-hands, et qu'elle pourrait être une kinase active sécrétée puisqu'elle comporte un domaine kinase fonctionnel (Dudkiewicz et al., 2013). D'autre part, plusieurs membres de la famille des FAM69 ont été impliqués dans des troubles neurologiques (Morrow et al., 2008). Deux SNPs de FAM69A ont d'ailleurs été liés à la schizophrénie et aux troubles bipolaires (Wang et al., 2010).

Ces deux ectokinases, présentes dans la voie sécrétoire, ont ainsi une localisation subcellulaire proche de BDNF et pourraient représenter des interacteurs de choix. Cependant, ces kinases sont très peu décrites et leurs fonctions restent mal connues, notamment dans le cerveau.

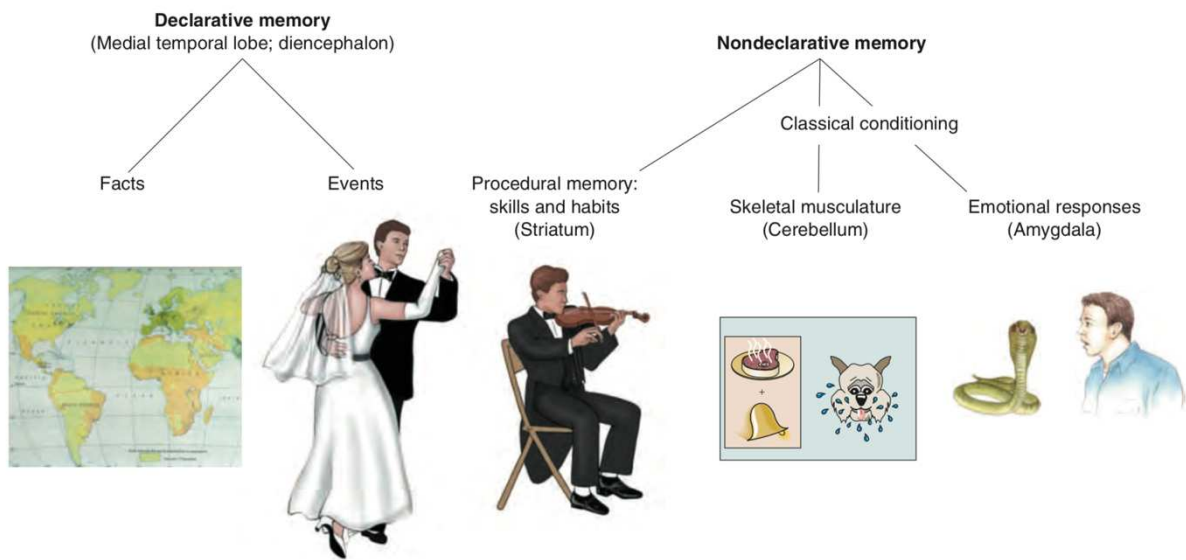


Figure 17. Les différents types de mémoire.

Il existe deux grands types de mémoire : la mémoire déclarative pour les souvenirs des faits et des événements, et la mémoire procédurale pour la mémoire des compétences, des habitudes, et des comportements. La mémoire déclarative repose sur l'hippocampe et le cortex et la mémoire procédurale sur le striatum, le cervelet et l'amygdale. D'après Bear et al., 2016.

III Plasticité et mémoire

Le clivage de BDNF est nécessaire pour la survie, la plasticité synaptique et la potentialisation des synapses (Pang, 2004; Yang et al., 2014), ce qui suggère que l'équilibre entre les deux formes de BDNF permet de contrôler la production et la disparition des neurones, de leurs neurites et de leurs synapses (Lu et al., 2005). De par ce rôle multiple sur le fonctionnement des neurones et de leurs réseaux, le BDNF est l'une des molécules majeures impliquées dans la mémoire. Cette neurotrophine joue un rôle dans les différents types de mémoires au niveau des différentes structures qui leur sont associées, au cours des différentes étapes de l'apprentissage (Bekinschtein et al., 2014).

III.A Mémoire

III.A.1 *Les différentes formes de mémoires*

La mémoire correspond à la rétention des informations acquises au cours de l'apprentissage. Il existe une distinction entre plusieurs types de mémoire (**Figure 17**). La mémoire des faits et des événements, c'est-à-dire les informations dont nous avons conscience, est nommée la mémoire déclarative. La mémoire déclarative est elle-même distinguée en deux formes de mémoires : la mémoire épisodique qui fait référence aux événements autobiographiques, et la mémoire sémantique concerne les faits que nous avons appris.

La mémoire non-déclarative, quant à elle, comprend les informations implicites ou « non-conscientes ». Le type le plus commun de mémoire non-déclarative est la mémoire procédurale, qui est mise en œuvre lors de l'apprentissage d'habiletés motrices comme faire du vélo ou jouer d'un instrument. La mémoire non-déclarative comprend aussi les réflexes, ou conditionnements, musculaires ou émotionnels (Bear et al., 2016).

Pour chaque forme de mémoire, des structures cérébrales ont été identifiées comme susceptibles d'être impliquées dans l'acquisition et/ou la rétention de l'information (Squire, 2004). Depuis presque un siècle, le lien entre cerveau et mémoire est étudié. Dans les années 1920, Karl Lashley a montré qu'une lésion corticale chez le rat entraînait une amnésie rétrograde, c'est-à-dire un oubli de la tâche apprise avant la lésion (Lashley, 1929). Par la suite, Donald Hebb a essayé de comprendre comment les informations sensorielles étaient représentées par l'activité neuronale. Il émit l'hypothèse que les neurones qui déchargent en même temps, établissent des relations préférentielles entre eux (Hebb, 1950). L'hypothèse de Hebb supposait que l'engramme (la trace physique d'un souvenir) pourrait être réparti sur un réseau de neurones et non lié à un seul neurone.

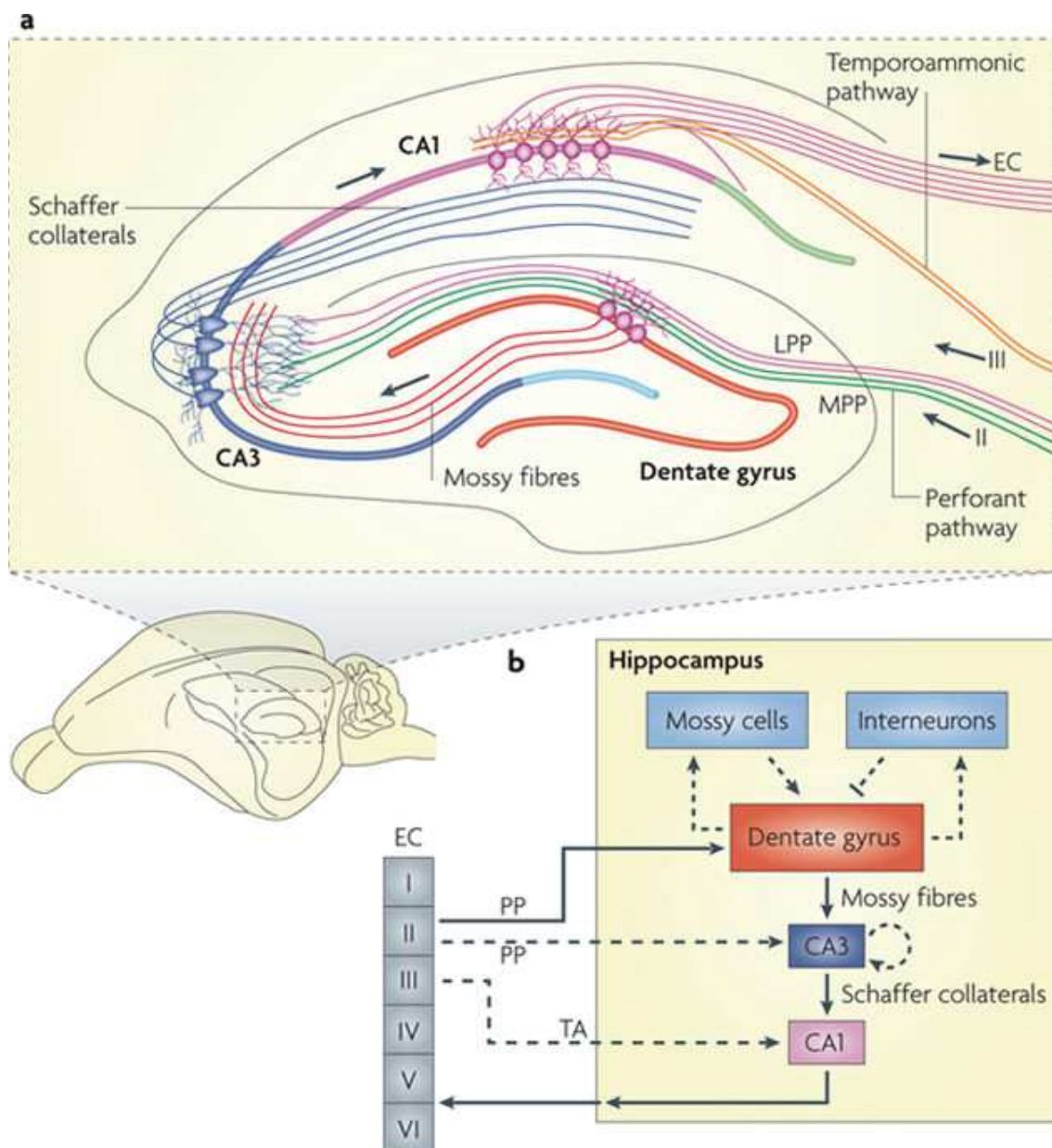


Figure 18. Structure et connectivité de l'hippocampe.

Illustration (a) diagramme (b) du circuit neuronal hippocampique. La voie traditionnelle de connectivité excitatrice est schématisée par les flèches pleines. Les axones de la couche II du cortex entorhinal se projettent dans le gyrus denté (DG) à travers la voie perforante (LPP et MPP). Le DG envoie des projections aux cellules pyramidales de CA3 à travers les fibres moussues. Les neurones pyramidaux du CA3 relaient l'information aux neurones pyramidaux CA1 à travers les collatéraux de Schaffer. Les neurones pyramidaux CA1 envoient des projections dans les neurones de la couche profonde du cortex entorhinal. CA3 reçoit également des projections directes des neurones du cortex entorhinal de couche II à travers le PP. Le CA1 reçoit l'entrée directe des neurones EC de couche III par la voie temporoammonique (TA). Les cellules granulaires dentées se projettent également sur les cellules moussues et des interneurons hilaires, qui envoient respectivement des projections excitatrices et inhibitrices aux cellules granulaires. D'après Deng et al., 2010.

III.A.2 Cas particulier de la mémoire hippocampique

a Structure de l'hippocampe

L'hippocampe se compose de trois sous-structures : le subiculum, la corne d'Ammon (composée des aires CA1, CA2, CA3 et CA4) et le gyrus denté (**Figure 18**) (Schultz and Engelhardt, 2014).

Le flux d'information hippocampique suit une voie glutamatergique (excitatrice) unidirectionnelle qui forme un circuit en série fermé, appelé circuit neuronal trisynaptique. Les axones du cortex enthorinal constituent la voie d'entrée de l'information dans l'hippocampe (Witter and Amaral, 1991). Ces axones, nommés fibres perforantes contactent les cellules granulaires du gyrus denté. Les axones partant du gyrus denté, appelés fibres moussues, contactent ensuite les cellules pyramidales de la zone CA3. Ces derniers, appelées collatérales de Schaeffer, projettent en retour sur les cellules pyramidales de la zone CA1 (Schultz and Engelhardt, 2014). Enfin, les neurones du CA1 projettent vers le subiculum qui projette en sortie sur le cortex enthorinal (Schultz and Engelhardt, 2014).

b Les fonctions de l'hippocampe

L'hippocampe joue un rôle central dans deux fonctions principales : la mémoire et la navigation spatiale.

L'implication de l'hippocampe dans la mémoire provient principalement des observations réalisées par Brenda Milner sur le patient H.M (Milner, 1958; Scoville and Milner, 1957). En 1953, Henry Molaison, plus connu sous le nom de patient H.M., est atteint d'épilepsie sévère. A l'âge de 27 ans il fut opéré dans l'espoir d'atténuer ses crises. Il subit une ablation d'une grande partie des lobes temporaux, y compris l'amygdale et les deux tiers antérieurs de l'hippocampe. Après la chirurgie, les crises furent atténuées... mais elle eut pour conséquence une amnésie antérograde profonde, ainsi qu'une amnésie rétrograde partielle : H.M. était incapable de former de nouveaux souvenirs épisodiques et avait perdu la mémoire des événements précédant son opération, bien qu'il puisse se rappeler de ses souvenirs d'enfance (**Figure 19**) (Milner, 1958; Scoville and Milner, 1957). Ce cas clinique suggérait donc que l'hippocampe semblait être le siège de la formation et du stockage de la mémoire. De plus, H.M. était capable d'apprendre de nouvelles tâches, c'est-à-dire de mettre en jeu sa mémoire procédurale, mais ne se souvenait pas de les avoir déjà effectuées (mémoire déclarative). Ces observations suggéraient donc que l'hippocampe avait un rôle majeur dans l'encodage de nouvelles informations déclaratives (événements et faits). Le fait que les lésions à l'hippocampe n'entraînent pas une amnésie rétrograde totale suggère que, lors de la consolidation des souvenirs, ceux-ci sont peu à peu

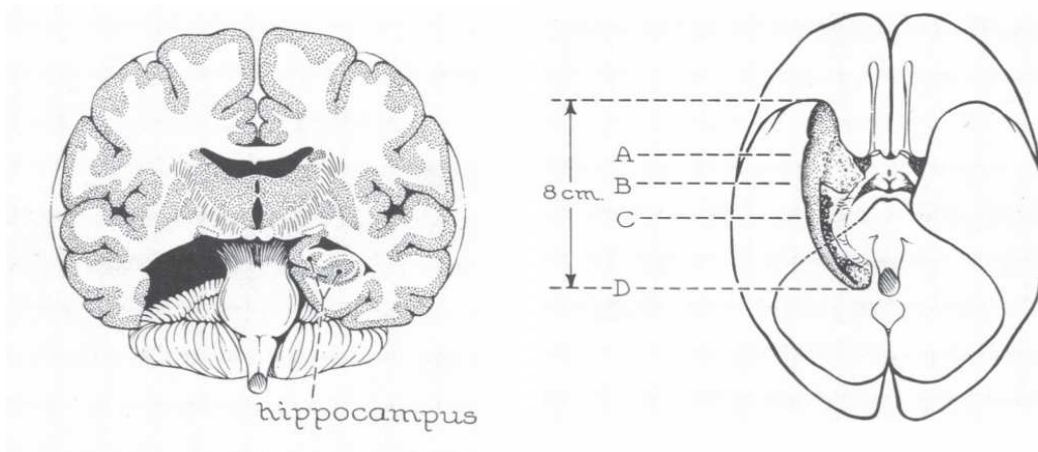


Figure 19. Henry Molaison, l'homme qui ne pouvait plus se souvenir.

(haut) Le patient H.M., Henry Molaison, à l'âge de 60 ans lors d'une expérience au Massachusetts Institute of Technology. Photo par Jenni Ogden, 1986. Ce patient a subi une ablation bilatérale des lobes temporal médian afin de soulager les crises d'épilepsie **(bas)** Représentation des lésions cérébrales chez le patient H.M. qui ont provoqué une amnésie antérograde sévère et une amnésie rétrograde partielle. Les lésions étaient bilatérales mais sont représentées ici du côté gauche du cerveau pour comparaison avec un cerveau non lésé côté droit. **(gauche)** vue en coupe coronale **(droite)** vue de dessous. Extrait de Scoville and Milner, 1957.

transférés vers le cortex (Bontempi et al., 1999). L'hippocampe peut donc être nécessaire lors de la récupération de souvenirs récents, mais les souvenirs les plus anciens sont traités par le cortex. La notion de reconsolidation décrit le fait que lors de la réactivation d'un souvenir, la trace mnésique est rendue labile et donc modifiable. C'est cette propriété qui est par exemple, mise à l'œuvre lors de traitements des patients souffrants de stress post-traumatique (Gräff et al., 2014).

L'hippocampe est aussi impliqué dans le codage des informations spatiales. Des lésions de l'hippocampe chez le rat l'empêchent d'apprendre l'emplacement de la plateforme d'un labyrinthe aquatique de Morris ou encore de se souvenir des bras déjà visités dans un labyrinthe à huit bras (Morris et al., 1982). Au cours des années 1970, John O'Keefe a également mis en évidence les cellules de lieu dans l'hippocampe de rongeurs (O'Keefe, 1976; O'Keefe and Nadel, 1978). Certains types de neurones sont activés spécifiquement lorsque le rat se déplace à un endroit précis de son environnement. Par la suite, Edvard et May-Britt Moser ont caractérisé d'autres neurones qu'ils ont nommés les cellules de grilles, situées dans le cortex enthorinal, la voie d'entrée dans l'hippocampe. Ces cellules de grille déchargent chacune dans une position précise sur une grille virtuelle hexagonale (Moser et al., 2008, 2015). John O'Keefe et May-Britt et Edvard I. Moser ont reçu le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2014 pour leurs découvertes de cellules qui constituent un système de positionnement dans le cerveau.

D'autres théories sur les fonctions de l'hippocampe ont été avancées. Par exemple, grâce à l'utilisation d'un labyrinthe à huit branches, Olton et collaborateurs suggèrent que l'hippocampe est mis en jeu dans la mémoire de travail, un processus traditionnellement associé au cortex préfrontal (Olton and Samuelson, 1976). En effet, après lésion de l'hippocampe, les rats n'étaient plus capables de se souvenir quelles branches avait déjà été explorées et pouvaient explorer la même branche plusieurs fois de suite (Olton, 1983, 1979; Olton and Papas, 1979). L'hippocampe pourrait aussi être impliqué dans l'association d'informations sensorielles ou encore dans la discrimination des odeurs (Goodrich-Hunsaker et al., 2009; Poucet et al., 2000)

III.B Les bases moléculaires de la mémoire

En 1894, Santiago Ramón y Cajal pensait que la mémoire impliquait des changements structuraux de l'organisation anatomique des réseaux nerveux et de l'efficacité des connexions entre les neurones (Cajal, 1894). En 1948, Jerzy Kornorski a repris ce concept et l'a nommé plasticité synaptique (Konorski, 1949). Puis en 1949, Donald Hebb a émis l'hypothèse que deux neurones activés en même temps créent ou renforcent leur connexion de telle façon que les activations suivantes de l'un par l'autre soient plus efficaces (Hebb, 1950). La plasticité hebbienne

est aujourd'hui largement considérée comme le mécanisme par lequel l'information est codée et conservée dans les neurones. La notion d'efficacité synaptique, de par son renforcement ou son affaiblissement, a été confortée par les travaux d'Eric Kandel sur l'aplysie (Kandel, 1981; Kandel et al., 2014). En effet, Kandel et ses collaborateurs ont montré que des formes très simples d'apprentissage étaient accompagnées de modification de l'efficacité de certaines synapses entre les neurones sensoriels et les neurones moteurs. De plus, ils ont pu caractériser certains mécanismes moléculaires responsables de ces modifications d'efficacité synaptique. A la fin des années 1960, il a été découvert qu'il est possible de garder des coupes d'hippocampe de mammifères vivantes *in vitro* pendant plusieurs heures et qu'il est possible de stimuler électriquement les neurones et d'enregistrer les réponses. Cette méthode qui jusque-là était réservée aux préparations utilisant les invertébrés a permis d'étudier plus facilement la potentialisation à long terme (Wheal et al., 1983). Le prix Nobel de Physiologie ou Médecine a été attribué à Eric Kandel en 2000 pour ses découvertes sur la biologie moléculaire du stockage de la mémoire.

III.B.1 La potentialisation et la dépression à long terme

La première description de la Potentialisation à Long Terme (LTP) a été publiée par Timothy Bliss et Terje Lomo en 1973. Ils montrent qu'une stimulation à haute fréquence (HFS) de courte durée appliquée aux fibres perforantes de l'hippocampe chez le lapin, induisent une augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique sur les cellules granulaires du DG (Bliss and Lomo, 1973). La LTP est donc définie comme un renforcement persistant de synapses suite à une stimulation par les neurones présynaptiques (Bliss and Collingridge, 1993). La LTP de l'hippocampe est la forme de plasticité synaptique la plus étudiée.

Lors d'un enregistrement de LTP dans le CA1 par exemple, les collatérales de Schaeffer reçoivent une brève stimulation chaque minute et l'amplitude du Potentiel Post-Synaptique Excitateur (PPSE) des neurones post-synaptiques du CA1 est mesurée. Une fois que la réponse est stable, une brève stimulation à fréquence élevée, appelée téτανisation (50 à 100 stimulations à une fréquence de 100/s), est envoyée aux neurones présynaptiques. Les PPSE évoqués par la stimulation seront d'une plus grande amplitude après la téτανisation, c'est la LTP. L'efficacité des synapses stimulées est ainsi augmentée (**Figure 20**).

La LTP présente une spécificité d'action : seuls les neurones stimulés provoquent une LTP, pas les autres neurones afférents non-stimulés. La LTP peut durer plusieurs semaines, voire toute une vie lors d'une stimulation dans un animal éveillé, comme l'a montré Abraham en 2002 (Abraham et al., 2002). La LTP nécessite une stimulation avec une fréquence assez élevée de sorte à ce qu'il y ait une sommation temporelle des PPSE, ainsi qu'un nombre de synapses

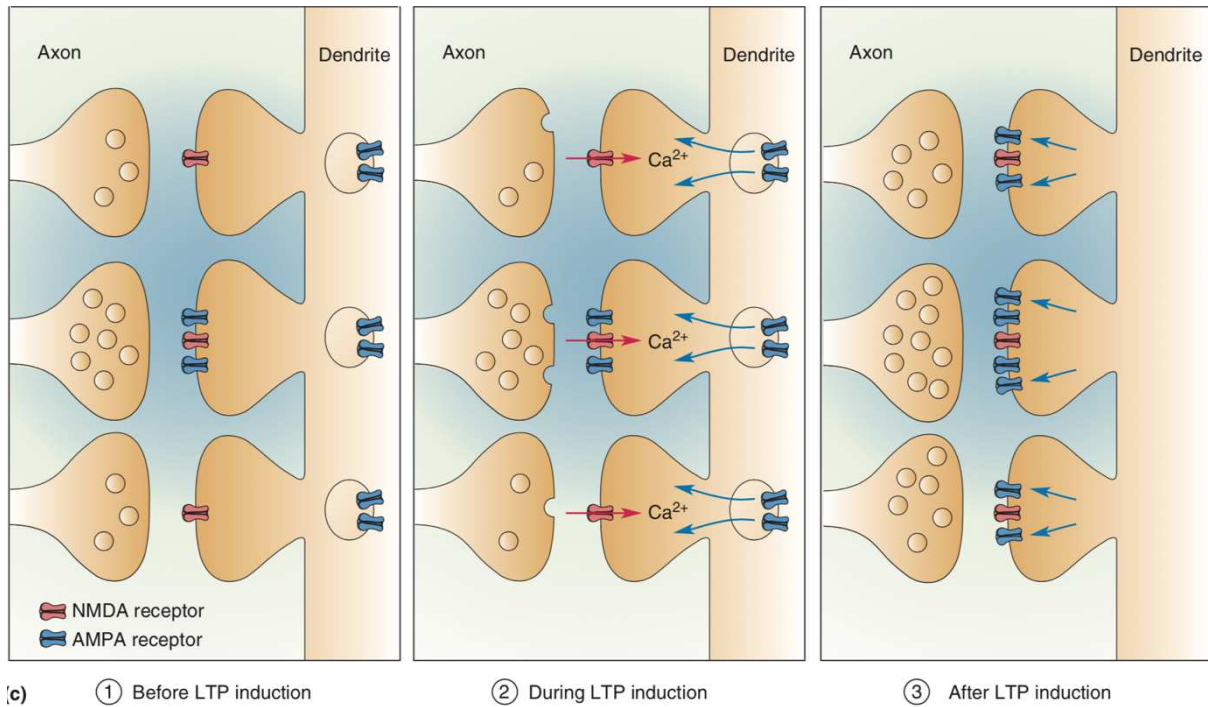


Figure 20. Les effets à long terme lors d'une stimulation soutenue

Lorsque les axones présynaptiques sont stimulés avec des courants électriques afin d'évoquer des potentiels d'action, la sécrétion de neurotransmetteurs active les récepteurs NMDA. L'influx de calcium déclenche l'insertion de récepteurs AMPA supplémentaires à la synapse. La transmission synaptique est ainsi augmentée. D'après Bear et al., 2016.

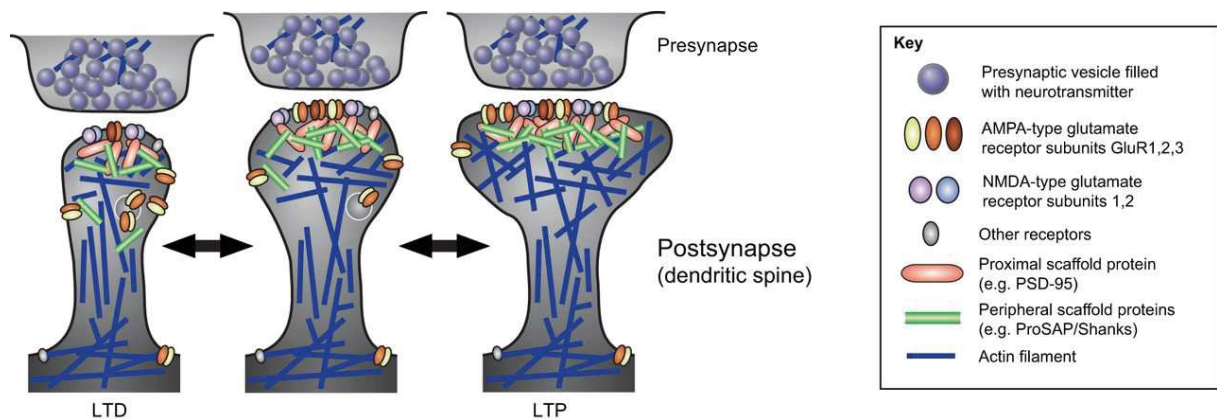


Figure 21. Remodelage des épines dendritiques lors de la LTP et de la LTD

La majorité des neurones glutamatergiques excitateurs forment une synapse avec des épines dendritiques riches en actine filamenteuse (F-Actine). Lors de la potentialisation à long terme d'une synapse, l'actine filamenteuse est polymérisée et favorise la croissance et l'élargissement des épines. Au contraire, lors de la LTD, l'actine est dépolymérisée ce qui conduit à la rétraction de l'épine. D'après Kessels and Qualmann, 2015.

suffisant pour qu'il y ait une sommation spatiale. Cela traduit la nécessité d'une coopérativité car une dépolarisation suffisante pour induire une LTP ne survient que lorsqu'un nombre suffisant de synapses est activé simultanément.

Le processus opposé de la LTP est la Dépression synaptique à Long Terme (LTD) qui produit une diminution de la force synaptique pour une longue durée. Ensemble, elles permettent de réguler l'efficacité des synapses dans les deux sens. La théorie hebbienne ne propose pas de mécanisme pour les synapses qui sont affaiblies, ni de limite à la force qu'elles peuvent atteindre. Pour pallier ce manque, Leon Cooper et ses étudiants Elie Bienenstock et Paul Munro proposèrent en 1982, la théorie BCM (Bienenstock et al., 1982). Leur théorie de plasticité synaptique bidirectionnelle combine les modifications hebbiennes (une LTP lorsque les éléments pré- et post-synaptiques sont fortement activés), et les modifications « anti-hebbiennes » qui résulte en un affaiblissement de l'efficacité synaptique lorsque l'activité présynaptique a lieu en l'absence de forte réponse post-synaptique. L'idée de Cooper était que ces modifications hebbiennes avaient besoin d'être stabilisées. Cette théorie propose donc un seuil de modification qui détermine si l'efficacité synaptique va être augmentée ou réduite en fonction de l'environnement du neurone. C'est cette idée qui amena à chercher l'existence de la LTD. En 1992, Serena Dudek et Mark Bear ont montré que la stimulation à basse fréquence (1-5 Hz) des collatérales de Schaeffer provoquait un affaiblissement de la transmission (Dudek and Bear, 1992; Kirkwood and Bear, 1994). Lorsque l'élément post-synaptique est peu ou pas dépolarisé, l'activation présynaptique entraîne une LTD. De la même façon que la LTP, la LTD n'a lieu qu'au niveau des synapses stimulées.

Plus récemment, des équipes ont essayé d'établir un lien entre ce qui a été observé *in vitro* (des stimulations électriques appliqués sur des tranches d'hippocampe) à un phénotype *in vivo* de la mémoire. Des électrodes de stimulation et d'enregistrement ont été implantées dans l'hippocampe de rats. La mémoire ayant un caractère distribué, l'approche expérimentale mise en jeu fait appel à un événement marquant. Le rat est placé dans un environnement aversif (forte luminosité), puis une cloison mobile est ouverte et permet d'entrer dans un environnement obscur. Lorsque le rat entre dans ce deuxième compartiment, il reçoit un choc électrique sous ses pattes. Cet apprentissage se fait en un seul essai, il ne fait pas dans la subtilité et induit des changements marqués dans l'hippocampe. Les enregistrements de l'activité synaptique du CA1 montrent une augmentation de l'amplitude des PPSE après ce conditionnement. Cet événement semble avoir créé une LTP lorsque le souvenir s'est formé (Whitlock et al., 2006).

III.B.2 Plasticité synaptique : mécanismes moléculaires

Les récepteurs au glutamate sont les médiateurs de la transmission synaptique excitatrice dans l'hippocampe. Après activation, ces récepteurs au glutamate ouvrent des canaux ioniques. Les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique) permettent l'entrée de Na^+ lorsque le glutamate est libéré par les axones pré-synaptiques. Les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) nécessitent non-seulement la liaison du glutamate, mais aussi une dépolarisation membranaire post-synaptique. En effet, les récepteurs NMDA sont bloqués par un ion Mg^{2+} tant que la membrane n'est pas dépolarisée. Une dépolarisation suffisante de la membrane post-synaptique entraîne le déplacement du Mg^{2+} et donc l'ouverture du canal et permet l'entrée de Ca^{2+} . L'entrée de Ca^{2+} indique donc la présence d'une activité pré- et post-synaptique (Li and Tsien, 2009).

L'influx post-synaptique de Ca^{2+} régulé par l'activation des récepteurs NMDA est nécessaire et suffisant à l'induction de la LTP (Bliss and Collingridge, 1993). L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire active la protéine-kinase C (PKC) et la protéine-kinase calcium-calmoduline dépendante de type II (CaMKII) (Sweatt, 1999). L'inactivation du gène codant pour une sous-unité de CaMKII chez des souris entraîne en effet un déficit mnésique et l'absence de LTP dans l'hippocampe (Silva et al., 1992). Ces kinases permettent, entre autres, de phosphoryler les récepteurs AMPA, ce qui induirait un changement de conformation qui augmenterait leur conductance ionique. L'entrée d'ions Ca^{2+} permet aussi l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA au niveau de la membrane post-synaptique (**Figure 20**). CaMKII reconnaît les vésicules situées à proximité de la membrane post-synaptique qui contiennent des récepteurs AMPA nouvellement formés et va activer leur fusion avec la membrane. En effet, le blocage des récepteurs NMDA par des antagonistes inhibe le recrutement des récepteurs AMPA. Ce recrutement de récepteurs (et de membrane) résulte en une augmentation de la surface de contact des épines dendritiques et ainsi augmenterait la probabilité de dépolarisation par le glutamate. L'augmentation de la conductance et du nombre de récepteurs AMPA conduit ainsi au renforcement de la synapse en amplifiant le signal (Lisman, 2003).

Concernant la LTD, deux formes ont été décrites à la synapse entre les collatérales de Schaeffer et les neurones du CA1. Le premier type dépend de l'activation des récepteurs NMDA et le deuxième dépend des récepteurs glutamatergiques couplés aux protéines G (mGluRs). Une faible activation des récepteurs NMDA conduit à une entrée de Ca^{2+} faible mais plus durable. Ceci permet d'activer des phosphatases qui déphosphorylent les récepteurs AMPA. A l'opposé de la LTP, cela conduit à une diminution de leur conductance et à une internalisation des récepteurs, c'est-à-dire à une diminution du nombre de récepteurs AMPA disponibles à la membrane

postsynaptique, et donc la réduction de la surface de contact, voire à l'élimination de la synapse et la rétraction de l'axone présynaptique. Par conséquent, une synapse immature ou peu active contient des récepteurs NMDA mais peu de récepteurs AMPA (Rao and Finkbeiner, 2007).

Des études montrent que la capacité de la membrane synaptique à accueillir des protéines est déterminée par une protéine nommée PSD-95 (*Post-Synaptic Density protein* de 95 kDa). La stimulation de PSD-95 lors d'une LTP se traduit par une augmentation du recrutement des récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique. Au contraire, la LTD entraîne une diminution de l'expression de PSD-95 et une réduction des récepteurs AMPA à la membrane. Le niveau de PSD-95 et le ratio AMPA/NMDA sont donc des indications de l'efficacité d'une synapse couramment utilisée au cours des études pour étudier le renforcement synaptique entre deux populations neuronales.

Des tests *in vivo* ont été réalisés pour vérifier les observations *in vitro*. Ainsi, le blocage pharmacologique des récepteurs NMDA par des antagonistes empêche complètement le rat de retenir l'emplacement de la plateforme cachée dans la piscine de Morris (Morris et al., 1986). Tonegawa a permis de montrer que l'inactivation du récepteur NMDA après la troisième semaine, seulement au niveau du CA1, provoque des déficits de LTP et de LTD ainsi que des performances médiocres dans la piscine de Morris. Au contraire, la surexpression du récepteur au NMDA chez des souris améliore leur capacité d'apprentissage (Tsien et al., 1996)

La LTP peut aussi être régulée par l'augmentation de l'exocytose de vésicules présynaptiques. Mais la question de l'origine pré- ou post-synaptique (ou des deux) de la LTP fait débat (Lisman, 2009). Certaines études affirment que la LTP hippocampique est seulement due au renforcement de la partie post-synaptique par l'ajout de récepteurs AMPA (Kerchner and Nicoll, 2008) alors que d'autres travaux montrent que l'efficacité de la LTP est due à l'augmentation de la sécrétion de vésicules présynaptiques (Ahmed and Siegelbaum, 2009).

III.B.3 Plasticité synaptique : changements morphologiques

Le niveau des récepteurs AMPA/NMDA n'est pas la seule indication de la maturité et de l'efficacité d'une synapse. Le nombre et la forme des épines dendritiques en font aussi état. En effet, une LTP entraîne la croissance des épines dendritiques alors qu'une épine peu ou pas stimulée tend à disparaître. Ces modifications sont le résultat notamment de l'addition de récepteurs et de la membrane additionnelle fournie par les vésicules contenant ces récepteurs ou de leur retrait. La croissance d'une épine suggère l'apport de nouveaux éléments. En effet, contrairement à la potentialisation à court-terme et la phase précoce de la LTP (E-LTP, Early-phase of LTP) qui sont

transitoires et impliquent des modifications de protéines existantes, la phase tardive de la LTP (L-LTP, Late-phase of LTP) nécessite des changements au niveau de l'expression des gènes ainsi que la synthèse de nouvelles protéines. De cette façon, de nouvelles connexions synaptiques peuvent être formées et la LTP peut durer plusieurs heures ou même plusieurs jours (Kandel, 2001; Sweatt, 1999).

Lorsque la synthèse protéique à partir des ARNm est bloquée, des rats soumis au test d'évitement actif seront capables d'apprendre qu'il faut éviter le compartiment obscur, mais ils oublieront le jour-même, contrairement aux rats contrôles qui retiennent l'information plusieurs jours voire plusieurs semaines (Barondes and Cohen, 1968). De la même façon, le blocage de la synthèse protéique au moment de la stimulation téτανique à haute fréquence ne bloque pas l'induction de la LTP elle-même mais ne permet pas son maintien sur plusieurs heures (Krug et al., 1984).

Quels sont alors les éléments qui régulent la synthèse des protéines impliquées dans la consolidation de la mémoire ? L'un des facteurs de transcription impliqué est le facteur CREB (*cAMP response element binding protein*). Lorsque PKA est activé par une augmentation de concentration d'AMPc, sa sous-unité catalytique peut être envoyée dans le noyau où elle phosphoryle CREB qui à son tour augmente la transcription des gènes et donc la synthèse d'ARNm. Une étude chez la drosophile (*Drosophila Melanogaster*) montre que la répression des gènes régulés par CREB entraîne un blocage de la consolidation mnésique alors que sa surexpression accélère l'apprentissage (Yin et al., 1994). Des études similaires chez l'aplysie montrent que CREB régule les processus mnésiques et que chez la souris la LTP et la mémoire spatiale sont altérées (Dash and Moore, 1996; Wood et al., 2005).

Une fois synthétisées, ces protéines peuvent participer à la formation de nouvelles synapses. Le réarrangement de synapses a en effet pu être observé : le nombre de synapses est plus élevé par exemple, chez des rats placés dans un milieu enrichi par rapport à leurs congénères qui sont dans des cages sans enrichissement (van Praag et al., 2000). Plus récemment, des études utilisant des méthodes de microscopie couplées à des techniques de marquage ont permis d'observer le même neurone d'une souris vivante pendant plusieurs jours. Le nombre d'épines dendritiques augmente lorsque l'environnement visuel et tactile de la souris est modifié. Si la durée d'exposition est prolongée, les synapses créées se développent. Cependant, lorsque l'animal est réintroduit dans son environnement, ces nouvelles synapses s'atrophient (par manque de stimulation) mais ne disparaissent pas, ce qui indique la formation d'une mémoire à long terme (Hofer and Bonhoeffer, 2010).

Les épines dendritiques sont donc des médiateurs de la plasticité et sont à la base de l'apprentissage et de la mémoire. De nombreuses études montrent que des changements conformationnels des épines sont liés à des modifications de capacité d'apprentissage et de rétention (Fischer et al., 1998). Les mécanismes mis en jeu dans le remodelage des épines a été difficile à étudier puisqu'elles sont extrêmement petites, environ 1 μm de diamètre ou moins. Cependant, ces épines sont riches en actine et la surexpression d'actine marquée avec une protéine fluorescente entraîne l'accumulation de cette protéine dans les épines (Kaech et al., 1997). Des équipes ont montré qu'une stimulation condense l'actine présynaptique au niveau de la zone active (Colicos et al., 2001). L'application de trains tétaniques déclenche un remodelage synaptique par un mécanisme dépendant des récepteurs au glutamate. L'actine présynaptique se redistribue et forme de nouveaux agrégats, dont certains marquent un marqueur synaptique actif FM5-95 au bout de 2 heures et restent stables pendant au moins 16 heures (Colicos et al., 2001). Après une stimulation, l'entrée de calcium lors de l'activation des récepteurs NMDA post-synaptiques active la calmoduline (CaM) qui désinhibe CaMKII qui s'autophosphoryle et induit la dissociation de l'actine filamenteuse (F-actine) (Chazeau and Giannone, 2016). CaMKII phosphoryle aussi plusieurs protéines, notamment des GTPases comme Rac1, Cdc42 et RhoA qui régulent la F-actine. L'actine postsynaptique se polymérise en filaments qui croissent pour agrandir la synapse (**Figure 21**) (Spacek and Harris, 2004). Le mécanisme exact par lequel le cytosquelette de F-actine supporte la plasticité n'est cependant pas encore totalement élucidé.

III.C Rôle de BDNF dans la modulation de la mémoire

III.C.1 *Le BDNF module l'efficacité synaptique*

Au cours des années 1990, plusieurs études se sont intéressées à l'implication de BDNF dans la mémoire. Il a été montré qu'une stimulation à haute fréquence qui induit une LTP dans le CA1 augmente aussi la quantité d'ARNm de BDNF (Patterson et al., 1992). Mais c'est en 1993 que l'équipe de Mu-Ming Poo a montré pour la première fois l'implication de BDNF dans la modulation de la plasticité synaptique dans la jonction neuromusculaire (Lohof et al., 1993). L'addition de BDNF ou de NT3, mais pas de NGF, dans des cultures mixtes nerf-muscle augmente la fréquence des quantas de neurotransmetteurs libérés et l'amplitude des potentiels évoqués post-synaptiques. Cette étude suggère que le BDNF et le NT3 augmentent la libération de neurotransmetteur.

Dans les cultures de neurones hippocampiques, l'apport de BDNF induit une potentialisation rapide de la transmission glutamatergique (Leßmann et al., 1994), alors que dans les neurones corticaux, la transmission GABAergique (inhibitrice) est déprimée (Kim et al., 1994). De même,

l'ajout de BDNF exogène dans sur des tranches hippocampiques entraîne une forte potentialisation des synapses CA1 (Kang and Schuman, 1995) ainsi qu'une diminution de l'efficacité des synapses GABAergiques (Frerking et al., 1998; Tanaka et al., 2008), ce qui conduit à une augmentation globale de la transmission excitatrice.

Cependant, comme le BDNF mature et le proBDNF ont des effets opposés, on peut imaginer que la régulation de son clivage aura des effets opposés sur la transmission synaptique et sur la connectivité des neurones (Lu et al., 2005).

III.C.2 Les effets pré et post-synaptiques

Si la question de l'origine pré- ou post-synaptique (ou des deux) de la LTP fait débat (Lisman, 2009), il en est de même pour la modulation de la transmission par le BDNF. Si tous les travaux s'accordent maintenant à proposer des effets pré- et post-synaptiques, la plupart décrivent une action principalement présynaptique.

La fonction présynaptique du BDNF se traduit par l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs. Il a été montré que le BDNF était capable d'augmenter l'exocytose de vésicules contenant des neurotransmetteurs dans les neurones corticaux en culture (Bradley and Sporns, 1999), mais les mécanismes sous-tendant la facilitation de la mobilisation et/ou la fusion des vésicules contenant les neurotransmetteurs aux synapses actives par BDNF ne sont pas très bien connus. Des travaux sur la jonction neuromusculaire et sur des neurones d'hippocampe ont montré que l'apport de BDNF augmentait la fréquence des micro-courants post-synaptiques excitateurs (mEPSCs, miniature Excitatory Post-Synaptic Currents) mais pas leur amplitude (Leßmann and Heumann, 1998; Lohof et al., 1993). Ces effets sont représentatifs d'une augmentation de la libération de neurotransmetteurs.

Les effets présynaptiques de BDNF sont aussi soulignés par les travaux sur l'expression de la forme tronquée du TrkB (TrkB-T servant de dominant négatif) spécifiquement dans les neurones présynaptiques mais pas postsynaptiques. Ce leurre empêche l'augmentation de libération spontanée de neurotransmetteur induite par le BDNF (Li et al., 1998). De plus, le BDNF réduit la "paired-pulse facilitation" (mesure électrophysiologique des propriétés présynaptiques) ainsi que le coefficient de variation des EPSCs évoqués (autre indicateur des fonctions présynaptiques) (Berninger et al., 1999). Récemment, une approche génétique permettant de bloquer la production de BDNF au niveau du CA3 et du CA1, ou seulement au niveau du CA1, a permis de montrer que la libération de BDNF induit une plasticité synaptique au niveau présynaptique (Zakharenko et al., 2003), ce qui est en accord avec la localisation préférentielle de BDNF dans les boutons présynaptiques (Dieni et al., 2012)

Il est intéressant de noter que les synapses à probabilité de libération de neurotransmetteur initialement faible démontrent une meilleure réponse au BDNF que les autres (Berninger et al., 1999; Leßmann and Heumann, 1998). Cette sélectivité dans la réponse peut être due à des différences dans la modulation des canaux calciques et/ou de leur expression, mais aussi dans des altérations distinctes de la libération de calcium depuis les stocks intracellulaires et/ou l'état de maturité de la synapse.

Dans sa fonction post-synaptique, le BDNF a un rôle qui n'est toujours pas très bien déterminé. Dans des cultures de neurones corticaux, le BDNF semble être capable d'augmenter la réponse glutamatergique dans les récepteurs NMDA mais pas AMPA (Levine et al., 1998). Tanaka et ses collègues ont montré que la signalisation BDNF-TrkB et la synthèse de protéines est nécessaire lors de la plasticité des épines induite par une stimulation fonction du temps d'occurrence des impulsions (en anglais, *spike timing-dependent stimulation*) (Tanaka et al., 2008). Dans les synapses CA3-CA1, ce même type de stimulation induit une sécrétion postsynaptique de BDNF et agit de façon autocrine en facilitant la LTP postsynaptique (Edelmann et al., 2015).

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que la modulation de la transmission synaptique induite par le BDNF et le TrkB s'exprime principalement en une fonction présynaptique et essentiellement par son rôle sur la libération de neurotransmetteurs, même si ce mécanisme fait encore débat.

III.C.3 La balance LTP/LTD : Rôle du BDNF

Le BDNF étant majoritairement exprimé au niveau de l'hippocampe, Korte et al. ont étudié son rôle dans la LTP de l'hippocampe de souris, quelques années avant qu'un lien entre le BDNF et la mémoire ne soit mis en évidence chez les humains (Egan et al., 2003; Korte et al., 1995). En effet, les souris BDNF^{+/-} et BDNF^{-/-} présentent un défaut de maintien de la potentialisation à long-terme (Korte et al., 1995). D'autres études au cours des années 90 ont montré qu'une stimulation qui induit la LTP dans la région du CA1, entraînait aussi une augmentation du niveau d'ARNm de BDNF (Patterson et al., 1992).

a Rôle du clivage de BDNF dans la LTP

L'hypothèse du Yin et du Yang des neurotrophines propose que le BDNF mature soit impliqué dans la LTP alors que le proBDNF entraîne la LTD (**Figure 22**). S'il a été montré que le BDNF est très rapidement clivé après relargage in vivo (Matsumoto et al., 2008), on peut imaginer un rôle transitoire et/ou local du proBDNF nouvellement sécrété sur la LTD.

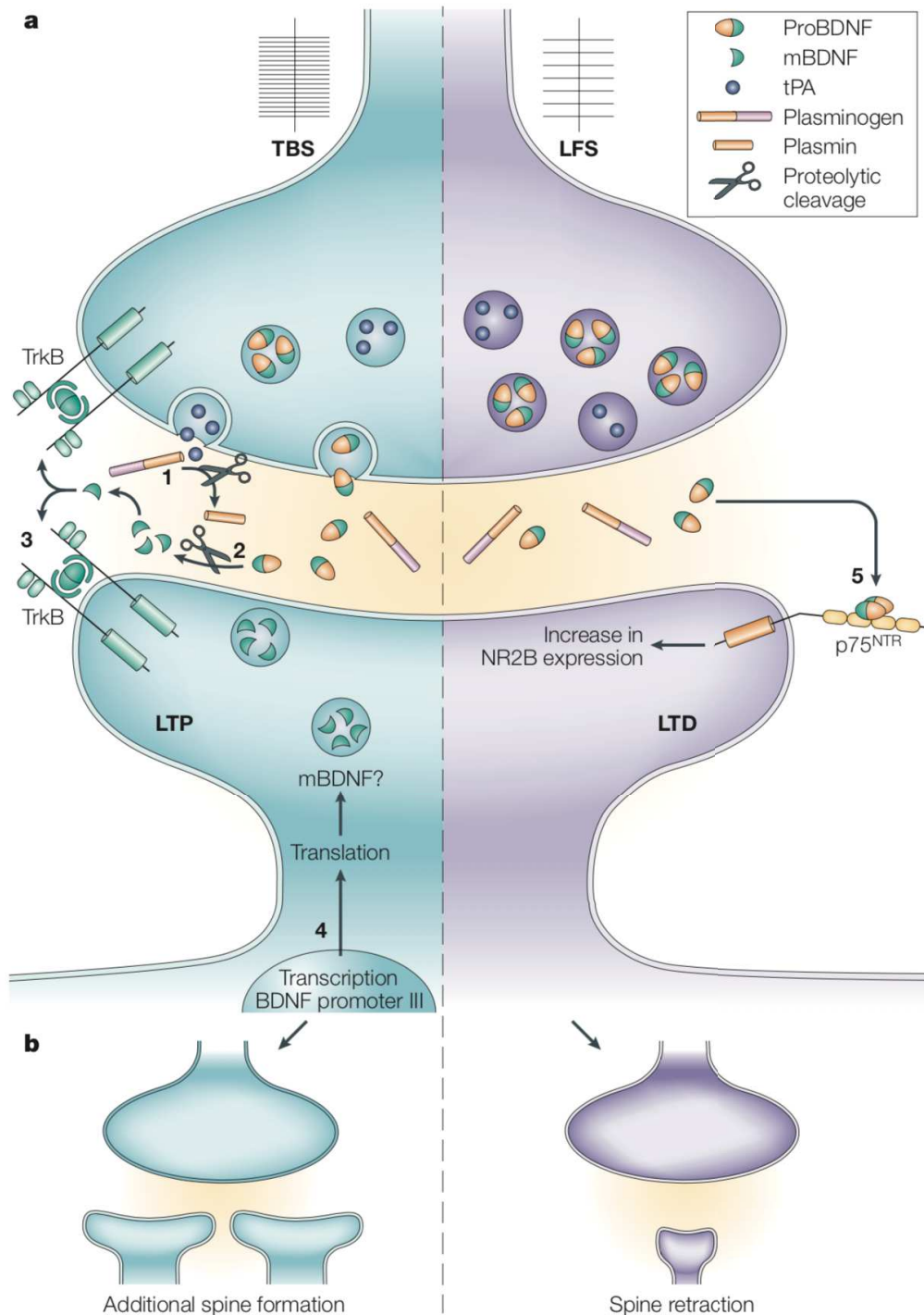


Figure 22. Le Yin et le Yang de la régulation synaptique à long terme par le proBDNF et le BDNF mature.

(a) En réponse à une stimulation en thêta-burst (TBS), le tissu plasminogen activator (tPA) est sécrété et clive le plasminogène en plasmine (1) qui clive le proBDNF sécrété en BDNF mature (mBDNF) (2). Le mBDNF se lie au récepteur TrkB et déclenche des cascades de signalisation qui vont induire la potentialisation à long terme (LTP) par la formation de nouvelles épines dendritiques et le remodelage des épines stimulées (3) et **(b)**. Le neurone post-synaptique activé active la transcription et la synthèse de nouvelles protéines de mBDNF (4). Au contraire, lors d'une stimulation de basse fréquence (LFS), le proBDNF non clivé se lie au récepteur p75^{NTR} (5) et facilite l'induction de la dépression à long-terme en réduisant la taille et le nombre d'épines **(b)**. D'après Lu et al., 2005.

Peu d'études ont étudié la dynamique de clivage de BDNF à la synapse et son rôle dans la transmission synaptique. Une étude a porté sur le clivage de BDNF par le tissu plasminogène activator (t-PA). Le t-PA a été impliqué dans la L-LTP dès 1998 (Baranes et al., 1998). Le tPA peut cliver le plasminogène en plasmine qui elle-même peut cliver le proBDNF extracellulaire. Il a été montré que chez des souris n'exprimant ni le t-PA, ni le plasminogène, le niveau de proBDNF était augmenté dans les synapses du CA1 (Pang, 2004). De plus l'ajout de BDNF mature exogène, mais pas l'ajout de proBDNF résistant au clivage, rétablit la LTP chez ces souris double KO. Récemment, l'étude d'une lignée de souris exprimant une forme de proBDNF résistant au clivage montre que l'absence de clivage entraîne non seulement une réduction de la LTP, mais également une facilitation de la LTD (Yang et al., 2014)

b Le BDNF mature régule la LTP

La maturation du proBDNF peut se faire grâce au clivage par la plasmine, une protéase extracellulaire activée par tPA. Or, cette enzyme étant connue pour son rôle dans la phase tardive de la LTP (L-LTP, Late-phase Long-Term Potentiation) (Baranes et al., 1998), une des fonctions qui lui a été attribuée est la conversion du proBDNF en BDNF mature à la synapse. En activant la plasmine, la tPA est responsable de la conversion du proBDNF en BDNF mature, et permet ainsi la mise en place de la L-LTP (Pang, 2004). De plus, le traitement de tranches hippocampiques provenant des souris KO pour la tPA et le plasminogène avec du BDNF mature recombinant restaure la L-LTP aux synapses de l'aire CA1, contrairement au proBDNF clivage-résistant. La donnée la plus étonnante de cette étude conduite par Bai Lu est que le BDNF mature semble suffisant pour l'expression de la L-LTP. En effet, la perfusion des tranches avec du BDNF mature après une stimulation téτανique faible, n'induisant normalement que de la E-LTP, met en place d'une forte L-LTP (Pang, 2004). La forme mature est également capable de restaurer la L-LTP pendant et après le blocage de la synthèse protéique par des inhibiteurs spécifiques. Ces résultats indiquent que le BDNF mature joue un rôle clé dans la synthèse protéique mise en place lors du maintien à long terme de la LTP. L'expression et la synthèse de BDNF étant dépendante de son activité, on peut supposer qu'un signal induisant de la L-LTP déclenche en plus un message de maturation du proBDNF pour former du BDNF capable d'induire les changements fonctionnels et morphologiques. Le BDNF étant libéré rapidement par le neurone présynaptique après une stimulation téτανique et le gène BDNF étant fortement surexprimé par le neurone postsynaptique pendant la phase de maintien de la L-LTP, deux processus temporellement distincts sont proposés : 1) la phase d'induction de la L-LTP implique la sécrétion présynaptique et le clivage extracellulaire du proBDNF; 2) la phase de maintien de la L-LTP dépend de la transcription et de la traduction du BDNF dans le neurone postsynaptique suivi du clivage intra-

ou extracellulaire. Cette hypothèse est confortée par l'utilisation de BDNF exogène qui montre qu'une application de courte durée affecte la transmission basale synaptique, alors qu'une application lente et prolongée de BDNF facilite l'induction de la LTP via la synthèse de nouvelles protéines directement dans les dendrites (Ji et al., 2010 ; Kang and Schuman, 1996). L'infusion de BDNF dans l'hippocampe de rats vivants anesthésiés provoque une augmentation de la transmission synaptique forte et persistante au niveau des synapses entre les fibres perforantes et le DG via l'activation de la voie de signalisation de MEK-ERK (Messaoudi et al., 1998). Contrairement à la région du CA1, la LTP dépendante de BDNF dans le DG dépend de la transcription et est associée à l'induction de plusieurs gènes (tels que Arc, Narp, neuritin, Klf10/TIEG1, et Arl4l) dans les cellules granulaires (Messaoudi et al., 2007). L'ARNm de Arc est rapidement envoyé dans les dendrites et sa synthèse est nécessaire pour que la LTP dure après activation par BDNF ou par stimulation haute fréquence (Messaoudi et al., 2007; Ying et al., 2002). En effet, Arc joue un rôle primordial dans la formation des molécules d'actine fibrillaires, indispensable pour les changements morphologiques des synapses.

Les souris KO pour le TrkB valident l'importance de la signalisation BDNF-TrkB dans la LTP puisqu'elles ont un défaut de LTP au niveau des synapses CA3-CA1 (Minichiello et al., 1999). Les auteurs ont montré, grâce à des mutations ciblées, que le TrkB régule la LTP dans ces synapses via la voie de signalisation de PLC γ (Minichiello, 2009; Minichiello et al., 2002). Ces résultats vont à l'encontre de ce qui est observé dans les synapses du DG où l'effet de BDNF sur l'efficacité des synapses nécessite l'activation de la voie MEK-ERK (Ying et al., 2002). Ces deux voies sont importantes après l'activation de TrkB par le BDNF mature sur la survie, la croissance et la différenciation. Le BDNF mature potentialise ainsi la LTP et surtout la L-LTP via l'activation de TrkB et des voies de signalisations en aval qui conduisent à la synthèse de nouvelles protéines et au remodelage des synapses.

c Le proBDNF immature régule la LTD

La signalisation de proBDNF sur son régulateur p75^{NTR} est importante pour la LTD. Les souris dont le gène codant pour p75^{NTR} est inactivé sont caractérisées par une diminution de la LTD hippocampique au niveau des synapses du CA1, alors que la LTP n'est pas affectée (Rösch et al., 2005). Une stimulation à basse fréquence en présence de proBDNF exogène provoque une LTD dépendante des NMDAR par un mécanisme nécessitant p75^{NTR} et la sous-unité GluN2B de NMDAR (Woo et al., 2005). De plus, la stimulation de tranches hippocampiques issues de souris résistantes au clivage de proBDNF montre également des déficits de transmission synaptique basale, une LTP réduite et une LTD renforcée au niveau des synapses CA3-CA1 (**Figure 23**) (Yang et al., 2014). D'autre part, des études suggèrent que le pro-peptide de BDNF est capable, une

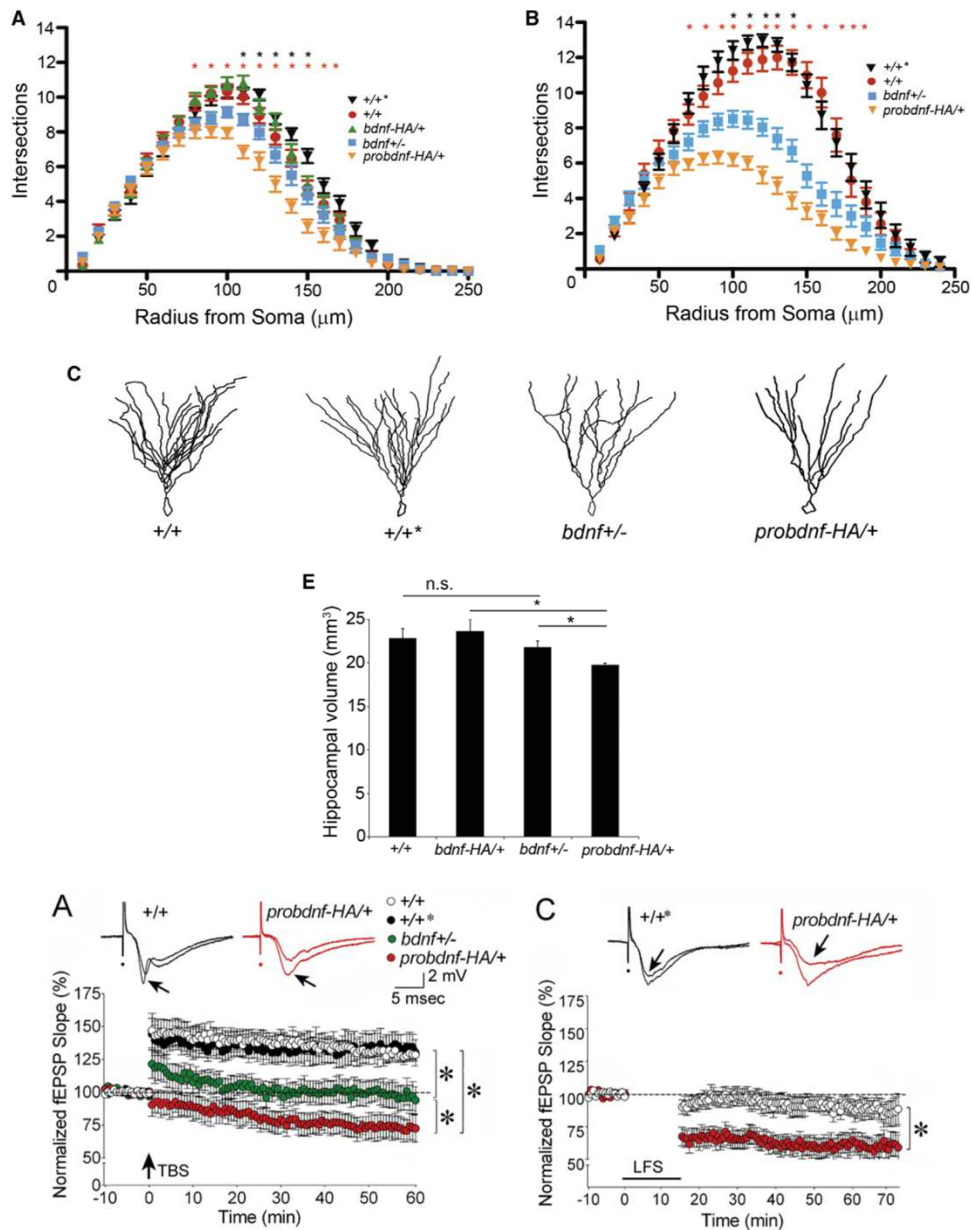


Figure 23. Le proBDNF régule négativement le remodelage des neurones et la transmission synaptique dans l'hippocampe.

Une lignée de souris dont le BDNF est résistant au clivage a été générée et est nommée proBDNF-HA. Les animaux hétérozygotes sont étudiés et comparés à des souris contrôles (BDNF^{+/+}) et des souris hétérozygotes KO (BDNF^{+/-}) ainsi que les souris *+/+* issues de la lignée proBDNF-HA.

Analyse de Sholl des neurones granulaires du gyrus denté de souris à P30 (A) ou à P105 (B). La morphologie des neurones BDNF^{+/-} et des neurones proBDNF-HA/+ est significativement différente de celle des neurones contrôles BDNF^{+/+} et proBDNF-HA^{+/+}. (C) Tracés représentatifs de cellules granulaires du DG marquées en Golgi-Cox. (E) Le volume hippocampique total a été mesuré par analyse des images IRM des cerveaux de souris de 11 mois. Le volume hippocampique des souris hétérozygotes est significativement réduit par rapport à celui des souris contrôles. Extrait de Yang et al., 2014.

fois sécrété, de faciliter la LTD dans les synapses du CA1, notamment via une internalisation des AMPAR (Mizui et al., 2015). Le proBDNF recombinant serait aussi capable de réguler l'activité des synapses neuromusculaires via l'activation du p75^{NTR} présynaptique (Yang et al., 2009). De plus, lors de l'extinction du souvenir d'une tâche apprise, le niveau de proBDNF est environ 2.5 fois plus élevé dans le CA1 (Barnes and Thomas, 2008).

L'ensemble de ces études montre que le proBDNF est capable de réguler négativement la structure hippocampique, la transmission synaptique et la plasticité. L'équilibre entre les deux formes de BDNF est donc crucial pour la plasticité synaptique puisque le BDNF mature conduit à l'augmentation du nombre d'épines et à leur élargissement tandis que le proBDNF aura tendance à contrer ces effets.

III.C.4 Rôle du BDNF dans le remodelage morphologique

Le BDNF est impliqué dans la croissance et la différenciation des dendrites, ainsi que dans le remodelage des épines. Des changements à long terme entraînent des réarrangements morphologiques importants pour la mise en place de la mémoire. Ces changements dépendent des deux formes de BDNF puisque le BDNF mature active, via TrkB, les voies de signalisation MEK/ERK qui stimule la différenciation et la pousse neuritique, ainsi que la voie de la PLC- γ qui régule la plasticité synaptique. Au contraire, l'activation de p75^{NTR} par proBDNF inhibe la pousse dendritique et favorise la rétraction des épines.

Le BDNF mature, en favorisant la LTP, provoque la mise en place de nouvelles épines (Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999), et un réarrangement du cytosquelette d'actine qui permet l'élargissement des têtes des épines (Fukazawa et al., 2003; Matsuzaki et al., 2004). En effet, l'addition de BDNF sur des tranches hippocampiques augmente le nombre d'épines, sans modifier la longueur ou le nombre de dendrites, ce qui montre le renforcement des connexions synaptiques (Tyler and Pozzo-Miller, 2001).

Au contraire, le proBDNF en potentialisant la LTD, entraîne la diminution du nombre de récepteurs AMPA à la synapse, ainsi que le nombre d'épines (Zhou and Dacheux, 2004). Des études sur le pro-peptide de BDNF montrent qu'il entraîne aussi une réduction de la densité synaptique (Guo et al., 2016). La surexpression de p75^{NTR} va dans le même sens et provoque une diminution de la densité des épines dendritiques (Zagrebelsky et al., 2005). La caractérisation des souris KO p75^{NTR}^{-/-} est en accord avec cette observation puisqu'elles présentent au contraire une densité d'épines plus élevée et une arborisation dendritique plus complexe que les souris sauvages (Zagrebelsky et al., 2005).

Les souris knock-in proBDNF résistant au clivage ont permis de montrer que la complexité dendritique est diminuée dans les cellules granulaires du DG et la formation des épines est réduite dans les granulaires du DG ainsi que les cellules pyramidales de CA1 (Yang et al., 2014). Ces observations indiquent que le proBDNF a un effet négatif sur la ramification des neurones et la formation des épines.

Les deux formes de BDNF semblent donc jouer un rôle majeur sur la restructuration des connexions par leurs rôles opposés sur la formation des épines et des connexions. La théorie du Yin et du Yang pourrait donc aussi s'appliquer sur les fonctions de régulation de la morphologie dendritiques par BDNF.

III.C.5 Rôles de BDNF et de proBDNF dans la mémoire

La première démonstration de l'implication de BDNF dans les processus de mémoire au niveau comportemental est celle de Ma et al. en 1997. En effet, les auteurs ont montré que l'inhibition de l'expression de BDNF dans l'hippocampe avant l'apprentissage empêche la formation d'une mémoire d'évitement (Ma et al., 1997). Depuis, ce rôle a été montré dans d'autres tests tels que le test de mémoire spatiale dit de la piscine de Morris (**Figure 24b**) (Mizuno et al., 2000) ainsi que dans un test de conditionnement aversif (Alonso et al., 2002). Il a également été montré que les souris knock-out hétérozygotes de BDNF présentent des déficits de mémoire spatiale (Linnarsson et al., 1997) et de mémoire d'un conditionnement aversif (**Figure 24c**) (Liu et al., 2004). Il en est de même pour les souris dans lesquelles TrkB a été inactivé dans le cerveau antérieur (Minichiello et al., 1999).

Plusieurs études ont montré que BDNF était surexprimé lors de l'acquisition d'une nouvelle tâche, comme l'apprentissage du test de la piscine de Morris ou la navigation dans un labyrinthe radial (Kesslak et al., 1998; Mizuno et al., 2000), dans le cas d'un conditionnement aversif (Alonso et al., 2002), lors d'une reconnaissance olfactive (Broad et al., 2002) ou lors de la mémorisation d'un goût aversif (Ma et al., 2011).

En 2007, Heldt et al. ont montré pour la première fois que le BDNF était impliqué dans l'oubli (Heldt et al., 2007). Il a ensuite été mis en évidence que le clivage de BDNF est crucial pour l'acquisition et l'extinction de la peur (Barnes and Thomas, 2008) ce qui suggère un rôle intéressant de la régulation de la balance pro/mature par le clivage. L'équipe de Gregory Quirk a ensuite montré que l'infusion de BDNF dans le cortex préfrontal médian de rats soumis à un conditionnement aversif entraîne une diminution de la réponse, alors même que les rats n'avaient pas été soumis à un protocole d'extinction de la mémoire (Peters et al., 2010). Cette découverte suggère ainsi que le BDNF mature peut également avoir un rôle dans l'extinction.

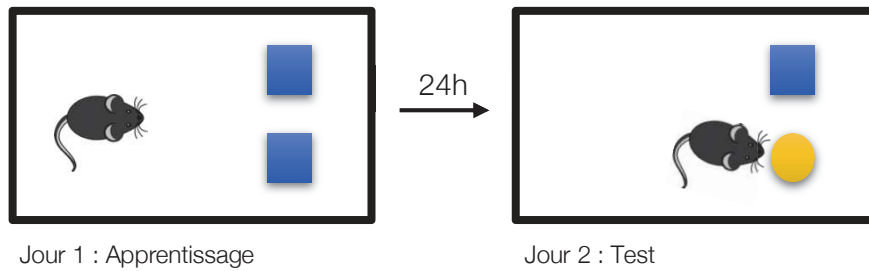


Figure 24a. Test de reconnaissance d'un nouvel objet.

C'est un test réalisé sur deux jours. Le premier jour, la souris explore deux objets. Le deuxième jour, l'un des objets est remplacé par un nouvel objet. Les souris ont une préférence innée pour la nouveauté, donc si elle se rappelle de l'objet familier de la veille, elle passera plus de temps à explorer le nouvel objet. Comme c'est une préférence innée, il n'y a pas besoin de faire des entraînements ou d'ajouter des renforcements positifs ou négatifs.

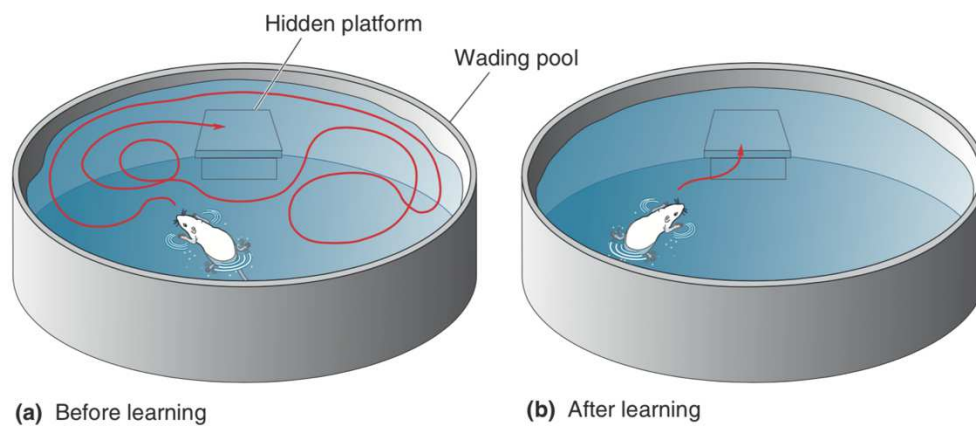


Figure 24b. Test de mémoire spatiale : la piscine de Morris.

(a) Avant l'apprentissage, la souris nage à la recherche de la plateforme cachée. (b) Après plusieurs entraînements, la souris sait où se trouve la plateforme et nage directement vers la plateforme. D'après Bear et al., 2016.

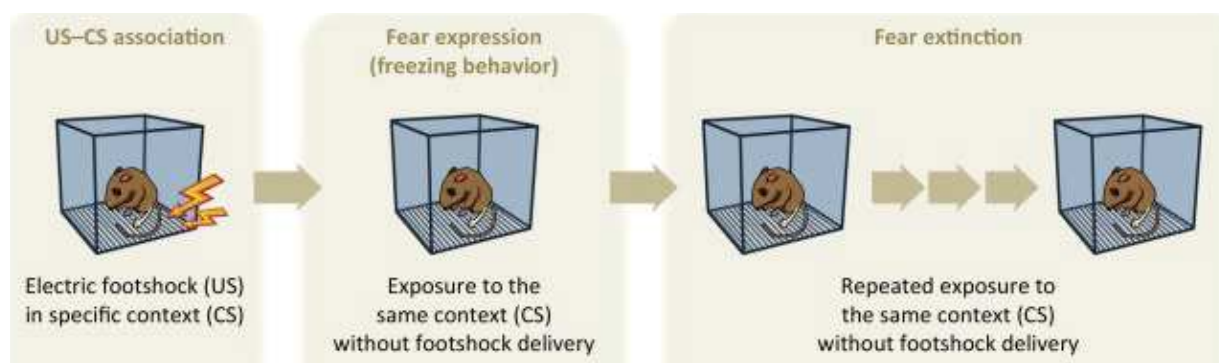


Figure 24c. Test de conditionnement à la peur.

Les souris sont placées dans un environnement nouveau (odeur, lumière, texture) et reçoivent un choc électrique sous les pattes. Ce test est très aversif et le souvenir de cet événement est rapidement mis en place. Le jour suivant, les souris sont placées dans le même environnement et le temps pendant lequel elles restent figées est mesuré. L'absence de choc modifie le souvenir formé et l'extinction de la mémoire peut être mesurée quelques jours plus tard en mesurant à nouveau le temps de « freezing ». D'après Flores et al., 2015.

Une étude récente montre que l'injection de proBDNF résistant au clivage dans l'hippocampe entraîne des déficits d'apprentissage et de mémoire dans le test du labyrinthe de Morris (Chen et al., 2016). Ces résultats suggèrent l'importance de la régulation de la maturation du BDNF dans l'apprentissage et la mémoire même si d'autres études sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ce rôle.

Le BDNF intervient aussi au niveau du stockage des informations. En effet, le rappel d'un événement entraîne une augmentation de l'ARNm de BDNF (Kesslak et al., 1998). Des études faites sur des rats entraînés dans des tests de mémorisation spatiale montrent que les souvenirs sont perturbés par l'infusion d'ARN anti-sens de BDNF (Mizuno et al., 2000). De plus, l'infusion de BDNF après un entraînement augmente les capacités mnésiques des sujets traités alors que l'infusion d'un anticorps anti-BDNF après entraînement diminue la LTP (Alonso et al., 2002). Cependant, la cinétique de traitement semble très importante puisque si ces infusions sont effectuées 6h après l'entraînement, aucune modification n'est observée. A l'inverse, l'infusion de BDNF dans l'hippocampe 12h après un entraînement affecte la rétention de la tâche apprise (Bekinschtein et al., 2008). Cette étude indique donc que le BDNF hippocampique est essentiel lors de la consolidation de souvenirs lors des premières heures qui suivent l'apprentissage, mais aussi plus tard, pour leur stockage à long terme.

Objectifs de la thèse

Le clivage protéolytique de BDNF est un point de contrôle critique pour les fonctions du BDNF. Comme nous l'avons vu dans l'Introduction, le proBDNF et sa forme mature ont des effets diamétralement opposés dans les grandes fonctions neuronales telles que la survie, la différenciation, la plasticité synaptique et la mémoire. Cette dichotomie d'action a récemment été surnommée le Yin et le Yang du BDNF, où la forme pro immature joue le rôle négatif Yin, et la forme mature joue le rôle positif Yang. Cet équilibre fragile entre les 2 formes est critique aussi bien au cours du développement que dans le cerveau adulte. De par leurs rôles sur le fonctionnement et la survie des neurones, il n'est pas étonnant que les deux formes de BDNF aient été impliquées dans de nombreuses maladies neurodégénératives et neurologiques. Cependant, le mécanisme de régulation du clivage du BDNF est toujours très mal connu alors qu'il représente une étape majeure conditionnant le rôle de BDNF.

L'objectif de mes travaux de thèse était donc d'identifier un mécanisme de régulation de la maturation de BDNF et d'étudier les conséquences fonctionnelles de ce mécanisme sur une fonction centrale de BDNF dans le cerveau adulte : la mémoire. Nous avons ainsi fait l'hypothèse de l'existence d'un tag sur la séquence de BDNF qui jouerait le rôle d'interrupteur du clivage. Après avoir identifié *in silico* un site de phosphorylation putatif en plein cœur de la séquence de clivage, nous avons confirmé et caractérisé l'existence d'une phosphorylation de la Serine 130 *in vitro* et déterminé les conséquences sur la maturation du BDNF *in vitro* et *in vivo*. Nous avons ensuite identifié les kinases capables de phosphoryler BDNF et nous avons confirmé leur interaction avec la neurotrophine. Enfin, nous avons généré des souris phospho-mutantes knock-in par CRISPR-Cas9 qui nous ont permis d'analyser le rôle régulateur de phospho-S130 sur la plasticité synaptique *in vivo*. Des études comportementales en cours permettront enfin d'étudier l'incidence de phospho-S130 sur les processus d'apprentissage et de mémoire.

En parallèle, la recherche de kinases responsables de la phosphorylation de BDNF nous a permis de mettre en évidence une exoPKA atypique localisée dans l'appareil de Golgi et présente dans la voie sécrétoire. L'identification de cette exoPKA ainsi que la caractérisation de son rôle dans la régulation de la plasticité synaptique a fait l'objet d'un second travail également présenté dans cette thèse.

Chapitre 2 : Méthodologie

Construction des plasmides et des virus

Les constructions de plasmides ont été générées par des techniques de clonage standard et confirmées par séquençage. Le LV-CMV-BDNF-mCh a été généré à partir de BDNF recombinant de rat et lié à une mCherry fluorescente dans le vecteur d'expression pCMV (voir (Hinckelmann et al., 2016)). Les LV-CMV-S130A-mCh et LV-CMV-S130D-mCh ont été générés par mutation ponctuelle. Les plasmides suivants ont été utilisés : PKA-GFP (pCAGGS-mouse PKA-Calpha-mEGFP ; plasmide Addgene # 45528), FAM20C (pcDNA3.1-FAM20C:V5 ; plasmide Addgene # 63584), FJX1-myc (pcDNA-zeo-hFJX1-myc ; plasmide Addgene # 46930), RSK2-FLAG (pWZL-Neo-Myr-Flag-RPSK6A3 ; plasmide Addgene # 20627), FAM69B-myc-DDK (Origene MR212482), MSK1-myc-DDK (Origene RC200549), SGK2 (Origene MR205649), LifeAct-GFP (plasmide Addgene # 58470). Le plasmide Golgi-PKIA-myc-FLAG a été cloné à partir du plasmide pLV-Golgi-eGFP (plasmide Addgene # 79809) et du plasmide PKI α -myc-DDK (PKIA humain ; Origene Cat# RC204652). Un GS linker (2 x GGGGS) a été ajouté entre la séquence de B4GALT1 et la séquence du PKI.

Anticorps spécifique du phospho-BDNF

Un anticorps polyclonal à façon, spécifique de la phosphorylation de la sérine 130 de BDNF a été produit chez un lapin à partir d'un peptide phosphorylé de séquence NH₂-C-SMRVRRH(pS)DPAR-CONH₂ et purifié par le peptide contrôle non phosphorylé NH₂-SMRVRRHSDPAR-CONH₂ (Covalab, France). Un cerveau de souris knock-out de BDNF, sacrifiée 10 jours après sa naissance, a été gracieusement fourni par l'équipe d'Alain Gardier (Université Paris Sud XI, Chatenay-Malabry) pour les tests de l'anticorps phospho-BDNF.

Souris KI-S130A et KI-S130D

Les souris knock-in KI-S130A et S130D ont été générées par mutation ponctuelle grâce à la technologie CRISPR-Cas9 (Institut Clinique de la Souris, ICS, Strasbourg, France). La séquence du gène cible de BDNF utilisée est accessible sur Ensembl (ENSMUSG00000048482, version 82, octobre 2015). Les ARN guides ont été conçus avec l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Strasbourg, France) selon les critères suivants : (1) le site cible est localisé à 50% de la séquence codante (CDS) par rapport à la terminaison N ; (2) le score hors cadre est > 60 ; et (3) la discordance est de 2 ou plus. La séquence d'ARN guide était la suivante : 5'-CACTCCGACCCTGCCCGCCG-3'. Les animaux sont élevés selon un cycle jour/nuit de 12h et ont accès, à volonté, à de l'eau et des aliments pour rongeurs. Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées conformément aux directives de la commission INSERM et à la

directive de l'Union Européenne (2010/63/UE, 22 septembre 2010) concernant le soin et l'utilisation des animaux.

Culture de lignées cellulaires

Les cellules HEK étaient cultivées dans un milieu DMEM-F12 GlutaMAX (ThermoFisher Scientific) contenant 10% de sérum de veau et des antibiotiques. La transfection de ces cellules était faite par Calcium Phosphate.

Cultures primaires de neurones corticaux et hippocampiques

Les cultures primaires de neurones hippocampiques de souris étaient faites à partir d'hippocampes d'embryons de souris au stade E17.5. Les neurones hippocampiques dissociés étaient ensemencés sur des lamelles en verre recouvertes de Poly-L-Lysine à une densité de 350 cellules/mm². Les cultures primaires de neurones corticaux de rats étaient faites à partir de cortex d'embryons de rats au stade E16.5. Les neurones de rat étaient ensemencés à une densité de 2 500 cellules/mm² pour les analyses protéiques et à 350 cellules/mm² pour les immunofluorescences. Les neurones étaient cultivés dans du Neurobasal (Invitrogen) complémenté par 2% de B27, 1% de GlutaMAX (ThermoFisher Scientific) et des antibiotiques.

Transfection/Transduction

Les cellules en cultures étaient transfectées soit par électroporation (Amaxa Neuron Nucleofector Kit, Lonza), soit par transfection au Calcium Phosphate. BDNF-mCh, S130A-mCh et S130D-mCh sont des lentivirus transduits au bout de trois jours en culture. Les transfections ou transductions étaient faites au moins 48h avant lyse ou fixation des cellules pour que le taux d'expression soit significatif.

Test de phosphorylation *in vitro* (kinase assay) sur peptides

La protéine kinase recombinante Akt (400 ng) (Upstate Biotechnology) était incubée avec 10 µCi [γ - 32P]ATP (3,000 Ci/mmol (=111 TBq/mmol), Perkin Elmer) et 1 µg de peptides comprenant la sérine 130 dans 30 µL de kinase buffer (25 mM HEPES, 25 mM β -glycerophosphate, 25 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, and 0.1 mM NaVO₃). Les réactions étaient incubées à 30°C pendant 2 heures et arrêtées avec l'ajout de tampon Laemmli. Les protéines étaient séparées sur gel SDS-PAGE 15%, et la phosphorylation a été révélée par autoradiographie. La validation de la spécificité de phosphorylation sur la sérine 130 était validée sur les peptides contrôles dans lesquels la sérine 130 est mutée en une alanine ou un acide aspartique.

Criblage *in vitro* de 245 kinases

La capacité de 245 différentes kinases de sérines/thréonines à phosphoryler un peptide de BDNF contenant la S130 (EEYKNYLDAANMSMRVRRHSDPARRGELSVCDSEWVTA) était évaluée par le test KinaseFinder (ProQinase GmbH) selon le protocole du fabricant. La liste des kinases utilisées est le Tableau en annexe. Le 1^{er} test a identifié 9 kinases qui sont : PKA, SGK2, MSK1, MSK2, RSK2, RSK3, PIM3, PRKG2, CLK4. Puis le 2^{ème} test en dose-réponse a identifié : PKA, SGK2, MSK1, RSK2 par le test KinaseFinder Verification (ProQinase GmbH).

Clivage *in vitro* par la furine

Le test de clivage par la furine était effectué sur des lysats cellulaires dilués dans le tampon suivant pour une concentration finale de 50 mM HEPES, pH 7, 0.25% Triton X-100, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM β -mercaptoethanol et incubés 1 heure à 30°C en présence de 2 unités de Furine recombinante (New England Biolabs). Les réactions été arrêtées avec l'ajout de tampon Laemmli.

Déphosphorylation *in vitro* par la lambda-PP

Le test de déphosphorylation par la λ -PP (New England Biolabs) était réalisé sur des échantillons immunoprécipités avec l'anticorps anti-mCherry en présence d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases. Les échantillons enrichis en BDNF étaient incubés avec 1 μ L de λ -PP (400 unités) dans le tampon fournit (New England Biolabs). Les réactions été arrêtées avec l'ajout de tampon Laemmli.

Immunoprécipitations

Pour les immunoprécipitations (IP), les cellules étaient lysées au moins 48h après transfection avec un tampon d'IP froid (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 mM HEPES, pH 7.2) supplémenté en inhibiteur de protéase et de phosphatase, respectivement Complete EDTA-free Protease Inhibitor mixture (Roche) et Phosphate Inhibitor Cocktail 2 (Sigma). Les lysats cellulaires étaient débarrassés des débris cellulaires par centrifugation à 10,000g pendant 10 min à 4°C et le surnageant résultant était incubé avec 5 μ L de protéines G-Sepharose (Sigma) pour un pre-clearing. Trois microlitres de protéines G-Sepharose étaient par ailleurs incubés avec un anticorps pendant 3h. Le surnageant du pre-clearing était ensuite incubé avec les billes liées à l'anticorps pendant la nuit. Ensuite, les billes étaient lavées 4 fois avec du tampon d'IP. Enfin, les protéines étaient éluées avec du tampon de Laemmli, puis séparées par Western Blot.

Les anticorps utilisés pour l'IP ou la co-IP sont les suivants : anti-mCherry (2,5 μ g, Plateforme Anticorps, Institut Curie), anti-BDNF mature (clone 3C11, 2 μ g, Icosagen), anti-BDNF (N20, 2 μ g,

Santa-Cruz Biotechnology), anti-GFP (1 µg, Plateforme Anticorps, Institut Curie), anti-PKA-Cα (4 µg, Cell Signaling).

Western Blots

Les protéines issues des cellules en culture étaient lysées dans du tampon de lyse (pH 7.4) contenant les inhibiteurs de protéases et de phosphatase suivants : Complete EDTA-free protease inhibitor mixture (Roche) et Phosphate Inhibitor Cocktail 2 (Sigma). Les hippocampes de souris étaient rapidement dissequés sur la glace et homogénéisés dans du tampon de lyse froid (pH 7.4) avec les inhibiteurs de protéases et phosphatases mentionnés au-dessus. Les deux types d'échantillons étaient centrifugés 10 minutes à 10,000 g à 4°C et le surnageant était récupéré. La concentration des protéines était déterminée par le test bicinchoninic acid (BCA, ThermoFisher). Les protéines étaient séparées par des gels SDS-PAGE à 10 ou 15%, puis électro-transférées sur des membranes PVDF de 0,2 µm. Les protéines étaient détectées à partir des anticorps suivants : phosphoBDNF (1:100, polyclonal, à façon) BDNF (clone 3C11, 1:1,000; Icosagen), BDNF N-20 (1:2,000; Santa Cruz Biotechnology), PKA-Cα (1:100, polyclonal, Cell Signaling Technology) GM130 (1:500, monoclonal, BD Biosciences), TGN38 (1:50, monoclonal, BD Transduction Laboratories), Furine (1:250, monoclonal, Santa-Cruz Biotechnologies), mCherry (1:2000, polyclonal, Plateforme Anticorps, Institut Curie), GFP (1:500, polyclonal, Plateforme Anticorps, Institut Curie), FLAG (1:500, monoclonal, Sigma), Lamin B1 (1:1000, monoclonal, Abcam), p150 (1:1000, monoclonal, BD Transduction Laboratories),. La α-tubulin (1:10,000; Sigma) et la β-actine (1:5000, monoclonal, Sigma) étaient utilisées comme contrôles internes. Après incubation avec les anticorps secondaires conjugués à la horseradish-peroxidase (HRP) dirigés contre les IgG de souris ou de lapin (1:10000, Thermo Fisher Scientific), l'immunoréactivité était détectée par le kit de détection ECL Western Blotting (Amersham). Les protéines issues d'immunoprécipitations étaient révélées à l'aide des anticorps secondaires EasyBlot (1:2000, lapin et 1:1000, mouse, Genetex).

Analyse de la morphologie et des épines dendritiques par Golgi-Cox

Le marquage par imprégnation de Golgi-Cox était réalisé avec le kit FD Rapid GolgiStain™ Kit (FD Neurotechnologies, inc.) et le protocole était adapté pour un marquage optimal des cellules de l'hippocampe. Brièvement, des souris de 3 mois étaient sacrifiées par dislocation cervicale et les cerveaux étaient extraits rapidement et incubés 3,5 jours dans le premier mélange A+B, puis 3 jours dans la solution C avant d'être coupés en tranches coronales de 250 µm d'épaisseur au niveau de l'hippocampe. Ces sections étaient montées sur des lames recouvertes de gélatine, puis laissées sécher environ deux semaines. Ces tranches étaient ensuite incubées dans le

mélange de solution D+E puis déshydratées et montées avec du Permount (ThermoFisher). Au moins 30 neurones par génotype étaient évalués.

LTP chimique (cLTP)

Le protocole de LTP chimique a été décrit par Tomasoni (Tomasoni et al., 2017). Les neurones étaient incubés dans une solution contrôle (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 2 mM CaCl_2 , 6 mM Glucose, 25 mM HEPES-NaOH, 1 μM TTX, 1 μM Strychnine, 20 μM Bicuculine Methiodide, 1 mM MgCl_2) pendant 10 minutes. Puis, la LTP chimique était induite pendant 3 minutes par la solution de stimulation (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 2 mM CaCl_2 , 6 mM Glucose, 25 mM HEPES-NaOH, 1 μM TTX, 1 μM Strychnine, 20 μM Bicuculine Methiodide, 0,1 mM glycine). Ensuite, les neurones étaient remis en présence de leur milieu conditionné pendant 60 min, et fixés à la PFA pour suivre un protocole d'immunofluorescence.

Immunofluorescence

Les cellules étaient rincés avec du PBS et fixés avec 4% de PFA, suivi d'un blocage dans du PBS avec 10% de Normal Goat Serum (NGS, Life Technologies) avant d'être incubés avec les anticorps primaires dilués dans 5% de NGS. Les anticorps utilisés en immunofluorescence sont les suivants : PKA-C α (1:100, polyclonal, Cell Signaling Technology) GM130 (1:500, monoclonal, BD Biosciences), TGN38 (1:50, monoclonal, BD Transduction Laboratories), Furine (1:250, monoclonal, Santa-Cruz Biotechnologies), Calnexin (1:50, monoclonal, Sigma), mCherry (1:2000, monoclonal, Abcam), mCherry (1:2000, polyclonal, Plateforme Anticorps, Institut Curie), GFP (1:1000, chicken polyclonal, Abcam), GFP (1:500, polyclonal, Plateforme Anticorps, Institut Curie), myc (1:300, chicken polyclonal, Abcam), myc (1:100, polyclonal, Santa Cruz Biotechnologies), MAP2 (#211 souris 1:500), N-Cad (polyclonal, Sigma).

Pour les immunofluorescences où la PKA du Golgi était observée, un traitement avec 0.05% de saponine pendant 30 secondes était ajouté au protocole avant la fixation.

Les images de colocalisation de protéines au niveau de l'appareil de Golgi étaient acquises avec un objectif 63x à immersion à huile (1.4 NA) grâce à un microscope confocal inversé (LSM 710, Zeiss) couplé à un détecteur Airyscan pour améliorer le ratio signal/bruit. Chaque image consistait en un empilement d'images acquises sur le plan z de la cellule. Les images de Golgi-Cox étaient acquises avec un objectif 20x longue distance à l'aide d'un microscope inversé (Axio Observer, Zeiss) couplé à un système confocal à spinning-disk (CSU-W1-T1, Yokogawa). Les images d'épines dendritiques après cLTP étaient acquises sur le Spinning-Disk avec un objectif 63x à immersion à huile. Les paramètres des microscopes étaient maintenus pour tous les scans d'une même expérience.

Analyse des épines dendritiques

Pour l'analyse des épines dendritiques, le programme ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) était utilisé. Les épines étaient classées selon leur morphologie dans les catégories suivantes : (1) Stubby : bourgeonnement en cours d'une épine, sans cou défini, (2) Thin : épines avec un long cou et une petite tête visible, (3) Mushroom : grosses épines avec un cou bien défini et une tête très volumineuse.

Spectrométrie de masse

Les échantillons ont été fournis sous forme de bande de gel (proBDNF-mCh exprimée dans HEK avec ou sans co-transfection par Akt). Ces échantillons ont été obtenus après immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-mCh. Les bandes ont subi un protocole d'alkylation à l'iodoacétamide (protocole robotisé 8/09/2015). Chaque bande a été digérée à la chymotrypsine (150ng) sur la nuit à 25°C. Le lendemain matin, 150ng de chymotrypsine ont de nouveau été ajoutés pour 1h. Les peptides issus de la digestion sont extraits des bandes de gel par une extraction acide et en solvant organique. 10% de cet extrait a été séché et repris dans 15µl de tampon (2% acétonitrile 0.2% acide formique) pour analyse LC-MS/MS tel quel. Les 90% restant ont été séchés pour être ensuite enrichis sur billes de TiO₂ en peptides phosphorylés. Après enrichissement les peptides ont été dessalés et séchés puis repris dans 15 µL de tampon pour analyse LC-MS/MS

Analyses LC-MS/MS : Injection de 5 µL. Séparation des peptides sur système NCS2 (UltiMate™ 3000 RSLCnano, Thermo®) selon leur hydrophobie (colonne PepMap C18 2µm 100A (75µm x 250mm)) par un gradient de 60 min ; analyse des peptides par MS et MS/MS sur un système QExactive + (Thermo®) : pour un scan FTMS, 10 précurseurs sont sélectionnés avec fragmentation en MS₂ dans la cellule HCD.

Gradient LC utilisé : 70min_µLPickup_4-12-30-40_MS TiO₂: Instrument method : Top10_HCD_70k_300-2000_70min_excl20s_1.6kV_HIGHSENSI_LOCK All : Instrument method : Top10_HCD_70k_300-2000_70min_excl20s_1.6kV_LOCK

Électrophysiologie

Les souris étaient disloquées et immédiatement décapitées. Leurs hippocampes étaient disséqués et des tranches transversales de 400 µm d'épaisseur étaient coupées avec un vibratome Leica VT1200 dans une solution glacée contenant les éléments suivants (en mM) : 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 10 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 26NaHCO₃, 234 sucrose, et 11 glucose, saturée avec 95% d'O₂ et 5% de CO₂. Après la dissection, les tranches étaient conservées dans du CSF

artificiel (ACSF) composé de (en mM) : 119 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, et 11 glucose à une température de 30°C pendant au moins 1 h.

Les tranches étaient visualisées dans une chambre sur un microscope droit avec illumination transmise et perfusées en continu à 1 mL/min avec le même ACSF oxygéné à 22-25°C. Des électrodes de stimulation (microélectrodes bipolaires) étaient placées dans le stratum radiatum pour stimuler la voie collatérale de Schaffer. Les EPSP de champ (fEPSPs) étaient enregistrés dans la couche radiale à l'aide d'une pipette en verre d'enregistrement remplie d'ACSF. Les signaux étaient acquis en utilisant un double amplificateur EPC 10 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Allemagne) et enregistrés avec le logiciel Patchmaster (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Allemagne). La pente initiale des fEPSPs était mesurée pour éviter les faux positifs.

Pour les expériences d'entrée/sortie (input/output), des courbes étaient construites pour évaluer la réactivité des réponses dépendantes du sous-type de récepteur du glutamate AMPA à la stimulation électrique. La pente des pentes de fEPSPs était tracée en fonction de l'intensité de la stimulation (10 à 100 μ A).

Pour les expériences de paired-pulse, les collatérales de Schaeffer étaient stimulés de façon répétitive par deux stimuli de même intensité, séparés par des intervalles de temps différents. Le rapport de paired-pulse était calculé en mesurant le rapport de la réponse pour le second stimulus par rapport à la réponse pour le premier stimulus.

Pour les expériences LTP, des stimuli de test (largeur d'impulsion de 0,2 ms) étaient délivrés une fois toutes les 15 s et l'intensité du stimulus était réglée pour donner des pentes de fEPSP de référence qui étaient 50% des pentes maximales évoquées. Le protocole pour la stimulation par thêta-burst était de 10 trains de 4 impulsions à 100 Hz (espacés de 200 ms).

Analyses des données

Toutes les analyses et statistiques étaient effectuées avec le logiciel Prism 6 (GraphPad, Software Inc., San Diego, CA, USA). L'effet du génotype sur le clivage (BDNF-mCh, S130A-mCh, S130D-mCh) a été analysé par One-Way ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey. L'effet du génotype et du temps sur le clivage de BDNF et des phospho-mutants a été analysé par Two-Way ANOVA. L'effet du temps et de la lactacystine sur le clivage de BDNF a été analysé par Two-Way ANOVA pour chacun des génotypes. L'effet du génotype et de la furine sur le clivage de BDNF a été analysé par Two-Way ANOVA suivie d'un test post-hoc de Bonferroni. Les expériences d'électrophysiologie ont été analysées par des tests non-paramétriques. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm erreur-type de la moyenne (SEM). Les résultats étaient considérés comme statistiquement significatifs lorsque la valeur p était inférieure à 0.05.

Chapitre 3 : Résultats

La phosphorylation de BDNF au site S130 régule la plasticité synaptique

I Introduction

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor) est une protéine qui joue un rôle essentiel dans la survie et la différenciation des neurones, ainsi que dans l'induction et l'expression de la plasticité synaptique (Deinhardt and Chao, 2014; Lu et al., 2005). C'est une protéine d'importance fondamentale puisque son knock-out est létal (Ernfors et al., 1994). En effet, ces souris ne survivent pas après trois semaines, ce qui correspond au pic d'expression de BDNF (Dincheva et al., 2016). De plus, elles ont un cerveau environ deux fois plus petit et la potentialisation à long terme est altérée dans l'hippocampe (Patterson et al., 1996). Ces observations suggèrent un rôle important dans la survie neuronale et la plasticité synaptique. Le BDNF est également très exprimé à l'âge adulte et la réduction de son expression est impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives et troubles psychiatriques (Anastasia and Hempstead, 2014). Son action sur la plasticité synaptique est majeure pour la mise en place de fonctions cognitives et pour la mise en place de la mémoire (Bekinschtein et al., 2008; Egan et al., 2003).

Le BDNF existe sous deux formes ayant des fonctions opposées, ces observations ont conduit la théorie du Yin et du Yang de BDNF (Lu et al., 2005). En effet, le BDNF est synthétisé en tant que molécule précurseur, le proBDNF, qui a des effets négatifs « Yin ». Par sa liaison au récepteur $p75^{NTR}$, le proBDNF favorise l'apoptose, la rétraction dendritique et la dépression à long-terme. Au contraire, la forme clivée, le BDNF mature (mBDNF) se lie préférentiellement au récepteur TrkB qui active les voies de signalisation de survie cellulaire, de différenciation et de potentialisation à long terme, on parle alors d'effets positifs ou « Yang ». Le clivage de BDNF joue donc un rôle capital dans sa fonction. Il est généralement admis que le proBDNF est clivé en mBDNF de façon intracellulaire dans le Golgi ou par la pro-protéine convertase 1/3 dans les vésicules de sécrétion (Mowla et al., 2001; Seidah et al., 1996). Le proBDNF n'ayant pas été clivé dans la cellule peut être sécrété et est rapidement clivé par la plasmine ou les métalloprotéases de matrice (MMP7) (Lee et al., 2001). Cependant, les mécanismes de régulation du clivage restent à être élucidés. Par leurs rôles diamétralement opposés, le BDNF mature et le proBDNF permettent une régulation fine de la survie et la différenciation des neurones et leur plasticité synaptique en

fonction de l'activité neuronale (Lu et al., 2014; Yang et al., 2014). Le clivage protéolytique du proBDNF contrôle l'équilibre entre la forme pro- et la forme mature du BDNF, et par conséquent, son action (Lu et al., 2005). Peut-être parce que BDNF joue autant de rôles importants dans la fonction neuronale, son expression et son action sont extrêmement régulées dans le temps et dans l'espace. Par exemple, le gène codant BDNF a une structure complexe, il est composé de 9 exons qui génèrent des transcrits dont la distribution est différente dans les tissus et au sein des cellules et qui peuvent être régulés par l'activité (Martinowich et al., 2011). De plus, ces ARN messagers peuvent être transportés le long des dendrites et être traduits localement au niveau des épines dendritiques (Leal et al., 2014). Le transport de BDNF selon les voies de sécrétions régulées et constitutives ajoute un niveau de régulation à sa fonction. Ces modes de régulation modifient la quantité de BDNF disponible. La régulation du clivage pourrait représenter une voie de régulation supplémentaire de la fonction de BDNF en modifiant plutôt la « qualité » de BDNF, c'est-à-dire le ratio entre les formes matures et pro. Cependant, si les enzymes de conversion du BDNF sont bien connues, les mécanismes de régulation du clivage ne sont pas encore bien compris.

Nous montrons ici un nouveau mécanisme de régulation de la maturation de BDNF via une phosphorylation qui impacte directement la balance fonctionnelle. En effet, nous montrons que la phosphorylation du résidu S130, localisé à l'interface entre le pro-domaine et le domaine mature, diminue l'efficacité du clivage du BDNF par la furine, régulant ainsi l'équilibre entre les formes immature et mature. Cette phosphorylation au site S130 est catalysée par les ectokinases FJX1 et FAM69B qui peuvent interagir avec BDNF dans la voie sécrétoire. De plus, grâce à l'utilisation de souris transgéniques knock-in phospho-mutantes, nous montrons que la phosphorylation de BDNF, en favorisant la forme proBDNF, inhibe la potentialisation à long-terme dans des tranches hippocampiques et diminue la dynamique de maturation des épines dendritiques au cours de la plasticité synaptique.

Ces résultats révèlent ainsi une voie de régulation cruciale de la balance fonctionnelle de BDNF et suggèrent un rôle important de la phosphorylation S130 dans les processus d'apprentissage et de la mémoire.

II Résultats

II.A Le BDNF est phosphorylé à la sérine S130

Les modifications post-traductionnelles (PTMs) sont des modifications dynamiques qui sont souvent à l'origine de la régulation de l'activité ou de la demi-vie d'une protéine (Cohen, 2001). Dans cette étude, nous nous sommes demandés si nous pouvions identifier des PTMs capables

de réguler le clivage de BDNF. Dans ce but, nous avons tout d'abord effectué un test de criblage de sites de PTMs putatifs à l'aide d'outils en ligne de prédictions *in silico* tels que Scansite 3 (Obenauer, 2003), GPS 3.0 (Xue et al., 2008) et NetPhos 3.1 (Blom et al., 2004). Parmi les différents sites putatifs, nous avons identifié le résidu sérine 130 (S130) qui présentait un score élevé pour être un site de phosphorylation et qui est situé dans le site de reconnaissance par les pro-convertases, entre les domaines pro et mature.

Afin de déterminer si le site S130 pouvait être phosphorylé, nous avons tout d'abord réalisé un test de phosphorylation *in vitro* à l'ATP- γ ³²P en utilisant une kinase recombinante générique (forme active de Akt) incubée soit avec un peptide synthétique couvrant le site S130 (MSMRVRRHSDPA), soit un peptide dans lequel la sérine 130 a été mutée en alanine non phosphorylable (MSMRVRRHADPA) (**Figure 25A**). Le dosage radioactif au ³²P a révélé que la séquence endogène S130 était capable d'être phosphorylée en présence de la kinase, contrairement à la forme mutée A130. Ces résultats suggèrent donc que la S130 est capable d'être phosphorylée par une kinase.

Nous avons ensuite cherché à identifier si la phosphorylation de BDNF au site S130 existait de façon endogène. Pour ce faire, nous avons tout d'abord transfecté un plasmide exprimant du BDNF pleine longueur de rat dans des cellules HEK. Après purification du BDNF et digestion à la chymotrypsine, les peptides ont été analysés par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) afin de détecter la présence de peptides phosphorylés. Nous avons ainsi confirmé l'existence d'un peptide contenant la sérine 130 avec un taux de phosphorylation de 10% par rapport à la quantité totale de BDNF présent dans le lysat (**Figure 25B**).

Nous avons ensuite produit un anticorps spécifique de phospho-S130-BDNF (anti-pS130) par immunisation de lapin par le peptide NH₂-C-SMRVRRH(pS)DPAR-CONH₂ et purification des anticorps produits par adsorption sur le peptide non phosphorylé NH₂-C-SMRVRRHSDPAR-CONH₂. Le sérum ainsi purifié détectait le BDNF-mCh exprimé dans des cultures primaires de neurones corticaux mais pas les formes mutantes S130A-mCh ou S130D-mCh dans lesquelles la Sérine 130 est mutée en Alanine (A) ou Acide Aspartique (D), respectivement (**Figure 25C**). Pour confirmer la phospho-spécificité de l'anticorps, du BDNF taggé avec la protéine fluorescente mCherry (BDNF-mCh) a été purifié par immunoprécipitation à partir de neurones corticaux en culture et a été incubé *in vitro* avec de la λ -phosphatase, ce qui a entraîné spécifiquement la perte de signal de l'anticorps phospho-S130-BDNF mais pas du BDNF total (**Figure 25D**). Enfin, nous avons vérifié que le BDNF endogène pouvait être trouvé sous forme phosphoS130 en utilisant l'anti-pS130 sur des lysats d'hippocampe de souris (**Figure 25E**). Nous avons ainsi observé un

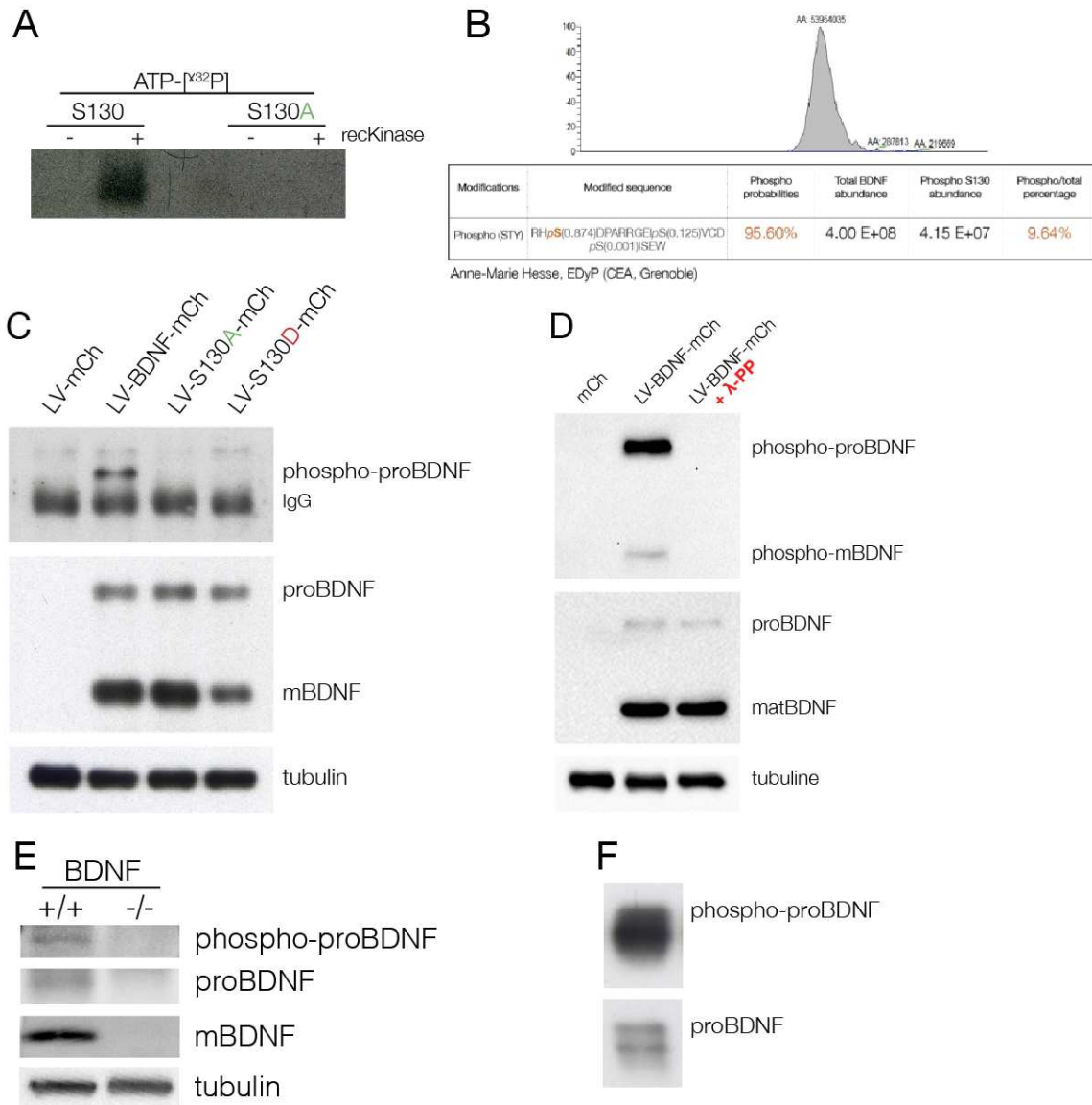


Figure 25. BDNF est phosphorylé à la sérine 130.

(A) Phosphorylation in vitro d'un peptide contenant la sérine 130 par une kinase recombinante. Phosphorylation du peptide MSMRVRRHSDPA (S130) en présence de la kinase recombinante, mais pas de signal détecté sur le peptide MSMRVRRHADPA (S130A). **(B)** Détection de phosphorylation sur la sérine 130 par spectrométrie de masse. Analyse des résidus phosphorylés par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) sur peptides issus de la purification et la digestion de BDNF. Les peptides phosphorylés contenant la sérine 130 représentaient 9.64% des peptides couvrant ce résidu. **(C)** Spécificité de l'anticorps phospho-S130-BDNF pour la sérine 130. Détection de BDNF-mCh pleine longueur par l'anticorps anti phospho-S130-BDNF (pS130), mais pas des mutants S130A-mCh et S130D-mCh. L'anticorps anti-BDNF (3C11) montre la présence de proBDNF et BDNF mature (mBDNF). Les échantillons étaient enrichis en BDNF-mCh, S130A-mCh ou S130D-mCh exprimés par des neurones de cortex à DIV7 par immunoprécipitation, ce qui explique la présence de chaînes lourdes d'immunoglobuline (IgG). **(D)** Phospho-spécificité de l'anticorps pS130. Perte du signal phospho après traitement à la λ -PP de BDNF-mCh exprimé par des neurones de cortex à DIV3 après immunoprécipitation. L'anticorps anti-BDNF (3C11) montre la présence de proBDNF et BDNF mature (mBDNF). **(E)** Spécificité de l'anticorps phospho-S130-BDNF pour BDNF. Détection de phospho-BDNF pleine longueur par l'anticorps pS130 à partir de lysats d'hippocampes de souris contrôles, mais pas de souris KO BDNF à P10. BDNF était enrichi par immunoprécipitation avec l'anticorps anti-BDNF (3C11, Icosagen). Détection de proBDNF par l'anti-BDNF (N20) et de mBDNF par l'anti-BDNF (3C11). **(F)** Présence de BDNF endogène phosphorylé dans des neurones corticaux en culture. Analyse de lysats de neurones de cortex en culture à DIV7, enrichis par immunoprécipitation avec l'anticorps anti-BDNF (3C11). Détection de proBDNF phosphorylé par l'anticorps pS130 et de proBDNF par l'anticorps anti-BDNF (N20)

phospho signal spécifique de BDNF puisque aucune bande n'a pu être détectée dans l'hippocampe de souris BDNF knock-out. L'anti-pS130 était aussi capable de détecter du BDNF phosphorylé endogène dans des cultures primaires de neurones corticaux non transfectés (**Figure 25F**).

L'ensemble de ces données indique donc l'existence d'une forme endogène de BDNF phosphorylée au site S130 dans les neurones en culture et dans le cerveau de souris. Ces résultats permettent également de valider l'anti-pS130 comme outil sélectif pour détecter la forme phosphorylée de BDNF *in vitro* et *in vivo*.

II.B BDNF est phosphorylé par des ectokinases neuronales

Nous avons ensuite cherché à identifier les kinases responsables de la phosphorylation de BDNF au site S130. BDNF appartenant à la voie de sécrétion peptidique, nous nous sommes concentrés sur les familles de kinases extracellulaires, sécrétées et/ou résidentes de l'appareil de Golgi. Parmi les candidats potentiels, nous avons sélectionné trois ectokinases : FAM20C (family with sequence similarity 20) qui constitue le prototype de la famille et qui est la mieux caractérisée (Tagliabracci et al., 2012), FJX1 (Four-Jointed Box 1) qui est exprimé dans le cerveau adulte, notamment au niveau de l'hippocampe et qui joue un rôle dans la différenciation neuronale (Ashery-Padan et al., 1999; Probst et al., 2007), et FAM69B (family with sequence similarity 69B) qui est également fortement exprimé dans l'hippocampe et qui a été associé à des troubles neurologiques (Tennant-Eyles et al., 2011).

Les plasmides de ces 3 candidats ont été exprimés dans des neurones en culture et leur localisation subcellulaire a été étudiée. Des résultats préliminaires confirment que les 3 ectokinases sont fortement exprimées dans la voie sécrétoire neuronale (i.e. appareil de Golgi, réseau trans-golgien et vésicules à cœur dense) et colocalisent avec BDNF (résultats préliminaires en cours). Nous avons ensuite étudié leur capacité à phosphoryler du BDNF-mCh co-transduit grâce à l'anticorps pS130 (**Figure 26**). Nous avons ainsi observé que seuls FJX1 et FAM69B sont capables de phosphoryler BDNF. Grâce à des expériences de co-immunoprécipitation nous sommes désormais en train d'étudier si FJX1 et FAM69B sont capables d'interagir directement avec BDNF (expériences en cours).

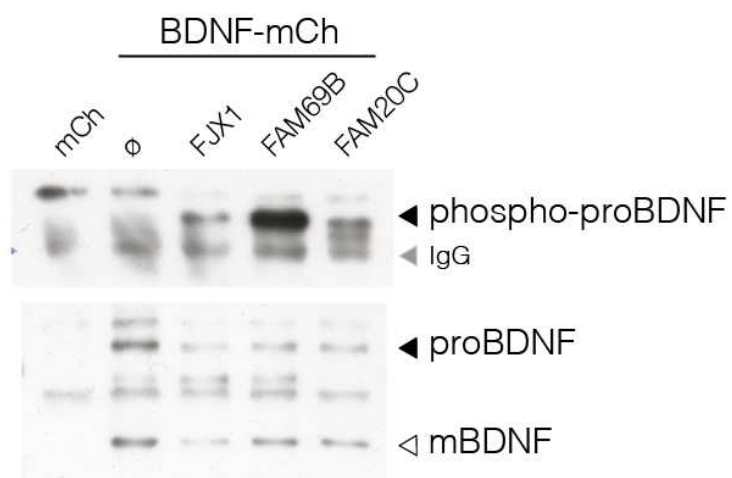


Figure 26. Phosphorylation de BDNF par les ectokinases FJX1 et FAM69B

Co-expression de BDNF-mCh et FJX1, FAM69B ou FAM20C dans des neurones de cortex en culture jusqu'à DIV7 et immunoprécipitation de BDNF-mCh par l'anticorps anti-BDNF (3C11). Augmentation de la phosphorylation de proBDNF en présence de FJX1 et de FAM69B, mais pas de FAM20C.

II.C La phosphorylation de S130 régule le clivage de BDNF par la furine

Nous avons ensuite étudié l'effet de la phosphorylation de la sérine 130 sur la maturation du proBDNF en BDNF mature. Tout d'abord, nous avons transduit des cultures de neurones de cortex avec des lentivirus exprimant des phosphomutants de BDNF taggés avec la protéine fluorescente mCherry : le mutant S130A dans lequel la sérine 130 est remplacée par un résidu Alanine est non phosphorylable, tandis que le mutant S130D dans lequel la sérine 130 est remplacé par un résidu Aspartate (D) mime une phosphorylation constitutive. Nous avons ainsi observé que les ratios entre la forme mature mBDNF et la forme proBDNF étaient affectés de façon opposée (**Figure 27A**). En effet, alors que le ratio de mBDNF/BDNF total est d'environ 60% dans la condition contrôle, il est augmenté à plus de 80% dans la condition S130A non phosphorylable, et diminué à moins de 40% dans la condition S130D, mimant une phosphorylation constitutive.

Nous avons ensuite testé l'évolution du clivage de BDNF au cours du développement et de la maturation de la culture neuronale dans les différentes conditions de phosphorylation S130 (**Figure 27B**). Nous avons trouvé que le ratio de mBDNF/BDNF total augmente progressivement dans la condition contrôle, passant de 50% après 4 jours en culture (DIV4) à presque 100% à partir de DIV14. Cette évolution est significativement altérée dans les conditions phospho-mutants. En effet, le ratio mBDNF/BDNF total est déjà de 80% à DIV4 et atteint 100% de forme mature dès DIV7, ce qui suggère une facilitation du clivage de S130A. A l'inverse ce clivage est fortement ralenti lorsque le BDNF est muté en S130D, avec un ratio de seulement 40% à DIV7 (contre 75% pour le BDNF contrôle) et qui n'atteint que 80% même après 21 jours en culture. Afin de vérifier que les changements de ratio ne sont pas dus à des changements de dégradation ou protéolyse d'une forme ou l'autre, nous avons répété la même expérience en présence ou non de lactacystine, un inhibiteur du protéasome. Comme le montre la **Figure 27C**, aucune différence dans l'évolution des ratios de mBDNF/BDNF total n'a pu être observée entre le BDNF et les phospho-mutants.

Nous avons ensuite testé si la phosphorylation de BDNF par FJX1 ou FAM69B pouvait influencer l'efficacité de clivage. Pour ce faire, des neurones de cortex en culture ont été transduits avec des lentivirus exprimant BDNF-mCh ou la forme non phosphorylable S130A-mCh en présence ou non des ectokinases. Nos résultats préliminaires montrent ainsi que FJX1 et FAM69B altèrent la balance mature/proBDNF en empêchant le clivage sur le BDNF contrôle (résultats préliminaires en cours). Afin de montrer l'importance de la phosphorylation par les ecto-kinases, nous sommes actuellement en train de tester si FAM69B ou FJX1 ont un effet sur le mutant S130A-mCh.

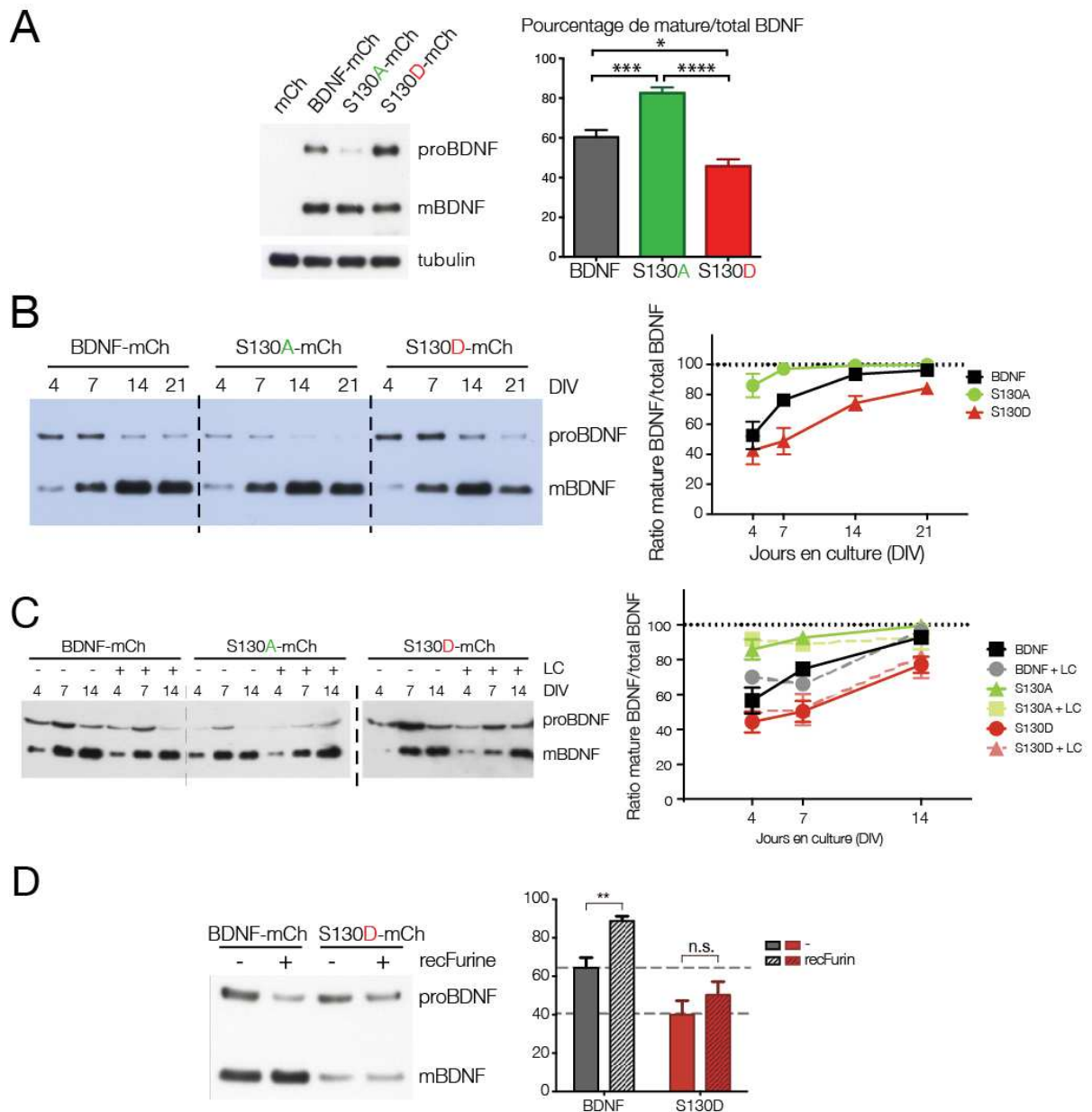


Figure 27. Modification du clivage de BDNF en fonction de la phosphorylation

(A) Modification de taux de clivage de BDNF en fonction de l'état de phosphorylation de BDNF. Variation du ratio de BDNF mature par rapport au BDNF total exprimé dans des neurones corticaux à DIV6. One-Way ANOVA et test Tukey, génotype, $F(2,27) = 31.04$, $p < 0.0001$. Augmentation du ratio mBDNF/BDNF total avec le mutant S130A-mCh et diminution de ce ratio avec le mutant S130D-mCh par rapport au contrôle BDNF-mCh $n = 10$.

(B) Évolution du taux de clivage de BDNF au cours de la maturation neuronale en fonction de l'état de phosphorylation de BDNF. Ratio de BDNF mature par rapport au BDNF total exprimé dans des neurones corticaux à différents jours de culture (DIV4, 7, 14 et 21). Two-way ANOVA : temps, $F(3,27) = 21.39$, $p < 0.0001$; génotype, $F(2,9) = 39.35$, $p < 0.0001$; $n = 4$.

(C) Le blocage du protéasome n'affecte pas les ratios de BDNF pro et mature. Incubation avec de la lactacystine (LC) qui bloque le protéasome. Le ratio de BDNF ou des mutants n'est pas changé par la lactacystine. Two-way ANOVA : BDNF : temps, $p < 0.001$; lactacystine, n.s. ; S130A : temps, n.s. ; lactacystine, n.s. ; S130D : temps, $p < 0.01$; lactacystine, n.s. ; $n=2$.

(D) Effet de la furine sur le clivage de BDNF.

Effet de la furine recombinante (recFurine) sur le ratio mBDNF/BDNF total. Le ratio de BDNF-mCh est augmenté après 1 heure d'incubation avec 2 unités de furine (Two-Way ANOVA ; furine, $F_1 = 40.41$, $p < 0.001$) mais le ratio reste inchangé pour S130D (furine, n.s.). Analyse statistique par Two-Way ANOVA suivie d'un test post-hoc de Bonferroni. $n = 5$. n.s. = non significatif, ** = $p < 0.01$.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la phosphorylation de la sérine 130 par les ectokinases gêne ou ralentit le clivage de BDNF, favorisant ainsi la production et la sécrétion de proBDNF par le neurone.

Le long de la voie sécrétoire, le BDNF est clivé par des proconvertases telles que la furine (Mowla et al., 1999). Nous avons donc étudié l'influence de la phosphorylation au site S130 sur l'efficacité de clivage du BDNF par la furine. Des neurones de cortex ont ainsi été transduits avec un lentivirus exprimant du BDNF-mCh ou du S130D-mCh pendant 5 jours (afin d'obtenir un ratio de clivage endogène bas) avant de procéder à un test de clivage *in vitro* en utilisant une furine recombinante. Après une heure en présence de furine recombinante, le BDNF-mCh contrôle était significativement clivé (avec un ratio passant de 60% à 90%) contrairement au S130D-mCh (avec un ratio de 40% passant à 50%) (**Figure 27D**).

Ces données indiquent donc que la phosphorylation de BDNF au site S130 serait capable de ralentir le clivage de proBDNF par la furine.

Nous sommes désormais en train de tester si l'interaction entre le BDNF et la furine est affectée par la présence de la phosphorylation sur S130 grâce à des expériences de co-immunoprécipitation entre la furine et les variants de BDNF S130 (expériences en cours).

II.D La phosphorylation de BDNF S130 régule la plasticité morphologique et anatomique de l'hippocampe

La production privilégiée de la forme mature ou immature du BDNF conditionne le rôle permissif ou inhibiteur, respectivement, de BDNF sur des fonctions neuronales cruciales telles que la plasticité synaptique et la différenciation neuronale (Bramham and Messaoudi, 2005). Afin d'étudier les conséquences fonctionnelles de la phosphorylation S130, nous avons généré deux lignées de souris knock-in S130 (S130A et S130D) par la technique de CRISPR-Cas9. Après vérification, aucun site hors cible n'a été détecté. De plus, les mutations ponctuelles ne sont pas létales, les souris atteignent l'âge adulte et sont capables de se reproduire. Aucun déficit évident (anatomique, reproductif ou comportemental) n'a pu être détecté.

Ces souris sont actuellement en cours de caractérisation biochimique afin de confirmer l'absence de signal phosphoS130 dans les souris mutantes. Le ratio mature/proBDNF dans le cerveau, et

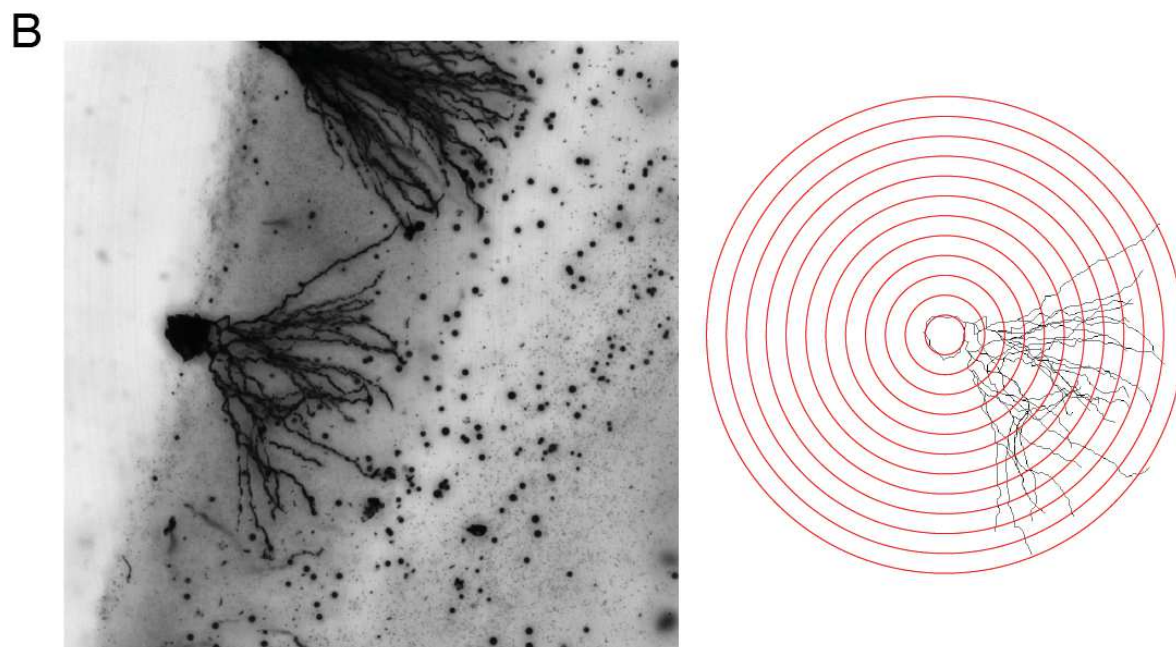
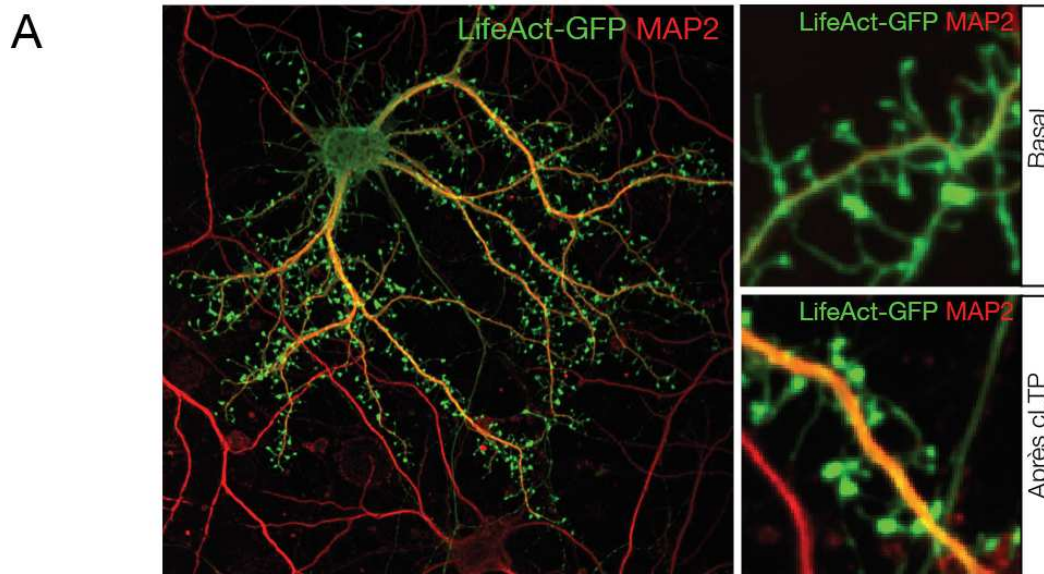


Figure 28. Influence de la phosphorylation de BDNF sur la structure et la fonction de l'hippocampe.

(A) Induction de la plasticité synaptique par stimulation chimique. Images représentatives de neurone de cortex en culture immunomarcqué avec LifeAct-GFP et MAP2. A droite, images représentatives d'épines dendritiques en basal ou stimulées par le protocole de cLTP (pour *chemical Long-Term Potentiation*). Le nombre d'épines leur morphologie sont actuellement en cours d'analyse sur des neurones hippocampiques de souris KI-S130A, KI-S130D et contrôles. **(B)** Étude de la morphologie des neurones granulaires du gyrus denté. Marquage des neurones hippocampiques des cerveaux de souris KI-S130A, KI-S130D et contrôles de 3,5 mois. **(gauche)** Image d'un neurone granulaire du gyrus denté marqué par technique de Golgi-Cox **(droite)** Tracé de ce neurone à l'aide du plugin Simple Neurite Tracer de Fiji (Ferreira et al., 2014). L'analyse de la morphologie (Sholl) de ces neurones ainsi que de la densité d'épines dendritiques est en cours.

plus spécifiquement dans le cortex et l'hippocampe, est également en cours d'analyse afin de vérifier l'influence du site S130 sur l'efficacité de clivage du BDNF *in vivo*.

Une composante importante du rôle de BDNF sur la régulation de la plasticité neuronale est représentée par la maturation et la dynamique des épines dendritiques. Ainsi, si le BDNF mature favorise le développement d'épines dendritiques, il permet également la transition des épines immatures (de type filopode) vers leur forme mature (de type « champignon ») après une activation neuronale soutenue (Kellner et al., 2014). A l'inverse, le proBDNF inhibe la formation de nouvelles épines et maintient les anciennes épines sous leur forme immature (Zagrebelsky et al., 2005). Pour tester l'influence de phosphoS130 sur la formation et la plasticité des épines dendritiques, des neurones d'hippocampes de souris homozygotes KI-S130A, KI-S130D et contrôles ont été mis en culture (**Figure 28A**). L'analyse du nombre total d'épines dendritiques et de leur plasticité après stimulation chimique (protocole de cLTP pour *chemical Long-Term Potentiation*) est toujours en cours. Les résultats préliminaires semblent déjà indiquer un nombre plus important d'épines immatures de type filopodes et une plasticité altérée dans les souris KI-S130D par rapport aux neurones contrôles (résultats préliminaires en cours). Ces résultats préliminaires semblent suggérer que la phosphorylation de BDNF endogène empêche la maturation des épines dendritiques des neurones de l'hippocampe et joue un rôle inhibiteur de la plasticité synaptique.

Nous sommes également en train de tester les conséquences morphologiques et anatomiques de la phosphorylation du BDNF sur des souris adultes en analysant la complexité dendritique et la densité synaptique des neurones du gyrus denté de l'hippocampe de souris KI-S130A, KI-S130D et de leur contrôles respectifs (**Figure 28B**). Le volume total du cerveau ainsi que le volume de structures spécifiques, telles que le cortex et l'hippocampe, sont également en cours d'analyse par stéréologie (expériences en cours).

II.E La phosphorylation de la sérine 130 de BDNF est critique pour la LTP hippocampique

Le BDNF est connu pour jouer un rôle opposé sur la plasticité à long terme en fonction de la forme prédominante pro ou mature qui est sécrétée (Lu et al., 2005). Récemment Yang et al (Yang et al., 2014) ont montré que l'expression endogène de proBDNF non clivable empêchait l'induction de la potentialisation à long terme au niveau des cellules pyramidales du CA1 après une stimulation thêta-burst des collatérales de Schaeffer. Afin de tester si la phosphorylation de S130 pouvait altérer la mise en place d'une LTP dans le CA1, des tranches d'hippocampes de

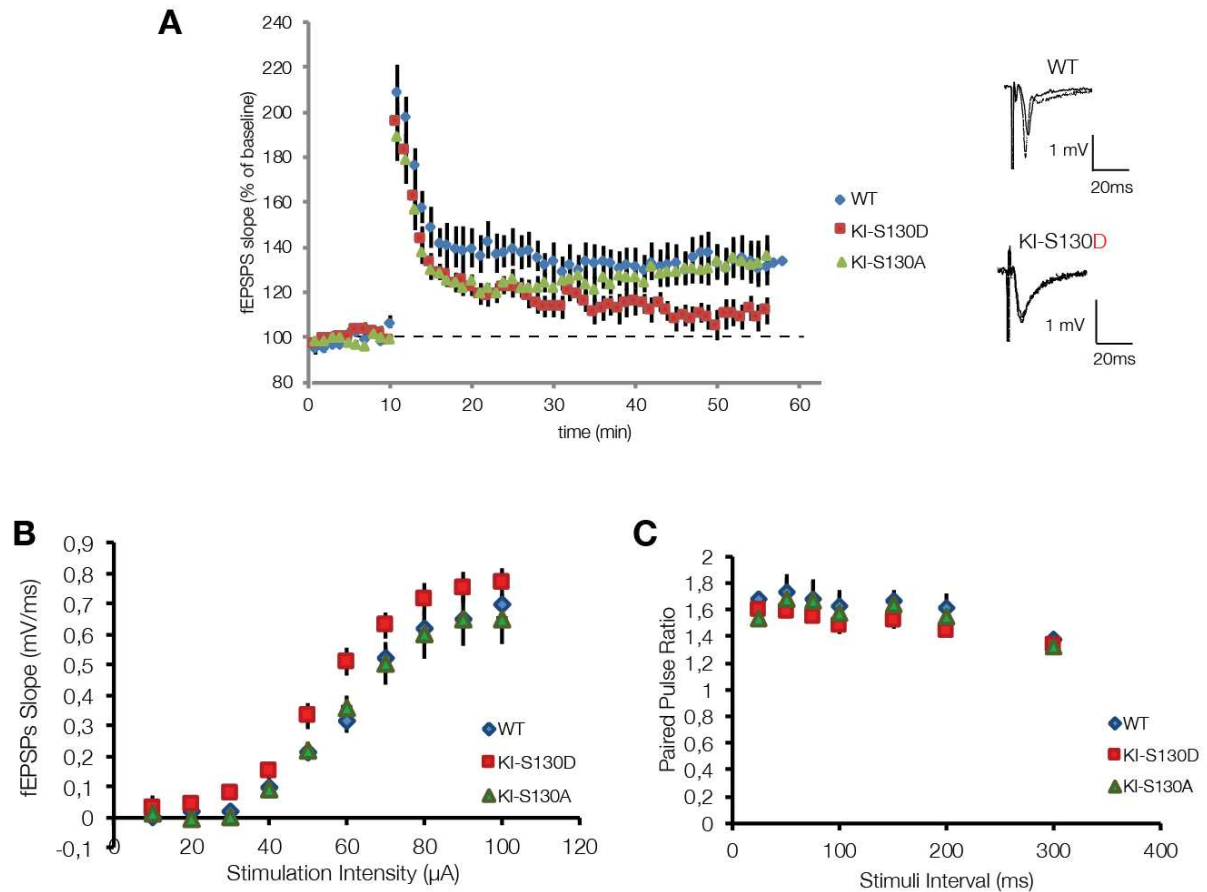


Figure 29. Analyse de la transmission synaptique et de la plasticité synaptique à court et à long terme.

(A) Expériences de potentialisation à long terme (LTP) au niveau des synapses entre les collatérales de Schaeffer et les cellules pyramidales du CA1. Un protocole de stimulation en θ -burst induisait une augmentation à long terme de la pente des potentiels post-synaptiques excitateurs (fEPSP) dans les tranches de souris contrôles ($132,10 \pm 9,9\%$; $n = 8$ tranches). La LTP induite par la même stimulation est significativement réduite chez les souris KI-S130D ($111,73 \pm 5,7\%$; $n = 8$ tranches) mais pas chez les souris KI-S130A ($136,75 \pm 8,5\%$; $n = 7$ tranches). (B) Transmission synaptique basale. Les courbes de stimulation-réponse correspondant aux réponses synaptiques des collatérales de Schaeffer ont été générées en analysant la pente des fEPSP en fonction de l'intensité de stimulation dans des tranches hippocampiques de souris contrôles ($n = 10$ tranches), de souris KI-S130D ($n = 10$ tranches) et de souris KI-S130A ($n = 9$ tranches). (C) La Paired-Pulse Facilitation de la transmission des collatérales de Schaeffer n'est pas changée chez les souris KI-S130D ($n = 10$ tranches), ni chez les souris KI-S130A ($n = 9$ tranches) en comparaison de celle des souris contrôles ($n = 9$ tranches).

souris contrôles, KI-S130A et KI-S130D ont été obtenues et une stimulation thêta-burst a été appliquée (**Figure 29A**). Nous avons ainsi observé que l'amplitude de la réponse était significativement réduite 45 minutes après la stimulation chez les souris KI-S130D ($111,73 \pm 5,7\%$) par rapport aux souris contrôles ($132,10 \pm 9.9\%$). De façon surprenante, aucune différence n'a été mesurée chez les souris KI-S130A ($136,75 \pm 8,5\%$), suggérant un potentiel effet de plateau maximum de l'induction de la LTP dans le CA1.

Des changements dans l'induction et la maintenance de la LTP peuvent être expliqués par une transmission synaptique de base altérée. Afin d'établir une relation stimulation-réponse dans les neurones du CA1, nous avons mesuré la pente moyenne des potentiels post-synaptiques excitateurs (fEPSP) en fonction de l'intensité de stimulation chez les souris contrôles, KI-S130A et KI-S130D (**Figure 29B**). Aucune différence n'a pu être observée entre les trois groupes de souris, suggérant que la transmission synaptique basale n'est pas affectée par la mutation. De même, la plasticité à court-terme mesurée avec un protocole de paired-pulse n'a pas permis de détecter de modification significative du ratio de paired pulse chez les animaux S130A ni les S130D par rapport à leurs contrôles respectifs (**Figure 29C**).

L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle spécifique de la phosphorylation de BDNF dans la régulation de la plasticité à long terme, et plus spécifiquement dans la maintenance de la LTP hippocampique. Ces résultats sont en accord avec le rôle inhibiteur de la LTP de la forme proBDNF (Yang et al., 2014).

II.F La phosphorylation de BDNF régule-t-elle l'apprentissage et la mémoire ?

La LTP hippocampique étant considérée comme le substrat moléculaire sous tendant la formation de la mémoire (Bliss and Collingridge, 1993), nous sommes actuellement en train de tester si les souris S130A et S130D ont des déficits d'apprentissage et de mémoire. Nous avons sélectionné trois tests rendant compte des performances mnésiques des souris, qui seront effectués dans l'ordre du moins stressant au plus traumatisant. Nous conduirons ces expérimentations sur au moins 15 souris mâles de chaque génotype lorsqu'elles auront 7 mois. La cohorte étant en cours de développement, les tests ne pourront être effectués qu'à partir d'octobre 2018.

Dans un premier temps, nous évaluerons la mémoire à moyen terme grâce au test de reconnaissance d'objets nouveaux (NOR, **Figure 24A**). Ce test, basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer préférentiellement un nouvel objet par rapport à un objet familier permet d'estimer si la mémoire à court terme (quelques minutes) ou à moyen terme (plusieurs heures) est altérée (Lueptow, 2017; Tagliabata et al., 2009). **Résultats attendus** : Les souris qui n'expriment pas de BDNF dans l'hippocampe ne discernent pas le nouvel objet le lendemain de l'habituation (Heldt et al., 2007). De plus, la mémoire de reconnaissance des objets étant sensible à l'interruption de la LTP au niveau des synapses du CA1 de l'hippocampe (Clarke et al., 2010), nous pouvons faire l'hypothèse que les souris S130D, qui ont une LTP réduite, pourraient aussi avoir une déficience de reconnaissance des objets.

Nous évaluerons ensuite l'incidence de phosphoS130 sur la mémoire spatiale grâce au test de la piscine de Morris (MWM, Morris Water Maze, **Figure 24B**). Les souris KI-S130A, KI-S130D et leurs contrôles respectifs suivront un entraînement pendant 4 à 6 jours pour apprendre à repérer une plateforme cachée puis nous évaluerons le temps nécessaire à chaque génotype pour localiser la plateforme. **Résultats attendus** : Les souris BDNF^{+/-} ont un déficit de mémoire spatiale à partir de 9 mois (Petzold et al., 2015). De la même façon, les jeunes souris (4 à 10 semaines) dans lesquelles le BDNF n'est pas exprimé dans l'hippocampe ont un déficit de mémoire spatiale (Heldt et al., 2007). Au contraire, les performances des souris dans le test de la piscine de Morris sont améliorées par l'injection de BDNF dans l'hippocampe (Cirulli et al., 2004). Nous pouvons donc nous attendre à ce que les souris S130A, qui ont plus de BDNF mature, soient plus performantes que les S130D dans ce test qui auront sûrement des difficultés à apprendre et retenir la tâche.

Enfin, nous testerons les capacités d'acquisition et de rétention de la mémoire grâce au test de conditionnement contextuel de la peur (CFC, *Contextual Fear Conditioning*, **Figure 24C**). Ce test repose sur la capacité des souris à établir des associations entre divers éléments de leur environnement et la survenue d'événements marquants (Curzon et al., 2009). Après avoir associé un stimulus conditionné (CS, ce nouvel environnement) à un stimulus aversif (US, *unconditioned stimulus*, comme un choc électrique), les souris seront testées le jour suivant dans le même environnement à l'exception que les chocs électriques (US) ne seront pas administrés. Le temps passé en position figée sera mesuré. Les souris pourront éventuellement être réexposées un ou deux jours après le test initial afin de tester la réactivation de la mémoire déjà consolidée. En effet, l'absence de choc modifie le souvenir formé. Si les souris apprennent que ce CS n'est plus associé à l'US, alors elles ne vont plus se figer lorsqu'elles entendront le son. Cette deuxième

phase permettra de tester l'extinction de la mémoire. **Résultats attendus** : Le déficit de BDNF au niveau de l'hippocampe n'entraîne pas de modification de conditionnement à la peur. En revanche, l'extinction du conditionnement est altérée en l'absence de BDNF (Heldt et al., 2007). La protéolyse de proBDNF a été identifiée comme étant un régulateur clé de la formation de la mémoire. Le clivage de BDNF est critique pour l'acquisition de nouvelles informations ; alors que l'extinction de souvenirs acquis lors d'un conditionnement de peur contextuelle dépend de l'inhibition du clivage (Barnes and Thomas, 2008; Kirtley and Thomas, 2010). En effet, l'inhibition du clivage de proBDNF potentialise l'extinction de la mémoire suite à une réactivation, alors qu'un niveau élevé de mature restreint cette extinction (Radiske et al., 2015). Il sera intéressant d'observer si les souris S130D sont capables d'oublier un événement plus rapidement que les souris contrôles, et si au contraire, les souris S130A ont des difficultés à oublier un événement stressant.

CONCLUSION

Le BDNF joue un rôle clef dans la régulation de la survie, de la différenciation et de la plasticité synaptique par son action dichotomique due à l'existence de deux isoformes aux fonctions opposées. Grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique de la phosphorylation de la sérine 130 de BDNF, nous montrons l'existence d'une phosphorylation *in vitro* et *in vivo*, au niveau de la séquence de clivage de BDNF qui régule sa maturation. En effet la phosphorylation de BDNF ralentit le clivage, ce qui conduit à la réduction du ratio mBDNF/proBDNF et donc à la production privilégiée de la forme immature de BDNF. Nous avons également identifié deux ecto-kinases capables de phosphoryler BDNF et d'impacter son clivage : FJX1 et FAM69B. Ces kinases atypiques sont encore peu étudiées mais pourraient avoir une importance décisive dans le développement ou encore dans la régulation dépendante de l'activité via la régulation de la maturation de BDNF.

Puisque BDNF est connu pour son rôle dans le remodelage des épines dendritiques et dans la mémoire, nous étudions actuellement les conséquences de la phosphorylation ou de l'absence de phosphorylation sur la plasticité synaptique et la morphologie des épines dendritiques. Nous avons déjà montré l'importance de la phosphorylation de S130 dans la maintenance de la LTP dans des tranches hippocampiques grâce à l'utilisation des souris knock-in S130. Des études comportementales seront effectuées pour étudier le lien entre phospho-BDNF et la mémoire.

Dans l'ensemble, ces résultats proposent un nouveau mécanisme de régulation des fonctions de BDNF en agissant directement sur l'efficacité du clivage du pro-domaine qui impacte le rôle de

BDNF sur la plasticité synaptique et la mémoire. Ces résultats seront discutés dans le *Chapitre 4 : Discussion et perspectives*.

Identification d'une exoPKA régulant la maturation de BDNF : Implications dans la régulation de la plasticité synaptique

III Introduction

Le BDNF est une protéine centrale dans de multiples fonctions du système nerveux central, allant de la différenciation et de la survie neuronale à la synaptogenèse et la plasticité synaptique dépendante de l'activité (Deinhardt and Chao, 2014; Lu et al., 2005). Le BDNF est initialement synthétisé sous forme de précurseur (proBDNF) puis est clivée pour produire du BDNF mature qui favorise la survie, la pousse neuronale, la plasticité synaptique et la mémoire via l'activation du récepteur TrkB. Au contraire, le proBDNF se lie au récepteur p75^{NTR} et a des effets biologiques opposés au BDNF mature. Le clivage est donc une étape clé qui contrôle l'action « positive » ou « négative » du BDNF sur les processus cellulaires. Dans une étude précédente, nous avons identifié un nouveau mécanisme de régulation du clivage de BDNF passant par une phosphorylation. Cette étude nous a amené à étudier les différentes kinases potentielles de BDNF.

La protéine kinase A est connue pour son rôle dans la plasticité. En effet, l'activation de PKA favorise la perméabilité des récepteurs NMDA et l'induction des synapses entre les collatérales de Schaeffer et le CA1 de l'hippocampe (Skeberdis et al., 2006). PKA active la voie MEK/ERK qui stimule la polymérisation d'actine et favorise la spinogénèse (Ikeda et al., 2015). PKA est une protéine cytosolique ubiquitaire dont la régulation spatiale est contrôlée par des protéines d'échauffage nommées A Kinase-Anchoring Protein (AKAP). L'AKAP150 maintient PKA au niveau des synapses et son altération conduit à une transmission synaptique altérée et des problèmes de rétention mnésique (Sanderson and Dell'Acqua, 2011; Tunquist et al., 2008).

Lors de la recherche de kinases potentielles de BDNF, nous avons effectué un criblage non biaisé de 245 Sérine/Thréonine kinases et nous avons identifié PKA comme étant la plus efficace *in vitro*.

Dans cette étude, nous montrons que PKA interagit directement avec BDNF et le phosphoryle au niveau de la sérine S130. Bien que PKA soit majoritairement connue pour être une protéine cytosolique, nous avons identifié une forme d'exoPKA qui pénètre dans la voie sécrétoire des neurones (réseau trans-golgien, vésicules à cœur dense et extracellulaire) et qui colocalise avec BDNF et la furine. Nous montrons également que la phosphorylation de BDNF par l'exoPKA régule sa maturation et donc l'équilibre entre les formes pro et matures de BDNF. Enfin, nous sommes en train de tester le rôle de l'exoPKA sur la régulation négative de la plasticité synaptique via la régulation du clivage de BDNF. Ces résultats permettront de déterminer l'existence potentielle d'une double action de PKA sur la plasticité en fonction de la forme activée, cytosolique ou sécrétée.

IV Résultats

IV.A PKA phosphoryle BDNF au site S130

Afin d'identifier les kinases qui pourraient phosphoryler BDNF au niveau de S130, nous avons utilisé un test de criblage de 245 sérine/thréonine kinases (ProKinase assay) mesurant la capacité de phosphorylation *in vitro* d'un peptide comprenant la Sérine 130 (Biotin-Ttds-MRVRRHSDPARRGEL) (**Figure 30A**). Un premier test de criblage rapide a permis d'identifier 9 kinases potentielles qui ont été sélectionnées pour une deuxième série de tests en dose-réponse. Ce deuxième criblage a ainsi confirmé que quatre sérine/thréonine kinases sont capables de phosphoryler la séquence S130 *in vitro*. Les kinases identifiées sont la Protein Kinase A (PKA), la Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 2 (SGK2), la Mitogen- and Stress-activated protein Kinase-1 (MSK1), et la Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2).

Afin d'étudier leur capacité à induire une phosphorylation sur la protéine BDNF entière dans les cellules, nous avons surexprimé ces quatre kinases dans des neurones corticaux en culture et nous avons testé la phosphorylation de BDNF au site S130 grâce à un anticorps pS130-BDNF sélectif (voir étude précédente). Nous avons ainsi confirmé que les quatre kinases étaient capables de phosphoryler BDNF au site S130 même si PKA s'est montré significativement plus efficace (**Figure 30B**). De plus, une analyse subséquente de la séquence protéique de BDNF avec l'outil pkaPS (Neuberger et al., 2007), confirme que le site S130 est localisé dans un site de reconnaissance par la PKA. En effet, la séquence signature de PKA, RRx¹Sx² (où x¹ représente n'importe quel acide aminé et x² est un résidu hydrophobe) est très proche de la séquence S130, RRH¹³⁰SD bien que l'acide aminé en position n+2 soit un résidu chargé non hydrophobe.

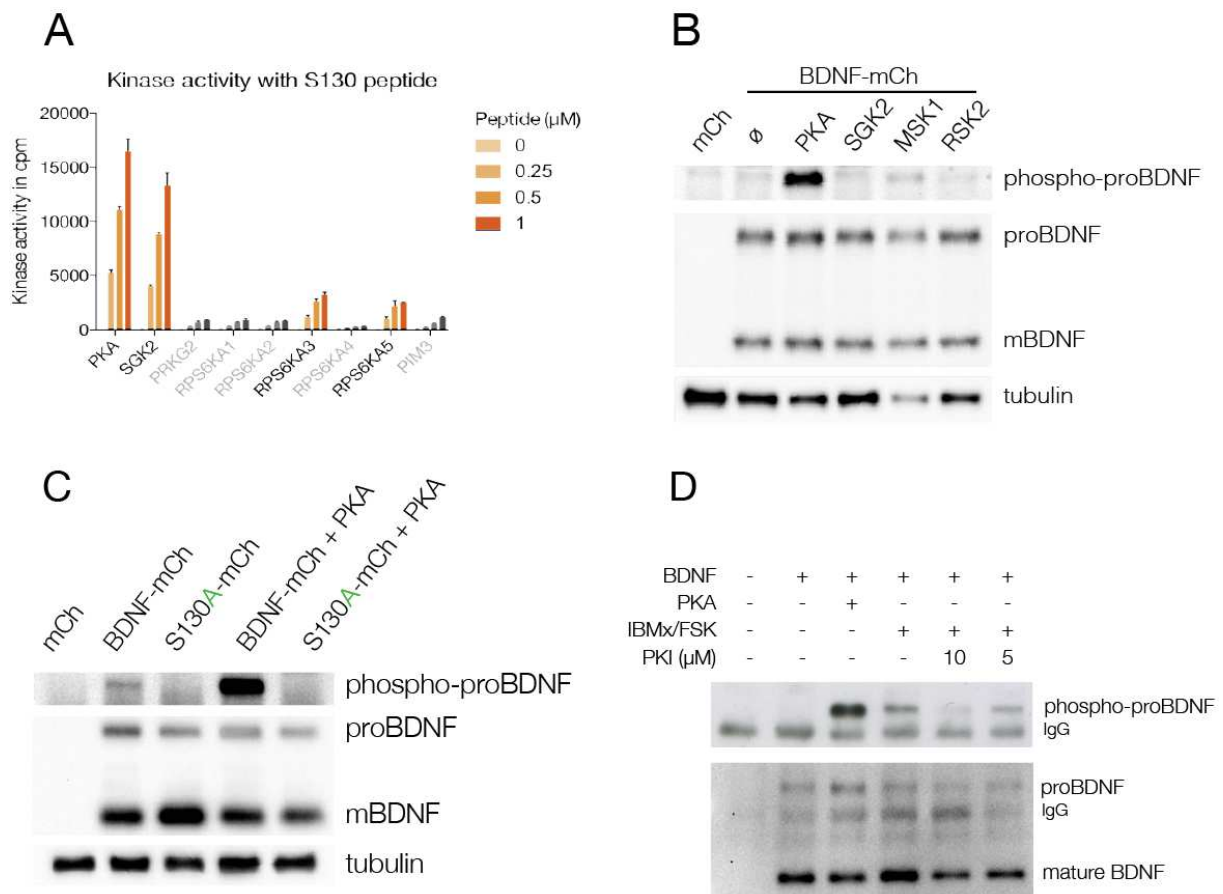


Figure 30. PKA phosphoryle BDNF à la sérine S130.

(A) Criblage de kinases pouvant phosphoryler un peptide contenant la serine 130 du BDNF in vitro. L'activité des kinases était mesurée par rapport au signal -P indiquant une phosphorylation d'un peptide à trois concentrations différentes. Le peptide utilisé contient la sérine S130 du BDNF (Biotin-Ttds-MRVRRHSDPARRGEL). Protéine Kinase A (PKA), Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 2 (SGK2), Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2, RPS6KA5) et Mitogen- and Stress-activated protein Kinase-1 (MSK1, RPS6KA3) phosphorylent efficacement le peptide, de façon dose-dépendante. (B) Phosphorylation de BDNF par PKA. Co-expression de BDNF-mCh et PKA, SGK2, MSK1 et RSK2 dans des neurones de cortex en culture jusqu'à DIV7 et immunoprécipitation de BDNF-mCh par l'anticorps anti-BDNF (3C11). Augmentation de la phosphorylation de proBDNF en présence de PKA. L'anticorps anti-BDNF (3C11) montre la présence de proBDNF et BDNF mature (mBDNF). (C) PKA augmente la phosphorylation de BDNF-mCh mais pas de S130A-mCh. BDNF-mCh ou S130A-mCh sont exprimés en présence ou non de PKA dans des neurones de cortex en culture jusqu'à DIV7 et BDNF-mCh et S130A-mCh sont immunoprécipités par l'anticorps anti-mCh. Augmentation de la phosphorylation de proBDNF en présence de PKA. Aucune phosphorylation n'est observée avec le mutant S130A-mCh. L'anticorps anti-mCh montre la présence de proBDNF et BDNF mature (mBDNF). (D) Phosphorylation de BDNF-mCh par la PKA endogène. BDNF-mCh était exprimé dans des neurones de cortex en culture jusqu'à DIV7 et immunoprécipité par l'anticorps anti-mCh. Augmentation de la phosphorylation de proBDNF lorsque PKA est surexprimée, mais aussi lorsque la PKA endogène est stimulée par une augmentation de l'AMP cyclique induite par la stimulation avec IBMX-Forskoline. La phosphorylation est réduite de façon dose-dépendante lorsque l'inhibiteur de PKA (PKI) est ajouté dans le milieu cellulaire 4 heures avant la lyse. L'anticorps anti-BDNF (3C11) indique la présence de proBDNF et BDNF mature (mBDNF).

Afin de vérifier que PKA phosphoryle bien BDNF au niveau de la sérine 130, nous avons exprimé la sous-unité active de PKA (PKA-Cα-GFP) dans des neurones co-transduits avec du BDNF fusionné à la protéine fluorescente mCherry (BDNF-mCh) ou sa version phospho-résistante dans laquelle la sérine 130 est remplacée par un résidu alanine (S130A-mCh). Alors que PKA augmente les niveaux de phosphorylation du BDNF contrôle, la kinase reste sans effet sur le mutant S130A (**Figure 30C**). Nous avons ensuite stimulé l'activité de la PKA endogène en augmentant les taux intracellulaires d'AMPC dans les neurones. Pour ce faire, les neurones exprimant du BDNF-mCh ont été traités avec un cocktail de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX, inhibiteur de la phosphodiesterase) et de forskoline (FSK, activateur de l'adénylate cyclase). Comme le montre la **Figure 30D**, l'activation de la PKA endogène par IBMX/FSK augmente le niveau de BDNF phosphorylé sur S130. Cette potentialisation de la phosphorylation de BDNF est inhibée de façon dose dépendante après co-incubation avec un inhibiteur intracellulaire sélectif de PKA (fragment 5-24 de PKI-myristoylé).

L'ensemble de ces observations, combinées avec un profil d'expression cérébral similaire et des fonctions proches entre PKA et BDNF, nous a conduits à sélectionner la PKA comme kinase neuronale putative pouvant phosphoryler le BDNF endogène.

IV.B PKA existe dans la voie sécrétoire et co-localise avec BDNF et furine

Traditionnellement considérée comme une kinase cytosolique, PKA a également été identifiée comme ecto- (membranaire) ou exo-(libre) kinase sécrétée dans le milieu extracellulaire (Kübler et al., 1992, 1989). Cette exoPKA a été retrouvée dans des tissus cancéreux mais également dans des tranches hippocampiques (Cabrera-Pastor et al., 2016; Cho et al., 2000a).

Nous avons tout d'abord transfecté des neurones corticaux en culture avec du PKA-Cα-GFP afin de vérifier que PKA pouvait être sécrétée dans le milieu extracellulaire (**Figure 31A**). Comme attendu, PKA peut être retrouvée en abondance dans le lysat cellulaire de neurone mais nous avons également détecté PKA en grande quantité dans la fraction extracellulaire.

Nous avons ensuite étudié la localisation subcellulaire de PKA dans des neurones en culture. Pour ce faire, des neurones en culture exprimant PKA-Cα-GFP ont été traités avec 0.1% de saponine pendant 30 secondes afin de perméabiliser la membrane plasmique et vider le pool soluble cytosolique tout en préservant l'intégrité des organelles intracellulaires afin d'étudier la fraction non soluble associée aux compartiments subcellulaires (Loh et al., 2005). Comme montré dans les **Figures 31**, PKA-Cα peut être retrouvé dans l'appareil de Golgi (GM130 positif, **Figure 31B**), le réseau trans-golgien (TGN38 positif, **Figure 31C**) et les vésicules de sécrétion à

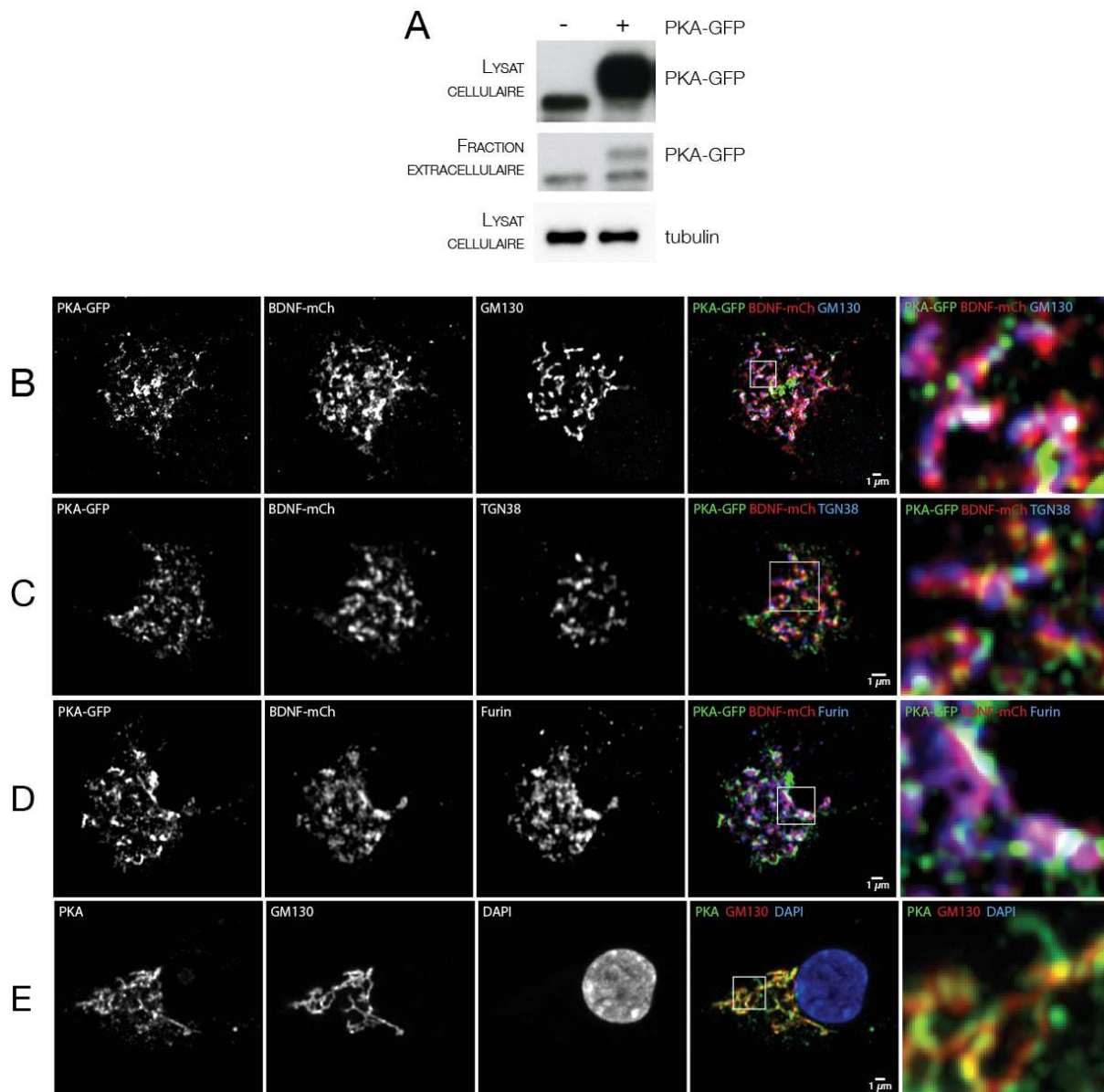


Figure 31. PKA colocalise avec BDNF dans la voie sécrétoire.

(A) PKA est retrouvée dans le milieu conditionné de neurones en culture. PKA-Cα-GFP était surexprimé dans des neurones de cortex en culture jusqu'à DIV4. La PKA était immunoprécipitée par l'anticorps anti-GFP. Elle apparaît fortement dans le lysat cellulaire, mais aussi dans la fraction extracellulaire. (B à D) PKA, BDNF colocalisent au niveau du Golgi. Avant fixation, les cellules sont traitées à la saponine 0.1% afin de vider le contenu soluble cytoplasmique. Images de neurones de cortex en culture exprimant BDNF-mCh et PKA-Cα-GFP. PKA colocalise avec GM130 (B), TGN38 (C), la furine (D) et BDNF au niveau de l'appareil de Golgi. (E) La PKA endogène est localisée dans le Golgi. Images de neurones de cortex non-transfectés en culture.

cœur dense (DCVs), où elle co-localise avec le BDNF et la furine (**Figure 31D**). Afin d'éviter un potentiel effet biaisé de surexpression, des marquages par immunofluorescence de PKA endogène ont également été réalisés sur neurones non-transfectés (**Figure 31E**). Ces expériences confirment que la PKA-Ca endogène est retrouvée dans la voie sécrétoire, notamment dans l'appareil de Golgi où elle est retrouvée en abondance.

Nous avons ensuite confirmé ces observations par analyses biochimiques *in vivo*. En utilisant un protocole d'enrichissement à partir de cerveaux de souris, nous avons retrouvé PKA, BDNF et la furine dans la fraction enrichie en Golgi (**Figure 32A**). Nous avons également utilisé un protocole de fractionnement subcellulaire à partir de cerveaux de souris permettant de purifier les différents compartiments (noyau, cytosol, appareil de Golgi/réticulum endoplasmique, vésicules de sécrétion) (Hinckelmann et al., 2016). Comme attendu, la PKA-Ca était détectée dans les fractions cytosoliques mais également dans les fractions P2 (gros organelles type réticulum et Golgi) et P3 (petites vésicules à cœur denses) avec BDNF (**Figure 32B**).

L'ensemble de ces observations indique donc que la sous-unité catalytique alpha de PKA peut être retrouvée le long de la voie sécrétoire avec BDNF et sa pro-convertase, la furine.

IV.C PKA interagit avec BDNF et régule sa phosphorylation dans le Golgi

Comme nous l'avons montré, la sous unité catalytique de PKA est retrouvée le long de la voie sécrétoire avec BDNF et furine. Nous avons donc tout d'abord testé si PKA pouvait interagir directement avec BDNF en exprimant BDNF-mCh dans des neurones de cortex. Après immunoprecipitation de BDNF par un anticorps anti-mCh, nous avons pu retrouver la PKA-Ca-GFP dans la fraction précipitée (**Figure 32C**). A l'inverse, des neurones en culture transfectés avec PKA-Ca-GFP ont permis de retrouver les formes pro et mature de BDNF endogène après immunoprecipitation de PKA par un anticorps anti-GFP (**Figure 32D**). Enfin, nous avons également pu montrer une interaction directe entre PKA-Ca et BDNF endogènes grâce à l'utilisation d'anticorps anti-BDNF (3C11, Icosagen) pour l'immunoprecipitation et d'un anti-PKA-Ca pour la révélation (**Figure 32E**). BDNF étant une protéine sécrétée retrouvée uniquement dans la voie sécrétoire, ces expériences de co-immunoprécipitations suggèrent qu'une forme golgienne et/ou vésiculaire de PKA-Ca interagit avec BDNF.

Afin de tester directement si l'activité de la PKA-Ca dans le Golgi était suffisante pour phosphoryler le BDNF, des neurones en culture ont été transfectés avec un plasmide exprimant PKI, un inhibiteur peptidique sélectif de PKA-Ca (Dalton and Dewey, 2006), lié à un peptide

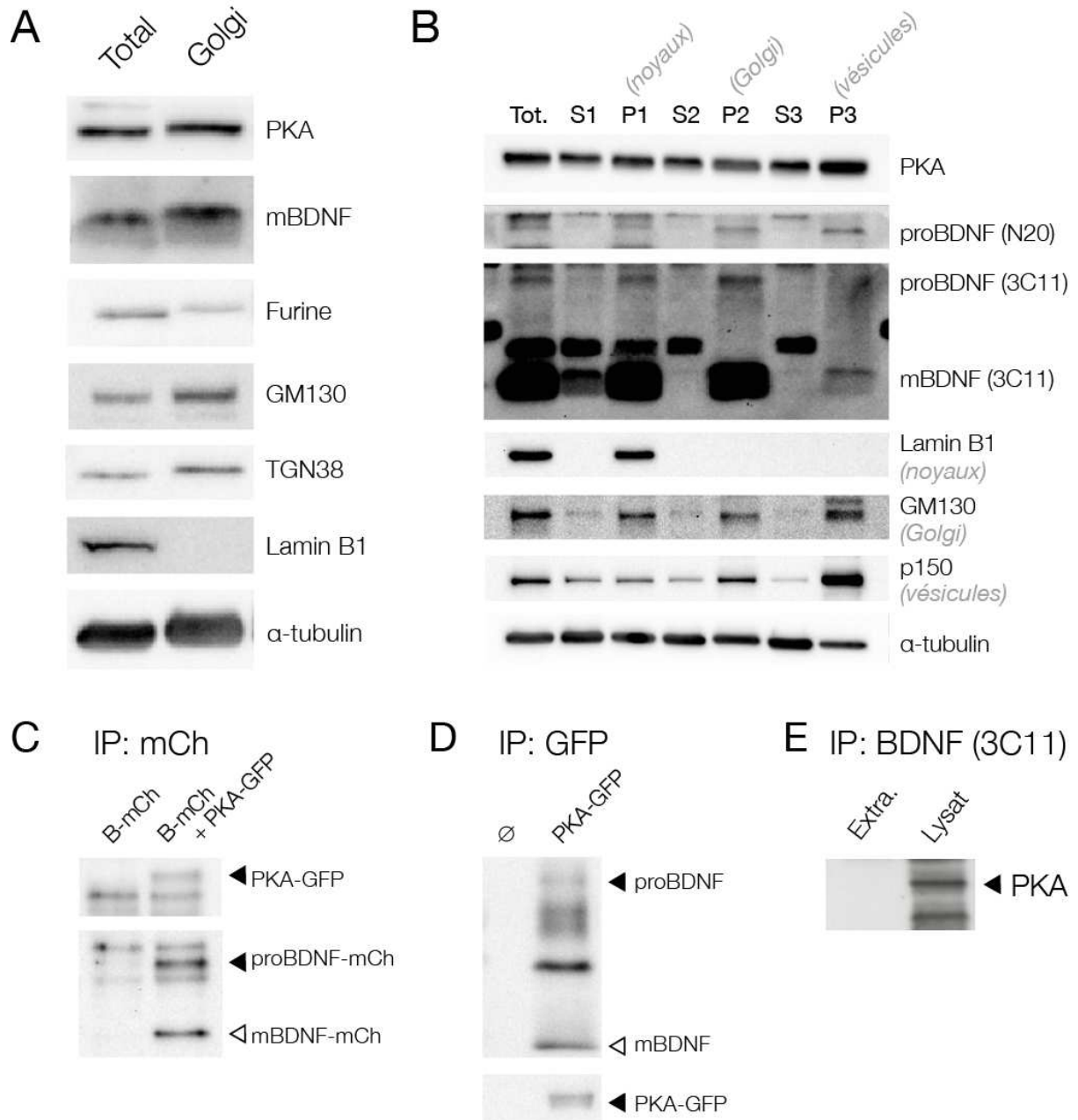


Figure 32. PKA interagit avec BDNF dans le Golgi in vivo.

(A) Enrichissement de la fraction Golgi et identification de PKA endogène. Des cerveaux de souris adultes ont suivi un protocole d'enrichissement en Golgi par gradient de sucre. La fraction Golgi contient la PKA endogène ainsi que du BDNF mature endogène. (B) Purification par fractionnement S2/P2 montre que PKA est dans le Golgi et les vésicules. Purification de différents compartiments cellulaires à partir de cerveaux de souris. L'homogénat a subi plusieurs étapes de centrifugation afin d'isoler les noyaux (P1), les grosses organelles de type Golgi et réticulum endoplasmique (P3), les vésicules de sécrétion (P3) et le cytosol (S1, S2, S3). PKA est retrouvée dans toutes les fractions, y compris la fraction Golgi et vésiculaire. P150, marqueur des vésicules de sécrétion, GM130, protéine résidente du Golgi, Lamin B1, protéine nucléaire. (C) Étude de l'interaction de BDNF et PKA par co-immunoprécipitation. (a) PKA-mCh et/ou PKA-Ca-GFP était exprimées dans des neurones de cortex. Après immunoprécipitation de BDNF-mCh par l'anticorps anti-mCh, la PKA endogène était retrouvée dans la fraction précipitée. (b) De la même façon, après immunoprécipitation de PKA-Ca-GFP par l'anticorps anti-GFP, le BDNF endogène était retrouvé dans la fraction précipitée. (c) Dans le lysat de neurones non-transfectés, l'immunoprécipitation de BDNF endogène par l'anticorps anti-mCh entraînait la PKA endogène.

d'ancrage intra-golgien (β -galactosidase T1₁₋₆₄). Ces expériences sont actuellement en cours mais les résultats préliminaires d'immunofluorescence avec des marqueurs golgien tels que GM130 et TGN38, ont montré que la construction Golgi-PKI était adressée spécifiquement à l'appareil de Golgi (résultats préliminaires en cours). Nous avons également pu observer que l'expression de Golgi-PKI dans les neurones diminue les niveaux de phosphorylation endogène de BDNF-mCh au site S130 par rapport à la condition contrôle (résultats préliminaires en cours).

Ces résultats montrent ainsi que la forme catalytique de PKA est présente et fonctionnelle dans l'appareil de Golgi et est capable d'interagir avec BDNF pour le phosphoryler sur la Sérine 130.

IV.D ExoPKA joue-t-elle un rôle opposé de la PKA cytosolique dans la plasticité synaptique ?

Dans l'étude précédente, nous avons montré que la phosphorylation de BDNF à la Sérine 130 régulait l'efficacité de clivage de proBDNF par la furine (voir le Chapitre *La phosphorylation de BDNF au site S130 régule la plasticité synaptique*). BDNF pouvant être phosphorylé directement par PKA-C α , nous avons testé l'influence de la kinase sur l'efficacité de clivage du proBDNF dans le Golgi.

Nous avons tout d'abord étudié le clivage de BDNF-mCh en présence ou absence de co-expression de PKA-C α -GFP dans des neurones en culture (**Figure 33**). Nous avons ainsi observé une diminution du ratio mature/proBDNF en présence de PKA-C α par rapport à la condition contrôle, suggérant un effet inhibiteur de PKA sur l'efficacité de clivage. Nous avons ensuite testé l'activité golgienne de la PKA-C α endogène en répétant la même expérience en présence de Golgi-PKI. Ces expériences préliminaires sont toujours en cours mais suggèrent déjà une augmentation de l'efficacité de clivage de BDNF par rapport à la condition contrôle (résultats préliminaires en cours). L'ensemble de ces données suggère alors que la phosphorylation de BDNF par PKA-C α au niveau de l'appareil de Golgi altère la maturation de BDNF, régulant ainsi la balance entre les formes pro et mature qui seront sécrétées dans le milieu extracellulaire par les neurones.

Comme nous l'avons vu, la forme catalytique active de PKA peut être exprimée le long de la voie sécrétoire où elle pourra interagir avec le BDNF. La phosphorylation qui en résulte sur le site S130, régule ainsi l'efficacité de clivage du BDNF par la furine, ce qui aura des conséquences directes sur la forme prédominante (pro ou mature) qui sera sécrétée par les neurones. Étant donné les fonctions opposées de ces deux formes via leur interaction privilégiée avec le p75^{NTR} ou le TrkB, respectivement, nous nous sommes intéressés aux conséquences fonctionnelles de

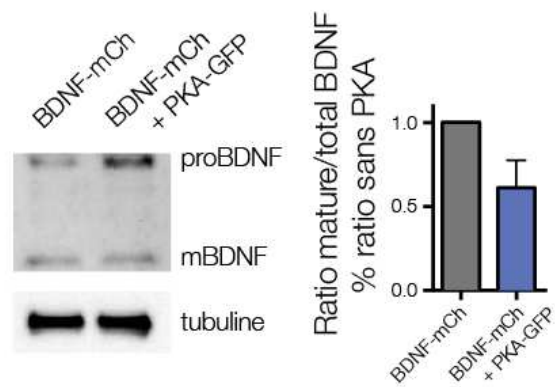


Figure 33. Modification du clivage de BDNF en présence de PKA.

Co-expression de BDNF-mCh avec ou sans PKA-Cα-GFP dans des neurones de cortex en culture. Après 4 jours de culture, le ratio de mBDNF/BDNF total est diminué en présence de PKA-Cα-GFP. Le ratio de mBDNF/BDNF total en présence de PKA est mesuré relativement au BDNF sans PKA. n = 3.

cette régulation PKA-dépendante. En effet, de nombreuses études ont révélé un rôle permissif de la PKA cytosolique sur la mise en place et la maintenance de la plasticité synaptique (Abel et al., 1997; Skeberdis et al., 2006). Cependant, la forme exoPKA de la voie sécrétoire, en favorisant le relargage de proBDNF à la synapse, devrait jouer un rôle inhibiteur de la plasticité. Cette observation identifierait ainsi une nouvelle voie de régulation de la plasticité synaptique via un rôle dichotomique de la PKA selon qu'elle est exprimée dans le cytosol ou qu'elle est sécrétée.

Afin de tester cette hypothèse, nous sommes en train de conduire les expériences suivantes. Nous évaluerons tout d'abord le rôle d'exoPKA sur la dynamique des épines dendritiques *in vitro*, tel qu'effectué dans le travail précédent (voir Chapitre *La phosphorylation de BDNF au site S130 régule la plasticité synaptique*), en présence de Golgi-PKI (pour inhiber spécifiquement la PKA endogène dans le Golgi), de PKI non myristoylé (pour inhiber spécifiquement la PKA sécrétée) ou de Golgi-PKA (une construction en cours de clonage qui permettra de sur-exprimer spécifiquement PKA-C α dans le Golgi). **Résultats attendus** : Le Golgi-PKI et le PKI non myristoylé devraient empêcher la phosphorylation de BDNF et donc favoriser son clivage. La densité et la dynamique des épines dendritiques devraient donc être augmentées. A l'inverse, la Golgi-PKA devrait augmenter la phosphorylation de BDNF et ainsi réduire le nombre et la dynamique des épines. Ces données seraient donc en contradictions avec la littérature qui propose un rôle permissif de la PKA sur la plasticité synaptique et des épines (Sanderson and Dell'Acqua, 2011). Cette contradiction suggérerait ainsi une nouvelle voie de régulation de la plasticité en opposant deux voies PKA-dépendante, selon la localisation de la signalisation (sécrétée ou cytosolique).

Nous testerons ensuite l'induction et la maintenance de la potentialisation à long terme après stimulation thêta-burst des collatérales de Schaeffer après manipulation de l'exoPKA. Dans l'étude précédente (voir Chapitre *La phosphorylation de BDNF au site S130 régule la plasticité synaptique*), nous avons montré que la potentialisation dans l'hippocampe de souris KI-S130D n'était pas maintenue. Nous testerons ici l'effet de l'expression de Golgi-PKA injecté dans l'hippocampe de souris contrôle et de souris insensibles à la phosphorylation KI-S130A. **Résultats attendus** : La Golgi-PKA injectée devrait mimer le phénotype des souris KI-S130D puisque cette PKA ralentit le clivage de BDNF en faveur de la forme pro. Nous pouvons donc nous attendre à ce que la LTP après stimulation thêta-burst soit réduite en présence de Golgi-PKA, de la même manière que dans les souris KI-S130D. Cet effet devrait être abolit dans les souris KI-S130A qui devraient rester insensible à la présence de Golgi-PKA.

CONCLUSION

PKA est une protéine de signalisation d'importance primordiale dans la transmission et la plasticité synaptique. Bien que PKA soit décrite comme une protéine du cytosol, nous avons observé qu'elle pouvait également être localisée dans le Golgi où elle est interagit avec BDNF afin de le phosphoryler. Des études en cours suggèreraient potentiellement un rôle opposé de l'exoPKA à la PKA cytosolique sur la plasticité synaptique via la régulation du clivage du proBDNF. Ces résultats pourraient ainsi révéler l'existence d'un double mécanisme de régulation de la plasticité par PKA en fonction de sa localisation subcellulaire. Ces résultats seront discutés dans le *Chapitre 4 : Discussion et perspectives*.

Chapitre 4 : Discussion et perspectives

I Discussion générale

Si la mise en évidence de la phosphorylation de BDNF a été faite de façon relativement classique, nous avons dû faire face à deux grands obstacles au cours de ce travail de thèse. Premièrement, le BDNF, comme la majorité des protéines sécrétées, n'est pas connu pour être phosphorylé. Et deuxièmement, la PKA n'est pas considérée comme une kinase de la voie sécrétoire. Ainsi, nous avons dû faire une caractérisation exhaustive de ces deux paramètres afin de vérifier et confirmer nos observations.

I.A Le phospho BDNF : Mécanisme et fonction

Puisque les effets de proBDNF et de BDNF sont opposés, le clivage (ou l'absence de clivage) par les pro-convertases du Golgi ou extracellulaires est un mécanisme critique de la régulation du BDNF. Au cours de ma thèse, nous avons pu mettre en évidence un « interrupteur » moléculaire, sous la forme d'une phosphorylation, qui régule le clivage de BDNF. L'identification de la phosphorylation de BDNF est la première du genre dans le domaine des neurotrophines. De plus, c'est la première fois qu'un mécanisme de régulation du clivage est mis en évidence. La phosphorylation est une modification qui est réversible et très dynamique, et qui peut être régulée par l'activité. Elle pourrait donc accorder des propriétés dynamiques à la régulation du BDNF.

La phosphorylation du BDNF, une protéine sécrétée, était inattendue

Bien que la première protéine phosphorylée identifiée était une protéine sécrétée (la caséine), à ce jour très peu d'études se sont focalisées sur la phosphorylation de protéines sécrétées. Lorsque nous présentions nos données, la phosphorylation de BDNF était toujours reçue avec surprise. Nous avons donc dû montrer non seulement sur des peptides *in vitro*, que cette sérine pouvait être phosphorylée, mais aussi par spectrométrie de masse, ainsi qu'en mutant la sérine pour vérifier si la phosphorylation disparaissait. Nous avons dû montrer grâce à un anticorps spécifique de cette phosphorylation que cette modification existait bien *in vivo* chez les souris contrôles mais pas chez les souris BDNF KO.

La mise en évidence de la phosphorylation de BDNF, une protéine sécrétée très étudiée, suggère que d'autres protéines du sécrétome pourraient être phosphorylées. Ces protéines sont considérées comme d'importants biomarqueurs qui témoignent des différentes étapes du développement de maladies. Leur absence ou présence peut également être utilisée pour établir des diagnostics, des pronostics, évaluer les risques et effectuer un suivi thérapeutique (Stastna and Eyk, 2012). Elles sont particulièrement intéressantes car comme elles sont sécrétées, ce sont

des protéines circulantes qui peuvent souvent être analysées par prélèvement sanguin. Nous pouvons imaginer qu'au-delà de mesurer leur absence ou présence ou de quantifier leur niveau d'expression, on pourrait même s'intéresser aux modifications post-traductionnelles de ces protéines. Peut-être que cela permettra de mettre en évidence d'autres subtilités utilisables pour des diagnostics de cancers ou de maladies cardiovasculaires par exemple. Peut-être que la découverte de PTMs sur des protéines sécrétées permettra de mettre en évidence de nouveaux mécanismes de régulation. Le BDNF sert déjà de marqueur circulant pour de nombreuses maladies. Plusieurs études cliniques montrent une association avec des maladies telles que la dépression, la schizophrénie, les troubles bipolaires et les troubles du comportement alimentaire (Anastasia and Hempstead, 2014; Castrén and Kojima, 2017). Il serait donc intéressant de poursuivre ces études en prenant en compte le degré de phosphorylation de BDNF.

Une phosphorylation peut-elle stabiliser une protéine ?

Des phosphorylations ont déjà été mises en cause dans le blocage de clivage de protéines ou dans leur stabilisation et sont donc capables de modifier leur fonction. Par exemple, la protéine Tau, qui stabilise les microtubules, peut être clivée au niveau du résidu 421 par la caspase-3 (Sandhu et al., 2017). Une fois clivée, la protéine subit quatre autres phosphorylations qui entraînent la perte de liaison aux microtubules et l'agrégation de la protéine observée dans la maladie d'Alzheimer. La phosphorylation de Tau sur la sérine 422, localisée directement après le site de clivage par la caspase-3, bloque totalement ce clivage. Le blocage de ce clivage permettrait de conserver la fonction de stabilisation des microtubules et d'empêcher l'agrégation de la protéine clivée. Un autre exemple est la phosphorylation de la phosphatase qui est l'un des suppresseurs de tumeurs les plus couramment ciblé dans les cancers humains et un régulateur clé de la croissance cellulaire et de l'apoptose (Torres et al., 2003). Un groupe de résidus sérine/thréonine de la partie C-terminale de PTEN est phosphorylé constitutivement par la Casein Kinase 2 (CK2). La diminution de cette phosphorylation au cours de l'apoptose rend la protéine instable et permet son clivage par la caspase-3 qui résulte en une inactivation ou dégradation de PTEN. Un autre exemple implique la PKA : la protéine ataxin-1 est phosphorylée par PKA, ce qui empêche sa dégradation par le recrutement d'une protéine et conduit à son transport dans le noyau (Lagalwar and Orr, 2013). Cette phosphorylation est augmentée dans les cas d'ataxie spinocérébelleuse de type 1.

Le mécanisme par lequel la phosphorylation de BDNF ralentit son clivage reste à être élucidé. Quand un groupe phosphoryl est ajouté sur un résidu sérine, l'encombrement stérique, la charge, la capacité à former des liaisons hydrogènes sont altérées (Tholey et al., 2001). La

phosphorylation en elle-même pourrait-elle bloquer l'accès aux pro-convertases au site de clivage ? Pour tester cette hypothèse il serait intéressant de réaliser des co-immunoprécipitations entre BDNF ou ses phospho-mutants et la furine par exemple. Il faudrait aussi étudier si c'est un effet direct de la phosphorylation, ou bien si d'autres protéines sont recrutées comme dans le cas de l'ataxin-1 par exemple.

La phosphorylation de BDNF, un mécanisme de régulation dynamique ?

Dans le domaine des neurotrophines, il existe des désaccords sur la sécrétion du proBDNF. Certaines études montrent que le proBDNF peut être sécrété et agir sur le p75^{NTR} pour activer les effets négatifs du BDNF (Hempstead, 2015; Lu et al., 2005), tandis que d'autres montrent que la maturation est complète au moment de la sécrétion et que le BDNF est sécrété majoritairement sous forme mature (Dieni et al., 2012; Matsumoto et al., 2008). Notre hypothèse n'est pas en désaccord avec l'une ou l'autre hypothèse et suggère plutôt que la phosphorylation de S130 agit comme un interrupteur qui favoriserait la balance vers l'une ou l'autre forme en fonction du contexte. Les phosphorylations de protéines sont des événements dynamiques et régulés par de nombreux facteurs endogènes et exogènes. Ainsi il est possible que la phosphorylation de BDNF soit également un événement transitoire. Un changement, même minime, entraîné par une phosphorylation plus élevée de proBDNF à un instant t et dans une localisation précise, pourrait avoir des conséquences fonctionnelles importantes mais spatialement et temporellement restreintes. Ainsi, la phosphorylation pourrait concilier les deux observations en fonction de la régulation de BDNF par PKA, FJX1 et FAM69B. La difficulté d'observation du phospho-BDNF et l'existence de plusieurs kinases de ce site de phosphorylation indiquent le caractère versatile du clivage, qui semble extrêmement régulé, ce qui pourrait expliquer les observations faites par différents laboratoires sur le proBDNF. Il serait donc intéressant de revisiter cette controverse en incluant la phosphorylation comme facteur différentiel.

L'observation de la phosphorylation de BDNF n'est pas incompatible avec ce qui a déjà été observé, c'est-à-dire que BDNF est retrouvé majoritairement sous forme clivée dans le cerveau (Dieni et al., 2012; Matsumoto et al., 2008). En effet, nos résultats préliminaires d'observation du ratio BDNF mature/proBDNF (qui ne sont pas présentés dans ce manuscrit) montrent que même chez les souris phospho-mimétiques (S130D), le BDNF est retrouvé majoritairement sous forme mature, même si le ratio est affecté. De la même façon, nos analyses *in vitro* montrent un ralentissement du clivage de BDNF, mais pas un blocage total. Nous sommes actuellement en train d'évaluer ce ratio à des stades plus précoces (P10-14), lorsque le proBDNF est le plus fortement exprimé et que le taux de BDNF mature est encore relativement faible (Dincheva et al.,

2016). Nous envisageons aussi la possibilité que les changements de phosphorylation et donc de ratio soient très transitoires et/ou locaux et donc difficiles à observer par Western Blot.

Le caractère transitoire de la phosphorylation sera important à étudier. En effet, l'expression des protéines change au cours du développement neuronal, de sa maturation, de son environnement et des stimuli reçus et varie aussi dans des pathologies. La phosphorylation pourrait être un mécanisme encore plus dynamique et rapide qui permettrait au neurone de s'adapter à court terme aux stimuli reçus, notamment à l'activité neuronale. Il est intéressant de noter que l'ecto-kinase FAM69B pourrait être régulée par le calcium (Dudkiewicz et al., 2013). Est-elle est régulée par l'activité ? Il serait intéressant de voir si elle est inactivée en cas de forte activité, ce qui conduirait à une diminution de la phosphorylation de proBDNF et donc son clivage. Comment les autres ecto-kinases seraient elles régulées ? Est-ce que ces trois ecto-kinases sont actives en même temps, dans les mêmes neurones ? Ou bien est-ce qu'il existe des différences d'expression de ces ecto-kinases parmi les populations neuronales ?

Qu'en est-il des autres pro-neurotrophines ?

Les résultats obtenus au cours de cette étude nous permettent de mettre en évidence le premier mécanisme de régulation du clivage de BDNF. Il serait intéressant de voir si les autres neurotrophines ont un tel site de phosphorylation. Le site de clivage de BDNF est R_VR_RR|HSD, avec la sérine phosphorylée en position +2. Le site de clivage de NGF (R_SK_R|SSS) comprend également une sérine en position +2, celui de NT3 (R_RK_R|YAE) est suivi d'une alanine (non-phosphorylable) en position +2 et celui du NT4/5 (R_SR_RR|GVS) contient une sérine en position +3, mais pas en position +2. Une analyse *in silico* des séquences de ces neurotrophines sur Scansite 3 et GPS 3.0 indique une phosphorylation potentielle dans cette région pour NGF, mais pas pour NT3, ni NT4/5. Nous pouvons imaginer que la phosphorylation de NGF pourrait aussi avoir un effet sur son clivage. Pour compléter la caractérisation de la phosphorylation, nous pourrions nous inspirer des travaux de Brigadski et Lessmann qui ont interverti les séquences des pro-domaines de BDNF et de NT4/5 par exemple pour voir si la cinétique du clivage de la protéine est changée ou si son adressage dans les différentes voies de sécrétion est modifié. La liaison du pro-domaine de BDNF à la NT4/5 augmente drastiquement son adressage vers les voies de sécrétion régulées (Brigadski, 2005). Est-ce que le site de phosphorylation de BDNF pourrait rendre la NT4/5 dépendante de l'activité neuronale? Est-ce que la cinétique de clivage des autres neurotrophines serait changée si elles comportaient la séquence de phosphorylation de BDNF ?

Quel rôle pour phospho-BDNF dans la plasticité ?

Nous avons vu que cette phosphorylation avait des conséquences au niveau fonctionnel chez les souris phospho-mutantes. Lorsque l'équilibre est forcé en direction de la phosphorylation, la potentialisation à long-terme de ces souris est réduite. Nous sommes en train d'étudier les conséquences de la phosphorylation sur la dynamique des épines dendritiques et sur la morphologie des neurones de l'hippocampe. Nous pouvons nous attendre à ce que les souris S130D aient une densité d'épine plus réduite et/ou que leurs épines soient plus immatures puisque leur LTP est réduite. Au contraire, nous pouvons imaginer que les souris phospho-résistantes, S130A ont plus d'épines et qu'elles sont plus matures. En effet, même si leur LTP n'est pas significativement différente de celle des souris contrôles, nous pouvons imaginer que l'absence de proBDNF rende la plasticité synaptique moins flexible et que les épines faiblement utilisées ne soient pas efficacement supprimées. Qu'en est-il pour la morphologie des neurones hippocampiques ? Est-ce que les neurones des souris S130D auront des dendrites plus courtes et moins ramifiées à cause de l'excédent de proBDNF ? Est-ce que les S130A auront de nombreuses dendrites très longues et très ramifiées puisque le BDNF mature favorise la pousse neuritique et la différenciation ?

Lors des expériences d'électrophysiologie, nous avons remarqué que l'hippocampe des souris S130D était plus réduit que celui des souris S130A et contrôles. Nous devons valider cette observation par des mesures volumétriques, mais ce serait cohérent avec les effets négatifs de proBDNF sur la survie et la ramification des neurones (Teng et al., 2005; Yang et al., 2014). Une réduction de volume de l'hippocampe des souris proBDNF résistantes au clivage a d'ailleurs été observée par IRM chez ces souris à 11 mois (Yang et al., 2014).

Nous pouvons également nous demander si la phosphorylation sert de régulation spatiale pour la maintenance de la potentialisation sur un groupe restreint de neurones dans le réseau. Par exemple, lorsqu'un neurone activé est potentialisé par LTP, est-ce que les neurones environnants sont déprimés via une phosphorylation de BDNF afin de renforcer uniquement la voie activée ? Ou bien cette phosphorylation est-elle spécifique d'une population neuronale ? Si deux populations neuronales peuvent avoir des taux de phosphorylation différents, cela pourrait expliquer comment BDNF est capable de potentialiser la transmission glutamatergique (Leßmann et al., 1994) tout en déprimant la transmission GABAergique (Kim et al., 1994). Est-ce que les ectokinases sont préférentiellement exprimées par les interneurones GABAergiques ? Est-ce que le clivage est moins rapide dans ces neurones que dans les neurones glutamatergiques ?

Cette phosphorylation pourrait-elle aussi être un mécanisme de régulation temporelle ? Comme le BDNF est capable de stimuler sa propre transcription et sa propre sécrétion, est-ce que la phosphorylation de BDNF pourrait être un mécanisme de rétrocontrôle pour éviter un emballement ?

La phosphorylation de BDNF est-elle liée à la mémoire ?

Comme la LTP au niveau des synapses du CA1 de l'hippocampe des souris S130D est altérée, nous avons trouvé intéressant d'étudier ces souris au niveau comportemental. En effet, l'altération de la LTP des synapses du CA1 impacte la mémoire de reconnaissance des objets par exemple (Clarke et al., 2010). Le clivage de BDNF aussi été identifié comme régulateur de la formation de la mémoire. Lors d'un conditionnement de peur contextuelle, le clivage de BDNF est critique pour l'acquisition de nouvelles informations, alors que l'extinction de souvenirs acquis dépend de l'inhibition de ce clivage (Barnes and Thomas, 2008). C'est une étude qui sera réalisée dans quelques mois, lorsque notre cohorte aura 7 mois. Les tests de mémoire permettront de voir les conséquences de la « surphosphorylation » ou de l'absence de phosphorylation du BDNF.

Nous pouvons nous attendre à ce que la phosphorylation constitutive du BDNF chez les souris S130D provoque de plus grandes difficultés à apprendre une tâche puisque leur LTP est réduite par rapport aux souris contrôles. La LTP des souris S130A en revanche, n'est pas significativement différente de celle des souris contrôles. Auront-elles les mêmes performances que les souris contrôles ou bien auront-elles des facilités d'apprentissage grâce à l'augmentation de la proportion de BDNF mature ? D'autre part, l'extinction de la mémoire après une réactivation est potentialisée par l'inhibition du clivage de proBDNF, alors qu'elle est restreinte en présence d'un niveau élevé de BDNF mature (Barnes and Thomas, 2008; Kirtley and Thomas, 2010; Radiske et al., 2015). Nous pouvons donc imaginer que les souris S130D seront capables d'oublier plus facilement un événement que les souris contrôles puisque leur clivage est ralenti.

Que l'apprentissage des souris S130A soit différent de celui des contrôles ou non, il se peut que les processus de mémorisation soient tout de même altérés. En effet, puisque leur BDNF ne peut pas être phosphorylé, il se peut que l'absence totale de proBDNF rende la plasticité synaptique trop rigide et que les souris S130A aient des difficultés à oublier un événement stressant. Cette perte de flexibilité des synapses pourrait être testée en étudiant la LTD de ces souris. Nous pouvons nous attendre à ce que les souris S130D aient une LTD facilitée par rapport aux souris contrôles, comme il a été montré avec des souris proBDNF résistantes au clivage (Yang et al., 2014). Au contraire, est-ce que les souris S130A ont une LTD altérée après une stimulation à

basse fréquence ? Est-ce que leurs synapses sont incapables de s'adapter à un signal faible à cause du manque d'action du proBDNF ?

I.B FJX1, FAM69B et exoPKA : Des kinases atypiques pour un nouveau mode de régulation de la plasticité par BDNF ?

La découverte de la phosphorylation de S130 et son implication dans la régulation du clivage de BDNF nous a conduits à étudier les kinases des voies de sécrétions. En effet, le clivage est une étape clé qui contrôle l'action « positive » ou « négative » du BDNF sur les processus cellulaires, notamment la plasticité synaptique. Nous avons tout d'abord mis en évidence deux ecto-kinases connues, FJX1 et FAM69B, qui sont capable de phosphoryler BDNF. Nous avons ensuite montré l'existence d'une exoPKA dans le Golgi qui phosphoryle aussi BDNF et régule sa maturation. Ces trois kinases pourraient donc faire partie d'une voie de régulation des fonctions de BDNF.

FJX, FAM : Quels liens avec BDNF ?

Les travaux récents de Tagliabracci sur FAM20C ont fortement contribué à relancer l'intérêt pour les ecto-kinases (Tagliabracci et al., 2013) et nous ont permis d'identifier deux ecto-kinases de la famille de FAM20C qui sont capables de phosphoryler BDNF : FJX1 et FAM69B. Nous pouvons noter que l'existence de plusieurs kinases capables de phosphoryler BDNF dans des neurones en culture sont des arguments en faveur de l'existence de cette phosphorylation.

FJX1 est exprimé dans le cerveau, notamment au niveau de l'hippocampe, comme BDNF (Ashery-Padan et al., 1999) et c'est une protéine sécrétée (Rock et al., 2005). Chez les souris, FJX1 est capable de réguler négativement l'extension et la ramification des dendrites des neurones hippocampiques (Probst et al., 2007). Les souris FJX1^{-/-} ont des dendrites plus longues que celles des souris contrôles. Ces arguments sont en accord avec nos résultats sur la phosphorylation de BDNF par FJX1, puisque la phosphorylation conduit à une augmentation des effets « négatifs » de BDNF. La régulation de FJX1 est encore mal connue, mais il existe quelques études à ce sujet. Le gène de FJX1 est une cible directe de la voie Notch (Rock et al., 2005). La plupart des voies d'entrée qui interagissent avec Notch dans les neurones matures sont inconnues, tout comme les effecteurs en aval. Les candidats probables comprennent les neurotrophines (Ables et al., 2011). FJX1 et BDNF pourraient donc toutes les deux être sous le contrôle de Notch. D'autre part, le rôle de cadhérines atypiques dans l'arborisation dendritique

suggèrent une interaction entre FJX1 et Fat3 et Ds1 ou Ds2. Fat et Dachshaus sont de très grosses molécules d'adhésion cellulaire qui se lient et ont un rôle dans le contrôle de la croissance cellulaire (Keeler et al., 2015; Sharma and McNeill, 2013). FJX1 et BDNF semblent être impliqués dans les mêmes fonctions de survie et croissance cellulaire, mais peuvent-elles interagir ? Où est-ce que cette interaction aurait lieu ? Dans le Golgi, les vésicules ou bien seulement une fois que les deux protéines sont sécrétées ?

FAM69B est encore moins étudiée que FJX1. Il n'y a que trois études publiées à son propos. La première est une étude génomique conduite sur les patients ayant développé une sclérose en plaque (Alcina et al., 2010). Dans cette étude, 21 SNPs significativement associés à la maladie se trouvent dans le locus codant pour FAM69A et trois autres protéines. Cela est intéressant puisqu'il existe une hypothèse selon laquelle, dans cette maladie, le taux réduit de proBDNF entraîne une incapacité à limiter les cellules T autoréactives par suppression apoptotique (Tongiorgi et al., 2012). La deuxième étude décrit la famille des FAM69 comme des protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique (nos observations par immunofluorescence montrent que FAM69B est aussi exprimée dans le Golgi) (Tennant-Eyles et al., 2011). FAM69B est principalement exprimée dans le cerveau, et est fortement conservée. Enfin, la troisième étude est une analyse de bio-informatique des FAM69 qui confirme la présence du motif classique des protéines kinases et qui suggère que ces protéines ont gardé leur activité catalytique de phosphotransférase (Dudkiewicz et al., 2013). Cette étude montre aussi que FAM69A et FAM69B ont un domaine EF Hand capable de lier le calcium et qui est inséré au niveau de la structure du domaine kinase, ce qui suggère une régulation de ces kinases par le calcium. Est-ce que FAM69B est effectivement régulée par le calcium ? Est-ce que l'activité neuronale aura un effet sur son activation ou sa désactivation ? Si oui, est-ce qu'une régulation par le calcium dépendant de l'activité neuronale est possible pour une protéine golgienne ou vésiculaire ? Est-ce que cette ecto-kinase sera l'élément principal de la régulation du clivage de BDNF par l'activité ?

D'ailleurs pourquoi existerait-il plusieurs exokinases pour BDNF ? Est-ce qu'elles sont confinées/activées dans des localisations particulières ? Nous pouvons par exemple imaginer que FAM69B soit principalement activée dans le réticulum endoplasmique (selon (Tennant-Eyles et al., 2011) alors que FJX1 pourrait être sécrétée ? Est-ce que FAM69B est dépendante de l'activité neuronale ? tandis que FJX1 serait activé préférentiellement au cours du développement ? En effet, FAM69B est potentiellement activée par le calcium tandis que FJX1 est impliquée dans la différenciation neuronale et le développement de la drosophile. Peut-être que ces kinases ne sont pas exprimées au même moment de la maturation des neurones ou bien par les mêmes

populations neuronales ? Par les mêmes tissus ? De par l'importance de cette régulation sur la balance fonctionnelle de BDNF, on peut également imaginer que ces trois mécanismes sont redondants et peuvent se croiser.

Une PKA dans le Golgi et la voie sécrétoire

Le plus gros challenge auquel nous avons dû faire face est la contradiction entre les résultats obtenus concernant la phosphorylation de BDNF par PKA et ce qui est connu sur le rôle et la localisation de PKA. En effet, puisque PKA est connue pour être une protéine cytosolique, la mise en évidence de la localisation golgienne de PKA apporte une multitude de questions quant à sa régulation. Tout d'abord, comment la PKA est-elle adressée dans le Golgi ? De plus, PKA est une kinase impliquée dans de nombreuses voies de signalisation et est hautement régulée. L'une de ces régulations vient de la capacité de sa partie N-terminale de sa sous-unité catalytique à être myristoylée et phosphorylée (Breitenlechner et al., 2004; Tholey et al., 2001). Ces deux modifications agissent comme un interrupteur sur la capacité de PKA-C à se fixer à la membrane plasmique (Gaffarogullari et al., 2011; Tillo et al., 2017). Est-ce que l'adressage de la PKA-C au Golgi repose sur ce mécanisme ? La partie catalytique est-elle la seule à être envoyée dans le Golgi ou bien est-ce que les sous-unités régulatrices sont aussi présentes dans cet organelle ? Est-elle complètement indépendante de la régulation cytosolique ? Ou bien, comme la PKA des mitochondries, son activité varie-t-elle en fonction de la PKA cytosolique (Lefkimmatis et al., 2013) ? La présence de l'adénylate cyclase à la membrane golgienne (Cheng and Farquhar, 1976) évoque l'idée qu'il pourrait y avoir de l'AMPc dans le Golgi dont la concentration pourrait varier indépendamment du cytosol et ainsi réguler la PKA du Golgi de façon très spécifique. Si les sous-unités régulatrices sont dans le Golgi, est-ce qu'il y a de l'AMPc dans le Golgi pour réguler leur association ? Si oui, comment est-il envoyé dans le Golgi ? Est-ce qu'il transite à travers la membrane golgienne ou bien est-ce de l'AMPc local ? Est-ce un transit passif ou existe-t-il des canaux ou des transporteurs de l'AMPc ?

exoPKA versus cytoPKA : 2 mécanismes opposés dans la régulation de la LTP ?

La PKA golgienne nouvellement identifiée aurait des effets contraires à la PKA cytosolique. La PKA du Golgi permettrait d'augmenter la phosphorylation de proBDNF, d'inhiber le clivage et par conséquent d'activer les effets négatifs de BDNF (apoptose, rétraction dendritique, LTD, effacement de la mémoire). A l'inverse, la PKA cytosolique est connue pour favoriser la survie, la LTP et la mémoire. Cette dualité de fonctionnement ajouterait un nouveau niveau de régulation de la mémoire. Il sera très intéressant de rechercher les mécanismes impliqués dans la régulation

de la localisation subcellulaire de PKA puisqu'une localisation golgienne ou cytosolique aura probablement un impact opposé sur la mémoire.

En effet La PKA est connue pour être une protéine du cytosol, agissant préférentiellement de façon post-synaptique. AKAP150 est la protéine d'ancrage principale qui recrute PKA au niveau post-synaptique en se liant aux sous-unités RII de PKA canal (Lu et al., 2011). AKAP150 agit comme un échafaudage moléculaire et permet de réunir différents effecteurs, notamment PKA et la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA. L'étude de souris chez lesquelles l'AKAP150 est mutée pour ne pas reconnaître PKA ont une densité d'épines plus importante que les souris contrôles à 2-4 semaines, mais pas à 8 semaines, ce qui suggère que l'ancrage de PKA permet de limiter ou de stabiliser les épines présentes chez les jeunes animaux (Lu et al., 2011). L'implication de PKA dans la LTP est en effet importante chez les jeunes animaux (P7-14) et diminue au profit de CaMKII chez l'adulte. Curieusement, c'est la même variation que l'expression de proBDNF. Est-il possible que la PKA du Golgi joue aussi un rôle important sur la régulation des synapses pendant cette période ?

Il est intéressant de noter qu'une ecto-PKA avait été étudiée *in vitro* au début des années 1990 (Kübler et al., 1992, 1989; Shaltiel et al., 1993), puis dans des cancers à partir des années 2000 (Cho et al., 2000a, 2000b; Wang et al., 2007; Yalak and Vogel, 2012). Il aura fallu attendre 2016 pour qu'elle soit mise en évidence dans les neurones (Cabrera-Pastor et al., 2016). Cependant, cette dernière étude alloue un rôle similaire à celui de la PKA cytosolique. En effet, les auteurs observent que l'ecto-PKA phosphoryle les récepteurs NMDA et qu'un PKI qui ne pénètre pas dans les cellules est capable d'inhiber cet effet, ce qui ne concorderait pas avec nos observations. Nous devons donc continuer la caractérisation de la PKA golgienne par des études en électrophysiologie après avoir ciblé PKA-Ca ou PKI spécifiquement dans le Golgi. Ces expériences nous permettront de voir si la LTP est affectée lorsque PKA-Ca est surexprimée dans le Golgi, et si le phénotype est rétabli lorsque la golgiPKA-Ca est injectée dans des souris BDNF S130A.

PKA et LTD : Une nouvelle voie de régulation via BDNF ?

PKA est aussi impliquée au cours de la LTD (Zhang et al., 2011). D'ailleurs, le knock-out de la sous-unité RI β ou bien de la sous-unité C β ₁ de la PKA provoque un déficit sévère de la LTD dans les tranches d'hippocampe (Brandon et al., 1995; Qi et al., 1996). La PKA semble donc être critique à la mise en place de la LTD. Puisque l'absence de la sous-unité C β bloque la formation de la LTD, on peut se demander si cette isoforme serait aussi capable de phosphoryler BDNF ?

Si oui, l'absence de $C\beta_1$ pourrait-elle expliquer une absence de phosphorylation de proBDNF et donc un clivage accéléré, ce qui conduirait à une LTD altérée ?

Parallèlement, la PKA golgienne, en favorisant la production de proBDNF, pourrait également jouer un rôle sur la LTD via l'activation du récepteur $p75^{NTR}$. En effet, l'utilisation d'une lignée de souris exprimant du proBDNF résistant au clivage montre une diminution du nombre épines dendritiques et une facilitation de la LTD (Yang et al., 2014).

Hypothèse d'une régulation spatiotemporelle spécifique des deux PKA

Il est très intéressant de remarquer que les réponses cellulaires à la stimulation de PKA diffèrent selon la durée de stimulation (Lu et al., 2011). Une stimulation courte de PKA (2-4h) augmente la densité d'épines sur les dendrites apicales du CA1 dans des cultures organotypiques de tranches d'hippocampe. Au contraire, une stimulation de longue durée de PKA (48h) réduit la densité d'épines synaptiques. De la même façon, le mode d'application de BDNF exogène n'a pas les mêmes effets sur des tranches hippocampiques : une stimulation courte de BDNF augmente la transmission basale synaptique alors qu'une stimulation longue facilite la LTP via la synthèse de nouvelles protéines et leur recrutement aux synapses stimulées (Ji et al., 2010). Est-ce qu'une stimulation courte de PKA aurait recours à la PKA cytosolique alors qu'une stimulation longue agirait via la PKA du Golgi ? Cela pourrait expliquer les effets opposés de la stimulation de PKA : une courte stimulation active PKA cytosolique, qui agit localement au niveau des épines dendritiques pour favoriser la transmission via la phosphorylation des récepteurs AMPA et le recrutement de nouveaux récepteurs. A l'inverse, une stimulation longue pourrait potentiellement activer la PKA du Golgi, qui phosphorylerait BDNF, ce qui conduirait à une augmentation de proBDNF sécrété et une inhibition des synapses.

Outre cette régulation temporelle, nous pouvons également avancer une hypothèse de régulation spatiale. En effet, des études ont montré que la PKA cytosolique régule la LTP de façon postsynaptique dans l'hippocampe (Lanté et al., 2006). A l'inverse, le BDNF régule la plasticité synaptique via un contrôle majoritairement présynaptique (Zakharenko et al., 2003). Nous pouvons ainsi nous demander si le rôle permissif de la PKA cytosolique est plutôt postsynaptique, tandis que le rôle inhibiteur de la PKA golgienne et/ou sécrétée serait restreint au compartiment présynaptique.

I.C PhosphoBDNF, ectokinases, exoPKA : De nouvelles cibles pour les maladies du cerveau ?

Un lien entre phosphorylation de BDNF et maladies neurologiques ?

La découverte de cette régulation par la phosphorylation pourrait avoir des implications dans le développement neuronal et dans les maladies du système nerveux. En effet, le BDNF étant impliqué dans des maladies neurodégénératives et des troubles psychiatriques, il serait intéressant d'étudier le ratio mBDNF/proBDNF dans ces maladies. Par exemple, il a été montré que le taux de BDNF mature était diminué dans des souris modèles de la maladie de Huntington alors que le taux de proBDNF restait inchangé (Ma et al., 2015). Est-ce que les souris S130D, qui ont un ratio mBDNF/proBDNF réduit, développeront des symptômes de maladies neurodégénératives ? A l'inverse, puisque le BDNF mature augmente l'excitabilité neuronale et qu'il est sur-exprimé après les crises d'épilepsies, il semblerait que le BDNF participe à l'épileptogénèse (Binder et al., 2001). Nous pouvons donc imaginer que les souris S130A, qui ont uniquement du BDNF mature, pourraient développer des troubles épileptiques.

Il est intéressant de noter que lors de la manipulation de ces souris phospho-mutantes nous avons remarqué que les souris S130A ont tendance à être plus anxieuses, comme le sont les souris BDNF cKO où l'expression du BDNF est réduite dans le cerveau après la naissance (Chan et al., 2006). Nous avons aussi remarqué une forte agressivité chez les souris S130A, comme il a été observé chez les souris BDNF^{+/-} (Lyons et al., 1999). Il serait donc intéressant d'analyser ces souris dans des tests comportementaux d'anxiété comme l'*elevated plus maze*, le test *light/dark*, l'*open field* et le *novelty suppressed feeding*, et des tests d'agressivité en les mettant en présence d'intrus.

Nous pourrions également étudier le comportement alimentaire de ces souris. En effet, le BDNF est impliqué dans la prise alimentaire. Par exemple, les souris BDNF^{+/-} ont un comportement hyperphagique, qui se manifeste en obésité à l'âge adulte (Lyons et al., 1999). Chez l'homme, l'allèle Met66 est fortement associé à des troubles du comportement alimentaire (*anorexia nervosa* ou *bulimia nervosa*), et le SNP C270 de BDNF a un effet sur l'âge du début de symptômes de la perte de poids (Ribasés et al., 2004). Il serait donc intéressant de voir si la phosphorylation de BDNF a aussi un rôle dans les troubles alimentaires et la prise de poids.

Puisque la phosphorylation de BDNF commande son clivage et donc sa fonction, il serait très intéressant d'étudier les taux de phospho-BDNF dans les maladies associées à des variations de BDNF. Le phospho-BDNF pourrait-il servir de biomarqueur montrant l'évolution de certaines maladies ? Il est possible que la phosphorylation de BDNF ou de ses kinases puissent être ciblées dans des maladies. Nous pouvons par exemple penser au cas de la maladie d'Huntington. Les patients de cette maladie montrent une neurodégénérescence sévère au niveau du striatum. Est-ce qu'en plus d'être mal transporté, le BDNF est plus phosphorylé et donc majoritairement sous forme pro ? Cela pourrait-il expliquer l'observation de la réduction de BDNF mature, mais sans augmentation de proBDNF dans le striatum des souris zQ175, modèles de la maladie de Huntington (Ma et al., 2015) ? Le ratio mature/proBDNF serait réduit, mais il s'accompagnerait d'une expression globale plus faible d'où l'absence de changement de niveau du proBDNF.

D'autre part, il serait intéressant d'étudier le lien entre le SNP Val66Met et la phosphorylation du BDNF. Comment est-ce que ce SNP affecte la phosphorylation ? Il est intéressant de remarquer que la mutation Val66Met a tendance à déstabiliser le pro-domaine et que la mutation affecte sa fonction (Anastasia et al., 2013). Est-ce que le SNP gêne ou bien favorise l'accès à la Sérine 130 par les kinases ? Y a-t-il une incidence du SNP sur les taux de phosphorylation du BDNF, et donc sur le ratio pro/mature qui sera sécrété ? Les patients portant la mutation Met-66 ont une mémoire affectée et un volume hippocampique réduit (Egan et al., 2003). Est-il possible que le SNP favorise la phosphorylation et les fonctions délétères du proBDNF ?

Implications des ecto-kinases dans le cancer : Quid des maladies du cerveau ?

Il est intéressant de noter que les kinases capables de phosphoryler BDNF ont été impliquées dans la pathogenèse de cancers. Par exemple, une ecto-PKA a été montrée dans des tissus cancéreux et a même fait l'objet de recherches en tant que biomarqueur du cancer (Cho 2000). FJX1 est aussi surexprimée dans certains cancers (Al-Greene et al., 2013; Chai et al., 2015). Les kinases sont déjà considérées comme des cibles de choix dans le traitement de maladies comme exemplifié par le nombre de substances pharmaceutiques approuvées par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) qui ciblent des kinases (Yalak and Vogel, 2015). On peut noter que BDNF et TrkB sont aussi surexprimés dans des cancers, la suractivation de la voie PI3K/Akt entraînant une croissance cellulaire et une prolifération incontrôlées (Radin and Patel, 2017).

Il est intéressant de remarquer que BDNF, TrkB et FJX1 sont liés par leur interaction avec le facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF-1- α). Ce facteur de transcription est impliqué

dans des cancers, notamment en agissant sur la survie cellulaire. FJX1 est capable de stabiliser la protéine HIF-1- α (Al-Greene et al., 2013). HIF-1- α peut activer la transcription et la sécrétion de BDNF, qui active à son tour la voie Pi3K/Akt via TrkB, qui augmente la transcription de HIF-1- α , qui favorise l'expression de TrkB (Radin and Patel, 2017). De plus, la phosphorylation de TrkB au niveau de la tyrosine Y705 entraîne une augmentation du niveau d'ARNm de HIF-1- α . Il semble que FJX1, BDNF, TrkB soient impliqués dans la survie cellulaire activée en cas d'hypoxie et que ce mécanisme est dérégulé dans certains cancers et s'oppose aux traitements de chimiothérapie (Gao et al., 2016). Nous pouvons donc nous demander si la phosphorylation de BDNF est modifiée dans les cancers. Est-ce que la phosphorylation du BDNF est complètement abolie en faveur d'une expression incontrôlée de BDNF mature ?

Il est intéressant de noter que BDNF/TrkB a aussi été associé au cancer, notamment dans la formation des tumeurs et des métastases (Desmet and Peeper, 2006). En effet, les mécanismes autocrines ou paracrines de BDNF sur TrkB pourraient empêcher la mort cellulaire programmée après détachement de la matrice et stimuler l'invasion des tissus par métastase (Liotta and Kohn, 2004).

Comment FJX1, FAM69B et exoPKA pourraient-elles varier dans les maladies du cerveau ? Est-ce qu'elles sont surexprimées dans les maladies où le BDNF mature est réduit ? En particulier, FJX1 puisque son activité est liée à la croissance cellulaire. On peut ainsi imaginer que sa surexpression pourrait avoir des effets négatifs sur la survie et la mise en place des connexions neuronales. D'autre part, l'ectokinase FAM69B fait partie de la même famille que les protéines Deleted In Autism (DIA1 et DIA1R) qui ont des conséquences dramatiques sur le cerveau puisqu'elles sont liées à l'autisme et à des retards mentaux (Dudkiewicz et al., 2013). Les patients autistes présentent des aberrations de sécrétion cellulaire et d'expression de protéines de la voie sécrétoire (Aziz et al., 2011). On peut imaginer que si FAM69B est peu ou pas sécrétée, elle ne pourra pas inhiber le clivage et il y aura plus de BDNF mature. Or, les niveaux de BDNF sanguins (donc sécrétés) sont augmentés chez les patients autistes en comparaison des patients contrôles (Saghazadeh and Rezaei, 2017). Pourrait-on imaginer que FAM69B, BDNF et surtout la phosphorylation de BDNF au site S130 puissent servir de biomarqueurs de cette maladie ?

II Perspectives

La découverte de la phosphorylation de BDNF pose la question de l'existence d'autres phosphorylations sur cette neurotrophine. Les protéines phosphorylées comportent souvent plus d'un site de phosphorylation, et il existe même des protéines avec 10, 20 ou même plus de sites

de phosphorylation, ce qui permet une régulation fine de leurs fonctions (Holmberg et al., 2002). Nous pouvons nous demander aussi s'il existe d'autres types modifications post-traductionnelles sur les neurotrophines, comme une palmitoylation par exemple puisque cette modification joue un rôle dans le trafic subcellulaire et dans les interactions entre les protéines, ce qui peut influencer la localisation et la fonction de la protéine (Chavda et al., 2014).

De nombreuses kinases et ecto-kinases putatives ne sont encore pas ou peu étudiées. C'est le cas des ecto-kinases FAM198(A, B) qui sont proches des FAM20(A, B, C) et de FJX1, ainsi que les FAM69(A, B, C), la Vertebrate Lonesome Kinase (VLK) et les Deleted In Autism (DIA1 et DIA1-R) (Tagliabracci et al., 2015), mais encore des kinases « classiques » qui n'ont été étudiées que chez les invertébrés, comme les RIO kinases par exemple, qui sont des kinases de sérines/thréonines. Riok1 est observée chez *Caenorhabditis elegans* et est un modulateur de la voie de signalisation de Ras-Raf-MEK-ERK et pourrait être impliquée dans des tumeurs (Weinberg et al., 2014) (Weinberg et al., 2014).

Le potentiel thérapeutique de BDNF est déjà bien établi pour de nombreuses maladies neurodégénératives (telles que la maladie de Huntington, d'Alzheimer, de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique), dans les accidents vasculaires cérébraux et les lésions de la moelle épinière, et dans les troubles psychiatriques tels que la dépression, les troubles alimentaires ou cognitifs (Nagahara and Tuszynski, 2011). Le problème majeur dans le domaine des thérapies à base de neurotrophines (et dans la plupart des cas où la cible thérapeutique est le cerveau) est que la substance doit passer la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le système nerveux central. Or, BDNF est une protéine de taille moyenne et elle est chargée. Le franchissement de la barrière est très difficile et seule une très petite quantité atteint efficacement le cerveau lorsqu'il est administré de façon périphérique. Afin d'être délivré aux neurones, le BDNF doit être administré directement dans le système nerveux central mais encore une fois, le BDNF exogène est très peu stable et toutes les tentatives thérapeutiques ont échoué jusqu'à présent. La découverte de la phosphorylation de BDNF et des kinases qui la régulent, pourrait ouvrir un nouveau champ de cibles thérapeutiques. Par exemple, la PKA peut être inhibée par un très petit peptide d'une quinzaine d'acides aminés. Le problème engendré par le ciblage de PKA est que la PKA « classique » cytosolique a aussi des effets positifs sur la survie, il faudrait donc être sûrs de pouvoir cibler uniquement la PKA golgienne. Nous pourrions alors imaginer le développement d'inhibiteurs sélectifs de FJX1 ou de FAM69B qui ne sont localisés que dans la voie sécrétoire.

Dans la même idée d'utilisation de BDNF ou ses kinases comme cibles thérapeutiques, il faut noter que BDNF ainsi que PKA, ont des effets différents selon qu'ils sont administrés de façon rapide ou chronique. Ce détail pourrait être pertinents pour la mise en place de traitements. Nous pouvons faire l'hypothèse que l'administration rapide (comme une injection) serait analogue d'une action courte de BDNF alors qu'une infusion continue et chronique aurait des effets plus prolongés sur l'activation de signaux de transduction. Cette différence dans la cinétique d'activation ou d'inhibition de la phosphorylation de BDNF pourraient avoir des conséquences importantes sur la survie neuronale, la plasticité des connections synaptiques et sur les grandes fonctions cognitives.

Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence un mécanisme de régulation du clivage de BDNF par phosphorylation du résidu S130 localisé dans le site de reconnaissance des proconvertases. Cette phosphorylation régule négativement la protéolyse de BDNF le long de la voie sécrétoire et conditionne le ratio entre la forme pro et mature qui seront produites par le neurone. En parallèle, cette étude nous a amenés à nous intéresser aux kinases de la voie sécrétoire et nous avons ainsi identifié FJX1 et FAM69B comme des kinases de BDNF. Nous avons aussi pu mettre en évidence une troisième ecto-kinase capable de phosphoryler BDNF dans des neurones : la golgiPKA. Cette golgiPKA était un partenaire inattendu de BDNF puisque PKA est plutôt connue pour être une protéine cytosolique. La découverte de cette régulation dynamique et dépendante de l'activité, constitue une nouvelle voie de régulation de BDNF et se rajoute à ses nombreux éléments de régulation allant de la transcription à l'action sur ses récepteurs qui ont des fonctions opposées, en passant par la régulation de l'expression, de la sécrétion et de l'autorégulation. L'importance de cette voie de régulation se traduit notamment par ses conséquences fonctionnelles sur la mise en place et le maintien de la plasticité synaptique mais également sur les processus d'apprentissage et de mémoire.

Références

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Garrison, E.P., Kang, H.M., Korbel, J.O., Marchini, J.L., McCarthy, S., McVean, G.A., Abecasis, G.R., 2015. A global reference for human genetic variation. *Nature* 526, 68–74. <https://doi.org/10/73d>
- Abel, T., Nguyen, P.V., Barad, M., Deuel, T.A., Kandel, E.R., Bourtchouladze, R., 1997. Genetic Demonstration of a Role for PKA in the Late Phase of LTP and in Hippocampus-Based Long-Term Memory. *Cell* 88, 615–626. <https://doi.org/10/fr7gf5>
- Ables, J.L., Breunig, J.J., Eisch, A.J., Rakic, P., 2011. Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci* 12, 269–283. <https://doi.org/10/d7f86z>
- Abraham, W.C., Logan, B., Greenwood, J.M., Dragunow, M., 2002. Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 9626–9634.
- Abuhatzira, L., Makedonski, K., Kaufman, Y., Razin, A., Shemer, R., 2007. MeCP2 deficiency in the brain decreases BDNF levels by REST/CoREST-mediated repression and increases TRKB production. *Epigenetics* 2, 214–222.
- Ahmed, M.S., Siegelbaum, S.A., 2009. Recruitment of N-Type Ca(2+) channels during LTP enhances low release efficacy of hippocampal CA1 perforant path synapses. *Neuron* 63, 372–385. <https://doi.org/10/dtbtk2>
- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., Timmusk, T., 2007. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res.* 85, 525–535. <https://doi.org/10/b3nkxd>
- Alcina, A., Fernández, O., Gonzalez, J.R., Catalá-Rabasa, A., Fedetz, M., Ndagire, D., Leyva, L., Guerrero, M., Arnal, C., Delgado, C., Lucas, M., Izquierdo, G., Matesanz, F., 2010. Tag-SNP analysis of the GFI1-EVI5-RPL5-FAM69 risk locus for multiple sclerosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 827–831. <https://doi.org/10/cx3snc>
- Al-Greene, N.T., Means, A.L., Lu, P., Jiang, A., Schmidt, C.R., Chakravarthy, A.B., Merchant, N.B., Washington, M.K., Zhang, B., Shyr, Y., Deane, N.G., Beauchamp, R.D., 2013. Four jointed box 1 promotes angiogenesis and is associated with poor patient survival in colorectal carcinoma. *PLoS ONE* 8, e69660. <https://doi.org/10/gddngr>
- Alonso, M., Vianna, M.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2002. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 663–674.
- Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., 1997. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389, 856–860. <https://doi.org/10/fdr8d5>
- An, J.J., Gharami, K., Liao, G.-Y., Woo, N.H., Lau, A.G., Vanevski, F., Torre, E.R., Jones, K.R., Feng, Y., Lu, B., Xu, B., 2008. Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 134, 175–187. <https://doi.org/10/dkjbdj>
- Anastasia, A., Deinhardt, K., Chao, M.V., Will, N.E., Irmady, K., Lee, F.S., Hempstead, B.L., Bracken, C., 2013. Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction. *Nature Communications* 4, 2490. <https://doi.org/10/f9vh2z>
- Anastasia, A., Hempstead, B.L., 2014. BDNF function in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 15.
- Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., Vousden, K.H., 1999. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1751–1758.
- Ashery-Padan, R., Alvarez-Bolado, G., Klamt, B., Gessler, M., Gruss, P., 1999. Fjx1, the murine homologue of the *Drosophila* four-jointed gene, codes for a putative secreted protein

- expressed in restricted domains of the developing and adult brain. *Mechanisms of Development* 80, 213–217. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00218-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00218-4)
- Aziz, A., Harrop, S.P., Bishop, N.E., 2011. Characterization of the deleted in autism 1 protein family: implications for studying cognitive disorders. *PLoS ONE* 6, e14547. <https://doi.org/10/csk7kh>
- Azoulay, D., Vachapova, V., Shihman, B., Miler, A., Karni, A., 2005. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: reversal by glatiramer acetate. *J. Neuroimmunol.* 167, 215–218. <https://doi.org/10/fcfnj>
- Baj, G., Leone, E., Chao, M.V., Tongiorgi, E., 2011. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16813–16818. <https://doi.org/10/b5krxw>
- Balkowiec, A., Katz, D.M., 2002. Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 22, 10399–10407.
- Baquet, Z.C., Gorski, J.A., Jones, K.R., 2004. Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 24, 4250–4258. <https://doi.org/10/bt35jc>
- Baranes, D., Lederfein, D., Huang, Y.Y., Chen, M., Bailey, C.H., Kandel, E.R., 1998. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21, 813–825.
- Barbacid, M., 1994. The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 25, 1386–1403. <https://doi.org/10/cwm6xc>
- Barde, Y A, Edgar, D., Thoenen, H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal* 1, 549–53. <https://doi.org/0261-4189/82/0105-0549>
- Barde, Y. A., Edgar, D., Thoenen, H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549–553.
- Barde, Y.A., Lindsay, R.M., Monard, D., Thoenen, H., 1978. New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurones. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/274818a0>
- Barker, P.A., 2009. Whither proBDNF? *Nature Neuroscience* 12, 105–106. <https://doi.org/10/dzj2td>
- Barnes, P., Thomas, K.L., 2008. Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *PLoS ONE* 3, e3248. <https://doi.org/10/dkx8b>
- Barondes, S.H., Cohen, H.D., 1968. Memory impairment after subcutaneous injection of acetoxycycloheximide. *Science* 160, 556–557.
- Bartheld, C.S. von, Byers, M.R., Williams, R., Bothwell, M., 1996. Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature* 379, 830–833. <https://doi.org/10/bs7r25>
- Bath, K.G., Jing, D.Q., Dincheva, I., Neeb, C.C., Pattwell, S.S., Chao, M.V., Lee, F.S., Ninan, I., 2012. BDNF Val66Met impairs fluoxetine-induced enhancement of adult hippocampus plasticity. *Neuropsychopharmacology* 37, 1297–1304. <https://doi.org/10/fxzf5>
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 2016. *Neuroscience: exploring the brain*, Fourth edition. ed. Wolters Kluwer, Philadelphia.
- Bechtel, P.J., Beavo, J.A., Krebs, E.G., 1977. Purification and characterization of catalytic subunit of skeletal muscle adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 252, 2691–2697.
- Beebe, S.J., Oyen, O., Sandberg, M., Frøysa, A., Hansson, V., Jahnsen, T., 1990. Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Endocrinol.* 4, 465–475. <https://doi.org/10.1210/mend-4-3-465>

- Béjot, Y., Prigent-Tessier, A., Cachia, C., Giroud, M., Mossiat, C., Bertrand, N., Garnier, P., Marie, C., 2011. Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochemistry International* 58, 102–111. <https://doi.org/10/c2f3nv>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2008. Reviews: BDNF and Memory Formation and Storage. *The Neuroscientist* 14, 147–156. <https://doi.org/10.1177/1073858407305850>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Medina, J.H., 2014. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 76, 677–683. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.024>
- Berninger, B., Schinder, A.F., Poo, M.M., 1999. Synaptic reliability correlates with reduced susceptibility to synaptic potentiation by brain-derived neurotrophic factor. *Learn. Mem.* 6, 232–242.
- Bibel, M., Hoppe, E., Barde, Y.A., 1999. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.* 18, 616–622. <https://doi.org/10/b98kgj>
- Bienenstock, E.L., Cooper, L.N., Munro, P.W., 1982. Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J. Neurosci.* 2, 32–48.
- Biffo, S., Offenhäuser, N., Carter, B.D., Barde, Y.A., 1995. Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 121, 2461–2470.
- Binder, D.K., Croll, S.D., Gall, C.M., Scharfman, H.E., 2001. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.* 24, 47–53.
- Bingham, E.W., Farrell, H.M., Basch, J.J., 1972. Phosphorylation of casein. Role of the golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 247, 8193–8194.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39. <https://doi.org/10/c32ggk>
- Bliss, T.V.P., Lømo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331–356.
- Blöchl, A., Thoenen, H., 1996. Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 173–190. <https://doi.org/10/c6n7gd>
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., Brunak, S., 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4, 1633–1649. <https://doi.org/10/c5v9vf>
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., Jaffard, R., 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400, 671–675. <https://doi.org/10/bv4gm3>
- Borroni, B., Grassi, M., Archetti, S., Costanzi, C., Bianchi, M., Caimi, L., Caltagirone, C., Di Luca, M., Padovani, A., 2009. BDNF genetic variations increase the risk of Alzheimer's disease-related depression. *J. Alzheimers Dis.* 18, 867–875. <https://doi.org/10/gddtd8>
- Bradley, J., Sporns, O., 1999. BDNF-dependent enhancement of exocytosis in cultured cortical neurons requires translation but not transcription. *Brain Res.* 815, 140–149.
- Bramham, C.R., Messaoudi, E., 2005. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog. Neurobiol.* 76, 99–125. <https://doi.org/10/fd2369>
- Brandon, E.P., Zhuo, M., Huang, Y.Y., Qi, M., Gerhold, K.A., Burton, K.A., Kandel, E.R., McKnight, G.S., Idzerda, R.L., 1995. Hippocampal long-term depression and depotentiation are defective in mice carrying a targeted disruption of the gene encoding the RI beta subunit of cAMP-dependent protein kinase. *PNAS* 92, 8851–8855. <https://doi.org/10/c26t5w>

- Breitenlechner, C., Engh, R.A., Huber, R., Kinzel, V., Bossemeyer, D., Gassel, M., 2004. The Typically Disordered N-Terminus of PKA Can Fold as a Helix and Project the Myristoylation Site into Solution †. *Biochemistry* 43, 7743–7749. <https://doi.org/10.1021/bi0362525>
- Brigadski, T., 2005. Differential Vesicular Targeting and Time Course of Synaptic Secretion of the Mammalian Neurotrophins. *Journal of Neuroscience* 25, 7601–7614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1776-05.2005>
- Broad, K.D., Mimmack, M.L., Keverne, E.B., Kendrick, K.M., 2002. Increased BDNF and trk-B mRNA expression in cortical and limbic regions following formation of a social recognition memory. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2166–2174.
- Brodsky, M.H., Steller, H., 1996. Positional information along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* eye: graded expression of the four-jointed gene. *Dev. Biol.* 173, 428–446. <https://doi.org/10/dwn8tx>
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–868.
- Burnett, G., Kennedy, E.P., 1954. The enzymatic phosphorylation of proteins. *J. Biol. Chem.* 211, 969–980.
- Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Felipo, V., 2016. Extracellular Protein Kinase A Modulates Intracellular Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II, Nitric Oxide Synthase, and the Glutamate–Nitric Oxide–cGMP Pathway in Cerebellum. Differential Effects in Hyperammonemia. *ACS Chemical Neuroscience* 7, 1753–1759. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.6b00263>
- Cadd, G., McKnight, G.S., 1989. Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron* 3, 71–79.
- Cajal, S.R. y, 1894. The Croonian lecture. —La fine structure des centres nerveux. *Proc. R. Soc. Lond.* 55, 444–468. <https://doi.org/10/fg7j3z>
- Carlino, D., De Vanna, M., Tongiorgi, E., 2013. Is Altered BDNF Biosynthesis a General Feature in Patients with Cognitive Dysfunctions? *The Neuroscientist* 19, 345–353. <https://doi.org/10.1177/1073858412469444>
- Castrén, E., Kojima, M., 2017. Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiology of Disease* 97, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.010>
- Castrén, E., Vöikar, V., Rantamäki, T., 2007. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol* 7, 18–21. <https://doi.org/10/fs32d6>
- Cattaneo, A., Cattane, N., Begni, V., Pariante, C., Riva, M., 2016. The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Nature Publishing Group* 6, e958-10. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.214>
- Chahrouh, M., Zoghbi, H.Y., 2007. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56, 422–437. <https://doi.org/10/ch6q6d>
- Chai, S.J., Yap, Y.Y., Foo, Y.C., Yap, L.F., Ponniah, S., Teo, S.H., Cheong, S.C., Patel, V., Lim, K.P., 2015. Identification of Four-Jointed Box 1 (FJX1)-Specific Peptides for Immunotherapy of Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS ONE* 10, e0130464. <https://doi.org/10/f7883d>
- Chan, J.P., Unger, T.J., Byrnes, J., Rios, M., 2006. Examination of behavioral deficits triggered by targeting *Bdnf* in fetal or postnatal brains of mice. *Neuroscience* 142, 49–58. <https://doi.org/10/bbxzj3>
- Chang, H.J., Yoo, J.-Y., Kim, T.H., Fazleabas, A.T., Young, S.L., Lessey, B.A., Jeong, J.-W., 2018. Overexpression of Four Joint Box-1 Protein (FJX1) in Eutopic Endometrium From Women With Endometriosis. *Reproductive Sciences* 25, 207–213. <https://doi.org/10.1177/1933719117716780>
- Chao, M.V., 2003. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 299–309. <https://doi.org/10.1038/nrn1078>

- Chao, M.V., Hempstead, B.L., 1995. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18, 321–326.
- Chavda, B., Arnott, J.A., Planey, S.L., 2014. Targeting protein palmitoylation: selective inhibitors and implications in disease. *Expert Opin Drug Discov* 9, 1005–1019. <https://doi.org/10/f6sh23>
- Chazeau, A., Giannone, G., 2016. Organization and dynamics of the actin cytoskeleton during dendritic spine morphological remodeling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73, 3053–3073. <https://doi.org/10/f8xs9q>
- Chen, J., Li, C.-R., Yang, H., Liu, J., Zhang, T., Jiao, S.-S., Wang, Y.-J., Xu, Z.-Q., 2016. proBDNF Attenuates Hippocampal Neurogenesis and Induces Learning and Memory Deficits in Aged Mice. *Neurotoxicity Research* 29, 47–53. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9568-2>
- Chen, M.J., Dixon, J.E., Manning, G., 2017. Genomics and evolution of protein phosphatases. *Science Signaling* 10, eaag1796. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag1796>
- Chen, Z.-Y., Jing, D., Bath, K.G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C.-J., Herrera, D.G., Toth, M., Yang, C., McEwen, B.S., Hempstead, B.L., Lee, F.S., 2006. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* 314, 140–143. <https://doi.org/10/dkskqj>
- Cheng, H., Farquhar, M.G., 1976. Presence of adenylate cyclase activity in Golgi and other fractions from rat liver. II. Cytochemical localization within Golgi and ER membranes. *J. Cell Biol.* 70, 671–684.
- Cheng, H.C., van Patten, S.M., Smith, A.J., Walsh, D.A., 1985. An active twenty-amino-acid-residue peptide derived from the inhibitor protein of the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem. J.* 231, 655–661.
- Cheng, P.-L., Song, A.-H., Wong, Y.-H., Wang, S., Zhang, X., Poo, M.-M., 2011. Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18430–18435. <https://doi.org/10/c8p9p8>
- Chiaruttini, C., Vicario, A., Li, Z., Baj, G., Braiuca, P., Wu, Y., Lee, F.S., Gardossi, L., Baraban, J.M., Tongiorgi, E., 2009. Dendritic trafficking of BDNF mRNA is mediated by translin and blocked by the G196A (Val66Met) mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16481–16486. <https://doi.org/10/csmhf5>
- Cho, Y.S., Lee, Y.N., Cho-Chung, Y.S., 2000a. Biochemical Characterization of Extracellular cAMP-Dependent Protein Kinase as a Tumor Marker. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278, 679–684. <https://doi.org/10/dfndx7>
- Cho, Y.S., Park, Y.G., Lee, Y.N., Kim, M.-K., Bates, S., Tan, L., Cho-Chung, Y.S., 2000b. Extracellular protein kinase A as a cancer biomarker: Its expression by tumor cells and reversal by a myristate-lacking C α and RII β subunit overexpression. *PNAS* 97, 835–840. <https://doi.org/10/b83bb8>
- Cirulli, F., Berry, A., Chiarotti, F., Alleva, E., 2004. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus* 14, 802–807. <https://doi.org/10/fw54nx>
- Clarke, J.R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., Delgado-García, J.M., 2010. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2652–2657. <https://doi.org/10/fwm45x>
- Cohen, B.Y.S., Levi-Montalcini, R., 1956. *Proceedings of the NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES* 42, 571–574.
- Cohen, P., 2001. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur. J. Biochem.* 268, 5001–5010.
- Cohen, S., 1960. Purification of a Nerve-Growth Promoting Protein From the Mouse Salivary Gland and Its Neuro-Cytotoxic Antiserum*. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America 46, 302–311. <https://doi.org/10.1073/pnas.46.3.302>
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., 1956. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated From Snake Venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 42, 571–574.
- Colicos, M.A., Collins, B.E., Sailor, M.J., Goda, Y., 2001. Remodeling of Synaptic Actin Induced by Photoconductive Stimulation. *Cell* 107, 605–616. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00444-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00444-4)
- Conner, J.M., Lauterborn, J.C., Yan, Q., Gall, C.M., Varon, S., 1997. Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein and mRNA in the Normal Adult Rat CNS: Evidence for Anterograde Axonal Transport. *J. Neurosci.* 17, 2295–2313. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1711-97.2000>
- Corbin, J.D., Sugden, P.H., Lincoln, T.M., Keely, S.L., 1977. Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J. Biol. Chem.* 252, 3854–3861.
- Cunningham, M.E., Greene, L.A., 1998. A function-structure model for NGF-activated TRK. *EMBO J.* 17, 7282–7293. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7282>
- Curzon, P., Rustay, N.R., Browman, K.E., 2009. Chapter 2 Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents.
- Cvijic, M.E., Kita, T., Shih, W., DiPaola, R.S., Chin, K.V., 2000. Extracellular catalytic subunit activity of the cAMP-dependent protein kinase in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 2309–2317.
- Dagda, R.K., Gusdon, A.M., Pien, I., Strack, S., Green, S., Li, C., Van Houten, B., Cherra, S.J., Chu, C.T., 2011. Mitochondrially localized PKA reverses mitochondrial pathology and dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease. *Cell Death & Differentiation* 18, 1914–1923. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.74>
- Daile, P., Carnegie, P.R., Young, J.D., 1975. Synthetic substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase. *Nature* 257, 416–418.
- Dalton, G.D., Dewey, W.L., 2006. Protein kinase inhibitor peptide (PKI): A family of endogenous neuropeptides that modulate neuronal cAMP-dependent protein kinase function. *Neuropeptides* 40, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2005.10.002>
- Dash, P.K., Moore, A.N., 1996. Characterization and phosphorylation of CREB-like proteins in *Aplysia* central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 39, 43–51.
- Davies, A.M., Thoenen, H., Barde, Y.A., 1986. The response of chick sensory neurons to brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 6, 1897–1904.
- De Munter, S., Köhn, M., Bollen, M., 2013. Challenges and opportunities in the development of protein phosphatase-directed therapeutics. *ACS Chem. Biol.* 8, 36–45. <https://doi.org/10.1021/cb300374a>
- Dean, C., Liu, H., Dunning, F.M., Chang, P.Y., Jackson, M.B., Chapman, E.R., 2009. Synaptotagmin-IV modulates synaptic function and long-term potentiation by regulating BDNF release. *Nat. Neurosci.* 12, 767–776. <https://doi.org/10.1038/nn.2254>
- Dean, C., Liu, H., Staudt, T., Stahlberg, M.A., Vingill, S., Bückers, J., Kamin, D., Engelhardt, J., Jackson, M.B., Hell, S.W., Chapman, E.R., 2012. Distinct subsets of Syt-IV/BDNF vesicles are sorted to axons versus dendrites and recruited to synapses by activity. *J. Neurosci.* 32, 5398–5413. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2811-12.2012>
- Deinhardt, K., Chao, M.V., 2014. Shaping neurons: Long and short range effects of mature and proBDNF signalling upon neuronal structure. *Neuropharmacology* 76 Pt C, 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.034>
- Deinhardt, K., Kim, T., Spellman, D.S., Mains, R.E., Eipper, B.A., Neubert, T.A., Chao, M.V., Hempstead, B.L., 2011. Neuronal growth cone retraction relies on proneurotrophin receptor signaling through Rac. *Sci Signal* 4, ra82. <https://doi.org/10.1126/scisignal.1216664>
- del Toro, D., Canals, J.M., Ginés, S., Kojima, M., Egea, G., Alberch, J., 2006. Mutant huntingtin impairs the post-Golgi trafficking of brain-derived neurotrophic factor but not its Val66Met polymorphism. *J. Neurosci.* 26, 12748–12757. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2811-06.2006>

- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H., 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 339–350. <https://doi.org/10/fswphz>
- Desmet, C.J., Peeper, D.S., 2006. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 755–759. <https://doi.org/10/fvptz8>
- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M.S., Deogracias, R., Gundelfinger, E.D., Kojima, M., Nestel, S., Frotscher, M., Barde, Y.-A., 2012. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *The Journal of Cell Biology* 196, 775–788. <https://doi.org/10.1083/jcb.201201038>
- Dincheva, I., Lynch, N.B., Lee, F.S., 2016. The Role of BDNF in the Development of Fear Learning. *Depress Anxiety* 33, 907–916. <https://doi.org/10/f89x9w>
- Dudek, S.M., Bear, M.F., 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4363–4367.
- Dudkiewicz, M., Lenart, A., Pawłowski, K., 2013. A Novel Predicted Calcium-Regulated Kinase Family Implicated in Neurological Disorders. *PLoS ONE* 8, e66427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066427>
- Dueber, J.E., Mirsky, E.A., Lim, W.A., 2007. Engineering synthetic signaling proteins with ultrasensitive input/output control. *Nat. Biotechnol.* 25, 660–662. <https://doi.org/10.1038/nbt1308>
- Dunham, J.S., Deakin, J.F.W., Miyajima, F., Payton, A., Toro, C.T., 2009. Expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor and its receptors in Stanley consortium brains. *J Psychiatr Res* 43, 1175–1184. <https://doi.org/10/bvtg94>
- Ebendal, T., Larhammar, D., Persson, H., 1986. Structure and expression of the chicken beta nerve growth factor gene. *EMBO J.* 5, 1483–1487.
- Edelmann, E., Cepeda-Prado, E., Franck, M., Lichtenecker, P., Brigadski, T., Leßmann, V., 2015. Theta Burst Firing Recruits BDNF Release and Signaling in Postsynaptic CA1 Neurons in Spike-Timing-Dependent LTP. *Neuron* 86, 1041–1054. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.007>
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., Weinberger, D.R., 2003. The BDNF val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of BDNF and Human Memory and Hippocampal Function. *Cell* 112, 257–269. <https://doi.org/10/bzxmdn>
- Engert, F., Bonhoeffer, T., 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66–70. <https://doi.org/10/cbfdph>
- Ernfors, P., Lee, K.F., Jaenisch, R., 1994. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368, 147–150. <https://doi.org/10/b62bfx>
- Evans, S.F., Irmady, K., Ostrow, K., Kim, T., Nykjaer, A., Saftig, P., Blobel, C., Hempstead, B.L., 2011. Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *J. Biol. Chem.* 286, 29556–29567. <https://doi.org/10/dzrpp9>
- Farhadi, H.F., Mowla, S.J., Petrecca, K., Morris, S.J., Seidah, N.G., Murphy, R.A., 2000. Neurotrophin-3 Sorts to the Constitutive Secretory Pathway of Hippocampal Neurons and Is Diverted to the Regulated Secretory Pathway by Coexpression with Brain-Derived Neurotrophic Factor. *J. Neurosci.* 20, 4059–4068. <https://doi.org/10/gdds5m>
- Fawcett, J.P., Aloyz, R., McLean, J.H., Pareek, S., Miller, F.D., McPherson, P.S., Murphy, R.A., 1997. Detection of brain-derived neurotrophic factor in a vesicular fraction of brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 272, 8837–8840.
- Fenner, B.M., 2012. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 15–24. <https://doi.org/10/gddtdn>
- Ferrer, I., Marín, C., Rey, M.J., Ribalta, T., Goutan, E., Blanco, R., Tolosa, E., Martí, E., 1999. BDNF and Full-length and Truncated TrkB Expression in Alzheimer Disease. Implications

- in Therapeutic Strategies. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 729–739. <https://doi.org/10/frxn9n>
- Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, K.M., Harris, K.M., Greenberg, M.E., 1997. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19, 1031–1047.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., Matus, A., 1998. Rapid Actin-Based Plasticity in Dendritic Spines. *Neuron* 20, 847–854. <https://doi.org/10/fmq7gg>
- Flores, Á., Saravia, R., Maldonado, R., Berrendero, F., 2015. Orexins and fear: implications for the treatment of anxiety disorders. *Trends in Neurosciences* 38, 550–559. <https://doi.org/10/gc4nb4>
- Frerking, M., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., 1998. Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nat. Neurosci.* 1, 479–486. <https://doi.org/10/ftqc4h>
- Frustaci, A., Pozzi, G., Gianfagna, F., Manzoli, L., Boccia, S., 2008. Meta-analysis of the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) Val66Met polymorphism in anxiety disorders and anxiety-related personality traits. *Neuropsychobiology* 58, 163–170. <https://doi.org/10/bh6f8j>
- Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., Inokuchi, K., 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38, 447–460.
- Gaffarogullari, E.C., Masterson, L.R., Metcalfe, E.E., Traaseth, N.J., Balatri, E., Musa, M.M., Mullen, D., Distefano, M.D., Veglia, G., 2011. A Myristoyl/Phosphoserine Switch Controls cAMP-Dependent Protein Kinase Association to Membranes. *Journal of Molecular Biology* 411, 823–836. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.034>
- Gamm, D.M., Baude, E.J., Uhler, M.D., 1996. The major catalytic subunit isoforms of cAMP-dependent protein kinase have distinct biochemical properties in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 271, 15736–15742.
- Gao, Y., Jing, M., Ge, R., Lang, L., 2016. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by BDNF protects retinoblastoma cells against chemotherapy-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* 414, 77–84. <https://doi.org/10/f8dhp2>
- Gärtner, A., Staiger, V., 2002. Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6386–6391. <https://doi.org/10/b9w965>
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelières, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Leßmann, V., Humbert, S., Saudou, F., 2004. Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. *Cell* 118, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.018>
- Goodman, L.J., Valverde, J., Lim, F., Geschwind, M.D., Federoff, H.J., Geller, A.I., Hefti, F., 1996. Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 222–238. <https://doi.org/10/dtzmhm>
- Goodrich-Hunsaker, N.J., Gilbert, P.E., Hopkins, R.O., 2009. The Role of the Human Hippocampus in Odor–Place Associative Memory. *Chem Senses* 34, 513–521. <https://doi.org/10/fpxkz4>
- Gräff, J., Joseph, N.F., Horn, M.E., Samiei, A., Meng, J., Seo, J., Rei, D., Bero, A.W., Phan, T.X., Wagner, F., Holson, E., Xu, J., Sun, J., Neve, R.L., Mach, R.H., Haggarty, S.J., Tsai, L.-H., 2014. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell* 156, 261–276. <https://doi.org/10/f5pkck>
- Gratàcòs, M., González, J.R., Mercader, J.M., de Cid, R., Urretavizcaya, M., Estivill, X., 2007. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 61, 911–922. <https://doi.org/10/dgj2t4>

- Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B., Hempstead, B.L., 2009. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci* 29, 12764–12767. <https://doi.org/10/d6srg9>
- Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N., Schwartz, J.C., Sokoloff, P., 2001. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* 411, 86–89. <https://doi.org/10/fg4vht>
- Guo, J., Ji, Y., Ding, Y., Jiang, W., Sun, Y., Lu, B., Nagappan, G., 2016. BDNF pro-peptide regulates dendritic spines via caspase-3. *Cell Death & Disease* 7, e2264–e2264. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.166>
- Guo, J.-C., Yang, Y.-J., Guo, M., Wang, X.-D., Juan, Y., Gao, Y.-S., Fu, L.-Q., Jiang, X.-L., Fu, L.-M., Huang, T., 2018. Correlations of Four Genetic Single Nucleotide Polymorphisms in Brain-Derived Neurotrophic Factor with Posttraumatic Stress Disorder. *Psychiatry Investigation* 15, 407–412. <https://doi.org/10.30773/pi.2017.06.17.1>
- Guthrie, C.R., Skålhegg, B.S., McKnight, G.S., 1997. Two novel brain-specific splice variants of the murine Cbeta gene of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 29560–29565.
- Haase, G., Pettmann, B., Raoul, C., Henderson, C.E., 2008. Signaling by death receptors in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 284–291. <https://doi.org/10/c8ff34>
- Hajek, T., Kopecek, M., Höschl, C., 2012. Reduced hippocampal volumes in healthy carriers of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism: meta-analysis. *World J. Biol. Psychiatry* 13, 178–187. <https://doi.org/10/bc62xd>
- Hanks, S., Quinn, A., Hunter, T., 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42–52. <https://doi.org/10.1126/science.3291115>
- Hanks, S.K., Hunter, T., 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576–596.
- Hantzopoulos, P.A., Suri, C., Glass, D.J., Goldfarb, M.P., Yancopoulos, G.D., 1994. The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron* 13, 187–201.
- Hara, D., Fukuchi, M., Miyashita, T., Tabuchi, A., Takasaki, I., Naruse, Y., Mori, N., Kondo, T., Tsuda, M., 2009. Remote control of activity-dependent BDNF gene promoter-I transcription mediated by REST/NRSF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 506–511. <https://doi.org/10/bd5fvp>
- Hartmann, M., Heumann, R., Lessmann, V., 2001. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.* 20, 5887–5897. <https://doi.org/10/fj7m39>
- Harward, S.C., Hedrick, N.G., Hall, C.E., Parra-Bueno, P., Milner, T.A., Pan, E., Laviv, T., Hempstead, B.L., Yasuda, R., McNamara, J.O., 2016. Autocrine BDNF–TrkB signalling within a single dendritic spine. *Nature* 538, 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature19766>
- He, X.-L., Garcia, K.C., 2004. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304, 870–875. <https://doi.org/10/cdd7vt>
- Hebb, D.O., 1950. The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory. *Journal of Clinical Psychology* 6, 307–307. <https://doi.org/10/d2wwdj>
- Heldt, S.A., Stanek, L., Chhatwal, J.P., Ressler, K.J., 2007. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol. Psychiatry* 12, 656–670. <https://doi.org/10/dng6hg>
- Hempstead, B.L., 2015. Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 126, 9–19.
- Hempstead, B.L., 2014. Deciphering proneurotrophin actions. *Handb Exp Pharmacol* 220, 17–32. <https://doi.org/10/gdds5k>
- Herzog, K.H., Bailey, K., Barde, Y.A., 1994. Expression of the BDNF gene in the developing visual system of the chick. *Development* 120, 1643–1649.

- Hinckelmann, M.-V., Virlogeux, A., Niehage, C., Poujol, C., Choquet, D., Hoflack, B., Zala, D., Saudou, F., 2016. Self-propelling vesicles define glycolysis as the minimal energy machinery for neuronal transport. *Nat Commun* 7, 13233. <https://doi.org/10/f87wkt>
- Hofer, M., Pagliusi, S.R., Hohn, A., Leibrock, J., Barde, Y.A., 1990. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 9, 2459–2464.
- Hofer, S.B., Bonhoeffer, T., 2010. Dendritic spines: the stuff that memories are made of? *Curr. Biol.* 20, R157-159. <https://doi.org/10/d6f27v>
- Holmberg, C.I., Tran, S.E.F., Eriksson, J.E., Sistonen, L., 2002. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 619–627. <https://doi.org/10/d6hzf7>
- Hong, C.-J., Liou, Y.-J., Tsai, S.-J., 2011. Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain Res. Bull.* 86, 287–297. <https://doi.org/10/b55g5w>
- Hong, E.J., McCord, A.E., Greenberg, M.E., 2008a. A Biological Function for the Neuronal Activity-Dependent Component of Bdnf Transcription in the Development of Cortical Inhibition. *Neuron* 60, 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.024>
- Hong, E.J., McCord, A.E., Greenberg, M.E., 2008b. A Biological Function for the Neuronal Activity-Dependent Component of Bdnf Transcription in the Development of Cortical Inhibition. *Neuron* 60, 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.024>
- Hong, K.-W., Lim, J.-E., Go, M.J., Shin Cho, Y., Ahn, Y., Han, B.-G., Oh, B., 2012. Recapitulation of the association of the Val66Met polymorphism of BDNF gene with BMI in Koreans. *Obesity (Silver Spring)* 20, 1871–1875. <https://doi.org/10/ccm2zj>
- Horiuchi, J., Yamazaki, D., Naganos, S., Aigaki, T., Saitoe, M., 2008. Protein kinase A inhibits a consolidated form of memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20976–20981. <https://doi.org/10/fc6wcb>
- Howe, D., 2002. Molecular and Behavioral Effects of a Null Mutation in All PKA C β Isoforms. *Molecular and Cellular Neuroscience* 20, 515–524. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1119>
- Huang, Y., Roelink, H., McKnight, G.S., 2002. Protein Kinase A Deficiency Causes Axially Localized Neural Tube Defects in Mice. *Journal of Biological Chemistry* 277, 19889–19896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111412200>
- Humbert, S., Saudou, F., 2004. [Stimulation of BDNF transport by huntingtin]. *Med Sci (Paris)* 20, 952–954. <https://doi.org/10/bzq2ts>
- Humble, E., Berglund, L., Titanji, V., Ljungström, O., Edlund, B., Zetterqvist, O., Engström, L., 1975. Non-dependence on native structure of pig liver pyruvate kinase when used as a substrate for cyclic 3',5'-AMP-stimulated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 614–621.
- Hwang, J.J., Park, M.-H., Choi, S.-Y., Koh, J.-Y., 2005. Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 280, 11995–12001. <https://doi.org/10/fndj46>
- Ikeda, M., Hojo, Y., Komatsuzaki, Y., Okamoto, M., Kato, A., Takeda, T., Kawato, S., 2015. Hippocampal spine changes across the sleep-wake cycle: corticosterone and kinases. *J. Endocrinol.* 226, M13-27. <https://doi.org/10/f7ppcs>
- Ilouz, R., Lev-Ram, V., Bushong, E.A., Stiles, T.L., Friedmann-Morvinski, D., Douglas, C., Goldberg, J.L., Ellisman, M.H., Taylor, S.S., 2017. Isoform-specific subcellular localization and function of protein kinase A identified by mosaic imaging of mouse brain. *Elife* 6. <https://doi.org/10/gddw4z>
- Islam, O., Loo, T.X., Heese, K., 2009. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways. *Curr Neurovasc Res* 6, 42–53.
- Itoh, K., Hashimoto, K., Kumakiri, C., Shimizu, E., Iyo, M., 2004. Association between brain-derived neurotrophic factor 196 G/A polymorphism and personality traits in healthy

- subjects. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 124B, 61–63. <https://doi.org/10/c66mkc>
- Jensen, O.N., 2006. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 391–403. <https://doi.org/10/cpkk8j>
- Ji, H., Dai, D., Wang, Y., Jiang, D., Zhou, X., Lin, P., Ji, X., Li, J., Zhang, Y., Yin, H., Chen, R., Zhang, L., Xu, M., Duan, S., Wang, Q., 2015. Association of BDNF and BCHE with Alzheimer's disease: Meta-analysis based on 56 genetic case-control studies of 12,563 cases and 12,622 controls. *Experimental and Therapeutic Medicine* 9, 1831–1840. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2327>
- Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T.T.-T., Feng, L., Duan, S., Lu, B., 2010. Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nature Neuroscience* 13, 302–309. <https://doi.org/10/cg2pq9>
- Jiang, X., Xu, K., Hoberman, J., Tian, F., Marko, A.J., Waheed, J.F., Harris, C.R., Marini, A.M., Enoch, M.-A., Lipsky, R.H., 2005. BDNF variation and mood disorders: a novel functional promoter polymorphism and Val66Met are associated with anxiety but have opposing effects. *Neuropsychopharmacology* 30, 1353–1361. <https://doi.org/10/ct96g7>
- Johnson, D.R., Wong, S.S., 1989. Conformational changes of type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase on cAMP binding. *FEBS Letters* 247, 480–482. <https://doi.org/10/fcwtdv>
- Jungbluth, S., Bailey, K., Barde, Y.-A., 1994. Purification and characterisation of a brain-derived neurotrophic factor/ neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. *European Journal of Biochemistry* 221, 677–685. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18780.x>
- Kaech, S., Fischer, M., Doll, T., Matus, A., 1997. Isoform specificity in the relationship of actin to dendritic spines. *J. Neurosci.* 17, 9565–9572.
- Kandel, E.R., 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030–1038. <https://doi.org/10/c98tc8>
- Kandel, E.R., 1981. Calcium and the control of synaptic strength by learning. *Nature* 293, 697–700.
- Kandel, E.R., Dudai, Y., Mayford, M.R., 2014. The Molecular and Systems Biology of Memory. *Cell* 157, 163–186. <https://doi.org/10/f5xmt3>
- Kang, HJ, Schuman, E., 1995. Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Journal of Physiology-Paris* 89, 11–22. <https://doi.org/10/fh8cdn>
- Kang, H., Schuman, E.M., 1996. A Requirement for Local Protein Synthesis in Neurotrophin-Induced Hippocampal Synaptic Plasticity. *Science* 273, 1402–1406. <https://doi.org/10/b8r9fv>
- Kang, H., Schuman, E.M., 1995. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267, 1658–1662.
- Karege, F., Vaudan, G., Schwald, M., Perroud, N., La Harpe, R., 2005. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 136, 29–37. <https://doi.org/10/cb7p7w>
- Keeler, A.B., Molumby, M.J., Weiner, J.A., 2015. Protocadherins branch out: Multiple roles in dendrite development. *Cell Adhesion & Migration* 9, 214–226. <https://doi.org/10.1080/19336918.2014.1000069>
- Kellner, Y., Goedecke, N., Dierkes, T., Thieme, N., Zagrebelsky, M., Korte, M.K., 2014. The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. *Front. Synaptic Neurosci.* 6. <https://doi.org/10/gddwdc>
- Kemp, B.E., Benjamini, E., Krebs, E.G., 1976. Synthetic hexapeptide substrates and inhibitors of 3':5'-cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 1038–1042. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.4.1038>
- Kemp, B.E., Bylund, D.B., Huang, T.S., Krebs, E.G., 1975. Substrate specificity of the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 3448–3452. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3448>

- Kemp, B.E., Graves, D.J., Benjamini, E., Krebs, E.G., 1977. Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 252, 4888–4894.
- Kemp, B.E., Pearson, R.B., 1990. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends in Biochemical Sciences* 15, 342–346. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90073-K](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90073-K)
- Kerchner, G.A., Nicoll, R.A., 2008. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 813–825. <https://doi.org/10/frdw36>
- Kessels, M.M., Qualmann, B., 2015. Different functional modes of BAR domain proteins in formation and plasticity of mammalian postsynapses. *J Cell Sci* 128, 3177–3185. <https://doi.org/10/f7qdk6>
- Kesslak, J.P., So, V., Choi, J., Cotman, C.W., Gomez-Pinilla, F., 1998. Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav. Neurosci.* 112, 1012–1019.
- Kim, H.G., Wang, T., Olafsson, P., Lu, B., 1994. Neurotrophin 3 potentiates neuronal activity and inhibits gamma-aminobutyrate synaptic transmission in cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12341–12345.
- Kirkwood, A., Bear, M.F., 1994. Homosynaptic long-term depression in the visual cortex. *J. Neurosci.* 14, 3404–3412.
- Kirtley, A., Thomas, K.L., 2010. The exclusive induction of extinction is gated by BDNF. *Learn. Mem.* 17, 612–619. <https://doi.org/10/dd484k>
- Kita, T., Goydos, J., Reitman, E., Ravatn, R., Lin, Y., Shih, W.-C., Kikuchi, Y., Chin, K.-V., 2004. Extracellular cAMP-dependent protein kinase (ECPKA) in melanoma. *Cancer Lett.* 208, 187–191. <https://doi.org/10/drdz46>
- Kitts, A., Sherry, S., 2011. The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. National Center for Biotechnology Information (US).
- Klein, R., Martin-Zanca, D., Barbacid, M., Parada, L.F., 1990. Expression of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development* 109, 845–850.
- Knighton, D.R., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Sowadski, J.M., 1991. Crystallization studies of cAMP-dependent protein kinase. Cocrystals of the catalytic subunit with a 20 amino acid residue peptide inhibitor and MgATP diffract to 3.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 220, 217–220.
- Knipper, M., da Penha Berzaghi, M., Blöchl, A., Breer, H., Thoenen, H., Lindholm, D., 1994. Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 6, 668–671.
- Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M., Tsumoto, T., 2001. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 291, 2419–2423. <https://doi.org/10/fr5gd9>
- Koizumi, H., Hashimoto, K., Itoh, K., Nakazato, M., Shimizu, E., Ohgake, S., Koike, K., Okamura, N., Matsushita, S., Suzuki, K., Murayama, M., Higuchi, S., Iyo, M., 2004. Association between the brain-derived neurotrophic factor 196G/A polymorphism and eating disorders. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 127B, 125–127. <https://doi.org/10/b3n7zg>
- Kolarow, R., Brigadski, T., Lessmann, V., 2007. Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J. Neurosci.* 27, 10350–10364. <https://doi.org/10/fnk3nf>
- Konorski, J., 1949. Conditioned reflexes and neuron organization. *Calif Med* 70, 311.
- Koppel, I., Tuvikene, J., Lekk, I., Timmusk, T., 2015. Efficient use of a translation start codon in BDNF exon I. *J. Neurochem.* 134, 1015–1025. <https://doi.org/10/f7tg92>
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., Bonhoeffer, T., 1995. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 8856–8860. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8856>

- Koschinski, A., Zaccolo, M., 2017. Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling. *Sci Rep* 7, 14090. <https://doi.org/10/gcjgn2>
- Kostrzewa, R.M., Nowak, P., Kostrzewa, J.P., Kostrzewa, R.A., Brus, R., 2005. Peculiarities of L-DOPA treatment of Parkinson's disease. *Amino Acids* 28, 157–164. <https://doi.org/10/ft8qj8>
- Kovanich, D., van der Heyden, M.A.G., Aye, T.T., van Veen, T.A.B., Heck, A.J.R., Scholten, A., 2010. Sphingosine kinase interacting protein is an A-kinase anchoring protein specific for type I cAMP-dependent protein kinase. *Chembiochem* 11, 963–971. <https://doi.org/10/cngk97>
- Krebs, E.G., 1983. Historical Perspectives on Protein Phosphorylation and a Classification System for Protein Kinases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 302, 3–11. <https://doi.org/10.1098/rstb.1983.0033>
- Krebs, E.G., Beavo, J.A., 1979. Phosphorylation-Dephosphorylation of Enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 48, 923–959. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.004423>
- Krebs, E.G., Fischer, E.H., 1956. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 20, 150–157.
- Krug, M., Lössner, B., Ott, T., 1984. Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res. Bull.* 13, 39–42.
- Krüttgen, A., Möller, J.C., Heymach, J.V., Shooter, E.M., 1998. Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9614–9619.
- Kübler, D., Pyerin, W., Bill, O., Hotz, A., Sonka, J., Kinzel, V., 1989. Evidence for ecto-protein kinase activity that phosphorylates Kemptide in a cyclic AMP-dependent mode. *J. Biol. Chem.* 264, 14549–14555.
- Kübler, D., Reinhardt, D., Reed, J., Pyerin, W., Kinzel, V., 1992. Atrial natriuretic peptide is phosphorylated by intact cells through cAMP-dependent ecto-protein kinase. *European Journal of Biochemistry* 206, 179–186. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16915.x>
- Küppers, E., Beyer, C., 2001. Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport* 12, 1175–1179.
- Kvissel, A.-K., Ørstavik, S., Øistad, P., Rootwelt, T., Jahnsen, T., Skålhegg, B.S., 2004. Induction of Cbeta splice variants and formation of novel forms of protein kinase A type II holoenzymes during retinoic acid-induced differentiation of human NT2 cells. *Cell. Signal.* 16, 577–587.
- Lagalwar, S., Orr, H.T., 2013. Regulation of Ataxin-1 Phosphorylation and Its Impact on Biology, in: *Trinucleotide Repeat Protocols, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 201–209. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-411-1_13
- Langeberg, L.K., Scott, J.D., 2015. Signalling scaffolds and local organization of cellular behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 232–244. <https://doi.org/10/f66kgf>
- Lanté, F., de Jésus Ferreira, M.-C., Guiramand, J., Récasens, M., Vignes, M., 2006. Low-frequency stimulation induces a new form of LTP, metabotropic glutamate (mGlu5) receptor- and PKA-dependent, in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus* 16, 345–360. <https://doi.org/10/bzthcs>
- Lashley, K.S., 1929. Brain Mechanism and Intelligence. *Brain* 52, 548–548. <https://doi.org/10/b57gd9>
- Leal, G., Comprido, D., Duarte, C.B., 2014. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76, 639–656. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005>
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., Hempstead, B.L., 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948. <https://doi.org/10/bwggz4>

- Lefkimiatis, K., Lerondi, D., Hofer, A.M., 2013. The inner and outer compartments of mitochondria are sites of distinct cAMP/PKA signaling dynamics. *J. Cell Biol.* 202, 453–462. <https://doi.org/10/f45z3w>
- Leßmann, V., Brigadski, T., 2009. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. *Neuroscience Research* 65, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.06.004>
- Leßmann, V., Gottmann, K., Heumann, R., 1994. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport* 6, 21–25.
- Leßmann, V., Gottmann, K., Malcangio, M., 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology* 69, 341–374. <https://doi.org/10/dshj39>
- Leßmann, V., Heumann, R., 1998. Modulation of unitary glutamatergic synapses by neurotrophin-4/5 or brain-derived neurotrophic factor in hippocampal microcultures: presynaptic enhancement depends on pre-established paired-pulse facilitation. *Neuroscience* 86, 399–413.
- Levi-Montalcini, R., 1987. NGF 35 Years Later. *Science* 237.
- Levi-Montalcini, R., Meyer, H., Hamburger, V., 1954. In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *Cancer research* 14, 49–57.
- Levine, E.S., Crozier, R.A., Black, I.B., Plummer, M.R., 1998. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10235–10239.
- Li, F., Tsien, J.Z., 2009. Memory and the NMDA Receptors. *N Engl J Med* 361, 302–303. <https://doi.org/10/bk65sq>
- Li, X., Wilmanns, M., Thornton, J., Kohn, M., 2013. Elucidating Human Phosphatase-Substrate Networks. *Science Signaling* 6, rs10–rs10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003203>
- Li, Y.X., Xu, Y., Ju, D., Lester, H.A., Davidson, N., Schuman, E.M., 1998. Expression of a dominant negative TrkB receptor, T1, reveals a requirement for presynaptic signaling in BDNF-induced synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10884–10889.
- Lin, Z., Su, Y., Zhang, C., Xing, M., Ding, W., Liao, L., Guan, Y., Li, Z., Cui, D., 2013. The interaction of BDNF and NTRK2 gene increases the susceptibility of paranoid schizophrenia. *PLoS ONE* 8, e74264. <https://doi.org/10/gddtfb>
- Lindsay, R.M., Thoenen, H., Barde, Y.A., 1985. Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor. *Dev. Biol.* 112, 319–328.
- Linn, T.C., Pettit, F.H., Reed, L.J., 1969. Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62, 234–241.
- Linnarsson, S., Björklund, A., Ernfors, P., 1997. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2581–2587.
- Liotta, L.A., Kohn, E., 2004. Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* 430, 973–974. <https://doi.org/10/dxbh7z>
- Lisman, J., 2003. Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 829–842. <https://doi.org/10/fp5wwj>
- Lisman, J.E., 2009. The pre/post LTP debate. *Neuron* 63, 281–284. <https://doi.org/10/bg4cj5>
- Liu, I.Y.C., Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Thompson, R.F., 2004. Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *J. Neurosci.* 24, 7958–7963. <https://doi.org/10/bhqthk>
- Liu, L., Foroud, T., Xuei, X., Berrettini, W., Byerley, W., Coryell, W., El-Mallakh, R., Gershon, E.S., Kelsoe, J.R., Lawson, W.B., MacKinnon, D.F., McClinnis, M., McMahon, F.J., Murphy, D.L., Rice, J., Scheftner, W., Zandi, P.P., Lohoff, F.W., Niculescu, A.B., Meyer, E.T., Edenberg,

- H.J., Nurnberger, J.I., 2008. Evidence of association between brain-derived neurotrophic factor gene and bipolar disorder: *Psychiatric Genetics* 18, 267–274. <https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e3283060f59>
- Liu, Q.-R., Lu, L., Zhu, X.-G., Gong, J.-P., Shaham, Y., Uhl, G.R., 2006. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res.* 1067, 1–12. <https://doi.org/10/fbgwvf>
- Loh, E., Peter, F., Subramaniam, V.N., Hong, W., 2005. Mammalian Bet3 functions as a cytosolic factor participating in transport from the ER to the Golgi apparatus. *J. Cell. Sci.* 118, 1209–1222. <https://doi.org/10/dztrcq>
- Lohof, A.M., Ip, N.Y., Poo, M.M., 1993. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 363, 350–353. <https://doi.org/10/d6wncm>
- Lou, H., Kim, S.-K., Zaitsev, E., Snell, C.R., Lu, B., Loh, Y.P., 2005. Sorting and Activity-Dependent Secretion of BDNF Require Interaction of a Specific Motif with the Sorting Receptor Carboxypeptidase E. *Neuron* 45, 245–255. <https://doi.org/10/dj5n3d>
- Lu, B., Nagappan, G., Lu, Y., 2014. BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction, in: Lewin, G.R., Carter, B.D. (Eds.), *Neurotrophic Factors*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 223–250. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_9
- Lu, B., Pang, P.T., Woo, N.H., 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 603–614. <https://doi.org/10.1038/nrn1726>
- Lu, Y., Zha, X., Kim, E.Y., Schachtele, S., Dailey, M.E., Hall, D.D., Strack, S., Green, S.H., Hoffman, D.A., Hell, J.W., 2011. A Kinase Anchor Protein 150 (AKAP150)-associated Protein Kinase A Limits Dendritic Spine Density. *J. Biol. Chem.* 286, 26496–26506. <https://doi.org/10/fwfgb3>
- Lueptow, L.M., 2017. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp.* <https://doi.org/10/gddwdd>
- Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Ricaurte, G.A., Coppola, V., Reid, S.W., Bora, S.H., Wihler, C., Koliatsos, V.E., Tessarollo, L., 1999. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 15239–15244.
- Ma, L., Wang, D.-D., Zhang, T.-Y., Yu, H., Wang, Y., Huang, S.-H., Lee, F.S., Chen, Z.-Y., 2011. Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation. *J. Neurosci.* 31, 2079–2090. <https://doi.org/10/bf4qm3>
- Ma, Q., Yang, J., Li, T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., 2015. Selective reduction of striatal mature BDNF without induction of proBDNF in the zQ175 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease* 82, 466–477. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.008>
- Madinier, A., Bertrand, N., Mossiat, C., Prigent-Tessier, A., Beley, A., Marie, C., Garnier, P., 2009. Microglial Involvement in Neuroplastic Changes Following Focal Brain Ischemia in Rats. *PLOS ONE* 4, e8101. <https://doi.org/10/fw4s7h>
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R.F., Wiegand, S.J., Furth, M.E., Lindsay, R.M., Yancopoulos, G.D., 1990. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5, 501–509.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., Svoboda, K., 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283, 1923–1927.
- Manning, G., 2002. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298, 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Martínez-Ezquerro, J.D., Rendón-Macías, M.E., Zamora-Mendoza, G., Serrano-Meneses, J., Rosales-Rodríguez, B., Escalante-Bautista, D., Rodríguez-Cruz, M., Sánchez-González, R., Arellano-Pineda, Y., López-Alarcón, M., Zampedri, M.C., Rosas-Vargas, H., 2017. Association Between the Brain-derived Neurotrophic Factor Val66Met Polymorphism and Overweight/Obesity in Pediatric Population. *Arch. Med. Res.* 48, 599–608. <https://doi.org/10/gddtd9>

- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., Sun, Y.E., 2003. DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity-Dependent Bdnf Gene Regulation. *Science* 302, 890–893. <https://doi.org/10/fs5zdn>
- Martinowich, K., Lu, B., 2008. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 33, 73–83. <https://doi.org/10/fkfxrw>
- Martinowich, K., Schloesser, R.J., Jimenez, D.V., Weinberger, D.R., Lu, B., 2011. Activity-dependent brain-derived neurotrophic factor expression regulates cortistatin-interneurons and sleep behavior. *Molecular Brain* 4, 11. <https://doi.org/10/cvm45b>
- Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., Poo, M. -m., 2009. Differential Activity-Dependent Secretion of Brain-Derived Neurotrophic Factor from Axon and Dendrite. *Journal of Neuroscience* 29, 14185–14198. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1863-09.2009>
- Matsumoto, T., Rauskolb, S., Polack, M., Klose, J., Kolbeck, R., Korte, M., Barde, Y.-A., 2008. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nature Neuroscience* 11, 131–133. <https://doi.org/10.1038/nn2038>
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H., 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766. <https://doi.org/10/dqxmd8>
- Maurice, D.H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., Manganiello, V.C., 2014. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* 13, 290–314. <https://doi.org/10/gdf38w>
- Mavillard, F., Hidalgo, J., Megias, D., Levitsky, K.L., Velasco, A., 2010. PKA-mediated Golgi remodeling during cAMP signal transmission. *Traffic* 11, 90–109. <https://doi.org/10/ccgtmc>
- Maynard, K.R., Hobbs, J.W., Sukumar, M., Kardian, A.S., Jimenez, D.V., Schloesser, R.J., Martinowich, K., 2017. Bdnf mRNA splice variants differentially impact CA1 and CA3 dendrite complexity and spine morphology in the hippocampus. *Brain Struct Funct* 222, 3295–3307. <https://doi.org/10/gbwppw>
- Means, C.K., Lygren, B., Langeberg, L.K., Jain, A., Dixon, R.E., Vega, A.L., Gold, M.G., Petrosyan, S., Taylor, S.S., Murphy, A.N., Ha, T., Santana, L.F., Tasken, K., Scott, J.D., 2011. An entirely specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, E1227–1235. <https://doi.org/10/bt9gb2>
- Meier, R., Becker-André, M., Götz, R., Heumann, R., Shaw, A., Thoenen, H., 1986. Molecular cloning of bovine and chick nerve growth factor (NGF): delineation of conserved and unconserved domains and their relationship to the biological activity and antigenicity of NGF. *EMBO J.* 5, 1489–1493.
- Messaoudi, E., Bårdsen, K., Srebro, B., Bramham, C.R., 1998. Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 79, 496–499. <https://doi.org/10/gddv9m>
- Messaoudi, E., Kanhema, T., Soulé, J., Tiron, A., Dageyte, G., da Silva, B., Bramham, C.R., 2007. Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* 27, 10445–10455. <https://doi.org/10/btsjqt>
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., Crowell, T., Cate, R.L., McCoy, J.M., Pepinsky, R.B., 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat. Neurosci.* 7, 221–228. <https://doi.org/10/d5kxrj>
- Michalski, B., Fahnstock, M., 2003. Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 111, 148–154.
- Milner, B., 1958. Psychological defects produced by temporal lobe excision. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 36, 244–257.

- Minichiello, L., 2009. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 850–860. <https://doi.org/10/bj5jdc>
- Minichiello, L., Calella, A.M., Medina, D.L., Bonhoeffer, T., Klein, R., Korte, M., 2002. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36, 121–137.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfner, D., Kühn, R., Unsicker, K., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Lipp, H.P., Bonhoeffer, T., Klein, R., 1999. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24, 401–414.
- Mitchellmore, C., Gede, L., 2014. Brain derived neurotrophic factor: Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Brain Research* 1586, 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.06.037>
- Mizoguchi, H., Nakade, J., Tachibana, M., Ibi, D., Someya, E., Koike, H., Kamei, H., Nabeshima, T., Itohara, S., Takuma, K., Sawada, M., Sato, J., Yamada, K., 2011. Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylenetetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus. *J. Neurosci.* 31, 12963–12971. <https://doi.org/10/dkzp94>
- Mizui, T., Ishikawa, Y., Kumanogoh, H., Lume, M., Matsumoto, T., Hara, T., Yamawaki, S., Takahashi, M., Shiosaka, S., Itami, C., Uegaki, K., Saarma, M., Kojima, M., 2015. BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E3067–E3074. <https://doi.org/10/f7ftxj>
- Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., Nabeshima, T., 2000. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J. Neurosci.* 20, 7116–7121.
- Mkhikian, H., Grigorian, A., Li, C.F., Chen, H.-L., Newton, B., Zhou, R.W., Beeton, C., Torossian, S., Tatarian, G.G., Lee, S.-U., Lau, K., Walker, E., Siminovitch, K.A., Chandy, K.G., Yu, Z., Dennis, J.W., Demetriou, M., 2011. Genetics and the environment converge to dysregulate N-glycosylation in multiple sclerosis. *Nat Commun* 2, 334. <https://doi.org/10/bm2v8x>
- Modarresi, F., Faghihi, M.A., Lopez-Toledano, M.A., Fatemi, R.P., Magistri, M., Brothers, S.P., van der Brug, M.P., Wahlestedt, C., 2012. Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nature Biotechnology* 30, 453–459. <https://doi.org/10.1038/nbt.2158>
- Molendijk, M.L., Bus, B.A.A., Spinhoven, P., Kaimatzoglou, A., Oude Voshaar, R.C., Penninx, B.W.J.H., van IJzendoorn, M.H., Elzinga, B.M., 2012. A systematic review and meta-analysis on the association between BDNF val(66)met and hippocampal volume—a genuine effect or a winners curse? *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 159B, 731–740. <https://doi.org/10/f38xmc>
- Molendijk, M.L., Spinhoven, P., Polak, M., Bus, B. a. A., Penninx, B.W.J.H., Elzinga, B.M., 2014. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Mol. Psychiatry* 19, 791–800. <https://doi.org/10/f582k9>
- Möller, J.C., Krüttgen, A., Heymach, J.V., Ghori, N., Shooter, E.M., 1998. Subcellular localization of epitope-tagged neurotrophins in neuroendocrine cells. *J. Neurosci. Res.* 51, 463–472. <https://doi.org/10/bkzrzv>
- Montag, C., Weber, B., Fliessbach, K., Elger, C., Reuter, M., 2009. The BDNF Val66Met polymorphism impacts parahippocampal and amygdala volume in healthy humans: incremental support for a genetic risk factor for depression. *Psychol Med* 39, 1831–1839. <https://doi.org/10/d5fzgp>
- Moore, A., Boulton, A.P., Heid, H.W., Jarasch, E.D., Craig, R.K., 1985. Purification and tissue-specific expression of casein kinase from the lactating guinea-pig mammary gland. *Eur. J. Biochem.* 152, 729–737.

- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774–776. <https://doi.org/10/dp9qm7>
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.
- Morrow, E.M., Yoo, S.-Y., Flavell, S.W., Kim, T.-K., Lin, Y., Hill, R.S., Mukaddes, N.M., Balkhy, S., Gascon, G., Hashmi, A., Al-Saad, S., Ware, J., Joseph, R.M., Greenblatt, R., Gleason, D., Ertelt, J.A., Apse, K.A., Bodell, A., Partlow, J.N., Barry, B., Yao, H., Markianos, K., Ferland, R.J., Greenberg, M.E., Walsh, C.A., 2008. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* 321, 218–223. <https://doi.org/10/br3kcw>
- Moser, E.I., Kropff, E., Moser, M.-B., 2008. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 69–89. <https://doi.org/10/cp3pb4>
- Moser, M.-B., Rowland, D.C., Moser, E.I., 2015. Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a021808. <https://doi.org/10/f632c3>
- Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G., Murphy, R.A., 2001. Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor. *J. Biol. Chem.* 276, 12660–12666. <https://doi.org/10/fdnqz2>
- Mowla, S.J., Pareek, S., Farhadi, H.F., Petrecca, K., Fawcett, J.P., Seidah, N.G., Morris, S.J., Sossin, W.S., Murphy, R.A., 1999. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19, 2069–2080.
- Murer, M.G., Yan, Q., Raisman-Vozari, R., 2001. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 63, 71–124.
- Nagahara, A.H., Tuszynski, M.H., 2011. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 10, 209–219. <https://doi.org/10/c6vn6m>
- Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V.V., Yang, J., Hempstead, B.L., Lu, B., 2009. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 1267–1272. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807322106>
- Nagata, T., Shinagawa, S., Nukariya, K., Ochiai, Y., Kawamura, S., Agawa-Ohta, M., Kasahara, H., Nakayama, K., Yamada, H., 2011. Association between brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphisms and executive function in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 11, 141–149. <https://doi.org/10/bgtdmv>
- Neuberger, G., Schneider, G., Eisenhaber, F., 2007. pKaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biology Direct* 23.
- Nigg, E.A., 1990. Mechanisms of signal transduction to the cell nucleus. *Adv. Cancer Res.* 55, 271–310.
- Ninan, I., Bath, K.G., Dagar, K., Perez-Castro, R., Plummer, M.R., Lee, F.S., Chao, M.V., 2010. The BDNF Val66Met Polymorphism Impairs NMDA Receptor-Dependent Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience* 30, 8866–8870. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1405-10.2010>
- Notaras, M., Hill, R., van den Buuse, M., 2015. The BDNF gene Val66Met polymorphism as a modifier of psychiatric disorder susceptibility: progress and controversy. *Mol. Psychiatry* 20, 916–930. <https://doi.org/10/f7mgg4>
- Obenauer, J.C., 2003. Scansite 2.0: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Research* 31, 3635–3641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg584>
- Oe, S., Yoneda, Y., 2010. Cytoplasmic polyadenylation element-like sequences are involved in dendritic targeting of BDNF mRNA in hippocampal neurons. *FEBS Lett.* 584, 3424–3430. <https://doi.org/10/bmhxc5>

- O'Keefe, J., 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.* 51, 78–109.
- O'Keefe, J., Nadel, L., 1978. *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press; Oxford University Press, Oxford; New York.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., Mann, M., 2006. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell* 127, 635–648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>
- Olton, D.S., 1983. The use of animal models to evaluate the effects of neurotoxins on cognitive processes. *Neurobehav Toxicol Teratol* 5, 635–640.
- Olton, D.S., 1979. Mazes, maps, and memory. *Am Psychol* 34, 583–596.
- Olton, D.S., Papas, B.C., 1979. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17, 669–682.
- Olton, D.S., Samuelson, R.J., 1976. Remembrance of Places Passed: Spatial Memory in Rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 2, 20.
- O'Neill, K.M., Donohue, K.E., Omelchenko, A., Firestein, B.L., 2018. The 3' UTRs of Brain-Derived Neurotrophic Factor transcripts differentially regulate the dendritic arbor. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12, 60. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00060>
- Ozçelik, T., Rosenthal, A., Francke, U., 1991. Chromosomal mapping of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 genes in man and mouse. *Genomics* 10, 569–575.
- Pang, P.T., 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/Plasmin Is Essential for Long-Term Hippocampal Plasticity. *Science* 306, 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.1100135>
- Pang, P.T., Nagappan, G., Guo, W., Lu, B., 2016. Extracellular and intracellular cleavages of proBDNF required at two distinct stages of late-phase LTP. *npj Science of Learning* 1, 16003. <https://doi.org/10/gdds5s>
- Park, J.J., Cawley, N.X., Loh, Y.P., 2008. A bi-directional carboxypeptidase E-driven transport mechanism controls BDNF vesicle homeostasis in hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 39, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.05.016>
- Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A., Martin, K.C., Rose, J.C., Kandel, E.R., 1996. Recombinant BDNF Rescues Deficits in Basal Synaptic Transmission and Hippocampal LTP in BDNF Knockout Mice. *Neuron* 16, 1137–1145. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80140-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80140-3)
- Patterson, S.L., Grover, L.M., Schwartzkroin, P.A., Bothwell, M., 1992. Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 9, 1081–1088.
- Pattwell, S.S., Bath, K.G., Perez-Castro, R., Lee, F.S., Chao, M.V., Ninan, I., 2012. The BDNF Val66Met polymorphism impairs synaptic transmission and plasticity in the infralimbic medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 32, 2410–2421. <https://doi.org/10/f3wkxm>
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E.J., Fahnstock, M., 2005. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 93, 1412–1421. <https://doi.org/10/c39nf8>
- Perroud, N., Courtet, P., Vincze, I., Jausent, I., Jollant, F., Bellivier, F., Leboyer, M., Baud, P., Buresi, C., Malafosse, A., 2008. Interaction between BDNF Val66Met and childhood trauma on adult's violent suicide attempt. *Genes Brain Behav.* 7, 314–322. <https://doi.org/10/ctkg5k>
- Peters, J., Dieppa-Perea, L.M., Melendez, L.M., Quirk, G.J., 2010. Induction of Fear Extinction with Hippocampal-Infralimbic BDNF. *Science* 328, 1288–1290. <https://doi.org/10.1126/science.1186909>
- Petzold, A., Psotta, L., Brigadski, T., Endres, T., Lessmann, V., 2015. Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment in spatial learning. *Neurobiol Learn Mem* 120, 52–60. <https://doi.org/10/gddwdf>

- Pezawas, L., Verchinski, B.A., Mattay, V.S., Callicott, J.H., Kolachana, B.S., Straub, R.E., Egan, M.F., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D.R., 2004. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J. Neurosci.* 24, 10099–10102. <https://doi.org/10/db5dfj>
- Pluchino, N., Russo, M., Santoro, A.N., Litta, P., Cela, V., Genazzani, A.R., 2013. Steroid hormones and BDNF. *Neuroscience, Steroid hormone actions in the CNS: the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* 239, 271–279. <https://doi.org/10/f4r775>
- Poo, M.M., 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 24–32. <https://doi.org/10/fhkg3b>
- Poucet, B., Save, E., Lenck-Santini, P.P., 2000. Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Rev Neurosci* 11, 95–111.
- Probst, B., Rock, R., Gessler, M., Vortkamp, A., Püschel, A.W., 2007. The rodent Four-jointed ortholog Fjx1 regulates dendrite extension. *Developmental Biology* 312, 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.054>
- Pruunsild, P., Kazantseva, A., Aid, T., Palm, K., Timmusk, T., 2007. Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90, 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.05.004>
- Pruunsild, P., Sepp, M., Orav, E., Koppel, I., Timmusk, T., 2011. Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J. Neurosci.* 31, 3295–3308. <https://doi.org/10/bk6wgk>
- Qi, M., Zhuo, M., Skålhegg, B.S., Brandon, E.P., Kandel, E.R., McKnight, G.S., Idzerda, R.L., 1996. Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the Cbeta1 catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *PNAS* 93, 1571–1576. <https://doi.org/10/bqbsfk>
- Qian, X., Riccio, A., Zhang, Y., Ginty, D.D., 1998. Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron* 21, 1017–1029.
- Radin, D.P., Patel, P., 2017. BDNF: An Oncogene or Tumor Suppressor? *Anticancer Res.* 37, 3983–3990. <https://doi.org/10/gddngq>
- Radiske, A., Rossato, J.I., Köhler, C.A., Gonzalez, M.C., Medina, J.H., Cammarota, M., 2015. Requirement for BDNF in the reconsolidation of fear extinction. *J. Neurosci.* 35, 6570–6574. <https://doi.org/10/f68www>
- Rao, V.R., Finkbeiner, S., 2007. NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends in Neurosciences* 30, 284–291. <https://doi.org/10/c7d6p4>
- Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 361, 1545–1564. <https://doi.org/10/d8gw5t>
- Ribasés, M., Gratacòs, M., Fernández-Aranda, F., Bellodi, L., Boni, C., Anderluh, M., Cavallini, M.C., Cellini, E., Di Bella, D., Erzegovesi, S., Foulon, C., Gabrovsek, M., Gorwood, P., Hebebrand, J., Hinney, A., Holliday, J., Hu, X., Karwautz, A., Kipman, A., Komel, R., Nacmias, B., Remschmidt, H., Ricca, V., Sorbi, S., Wagner, G., Treasure, J., Collier, D.A., Estivill, X., 2004. Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1205–1212. <https://doi.org/10/b3n54x>
- Rock, R., Heinrich, A.C., Schumacher, N., Gessler, M., 2005. Fjx1: A notch-inducible secreted ligand with specific binding sites in developing mouse embryos and adult brain. *Developmental Dynamics* 234, 602–612. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20553>
- Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G., Barde, Y.A., 1990. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4, 487–492.
- Rösch, H., Schweigreiter, R., Bonhoeffer, T., Barde, Y.-A., Korte, M., 2005. The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7362–7367. <https://doi.org/10/bgw3kw>
- Roux, P.P., Barker, P.A., 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology* 67, 203–233. <https://doi.org/10/fdnz83>

- Sacco, F., Perfetto, L., Castagnoli, L., Cesareni, G., 2012. The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Letters* 586, 2732–2739. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.008>
- Saghazadeh, A., Rezaei, N., 2017. Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Autism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Autism Dev Disord* 47, 1018–1029. <https://doi.org/10/f92z9m>
- Sakata, K., Woo, N.H., Martinowich, K., Greene, J.S., Schloesser, R.J., Shen, L., Lu, B., 2009. Critical role of promoter IV-driven BDNF transcription in GABAergic transmission and synaptic plasticity in the prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5942–5947. <https://doi.org/10/cd5pnb>
- Sampathkumar, C., Wu, Y.-J., Vadhvani, M., Trimbuch, T., Eickholt, B., Rosenmund, C., 2016. Loss of MeCP2 disrupts cell autonomous and autocrine BDNF signaling in mouse glutamatergic neurons. *eLife Sciences* 5, e19374. <https://doi.org/10/f9rkk6>
- Sanderson, J.L., Dell'Acqua, M.L., 2011. AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity. *Neuroscientist* 17, 321–336. <https://doi.org/10.1177/1073858410384740>
- Sandhu, P., Naeem, M.M., Lu, C., Kumarathasan, P., Gomes, J., Basak, A., 2017. Ser422 phosphorylation blocks human Tau cleavage by caspase-3: Biochemical implications to Alzheimer's Disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27, 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.087>
- Santi, S., Cappello, S., Riccio, M., Bergami, M., Aicardi, G., Schenk, U., Matteoli, M., Canossa, M., 2006. Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *EMBO J.* 25, 4372–4380. <https://doi.org/10/dzgzps>
- Schenkel, L.C., Segal, J., Becker, J.A., Manfro, G.G., Bianchin, M.M., Leistner-Segal, S., 2010. The BDNF Val66Met polymorphism is an independent risk factor for high lethality in suicide attempts of depressed patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 940–944. <https://doi.org/10/d3rn29>
- Schultz, C., Engelhardt, M., 2014. Anatomy of the Hippocampal Formation, in: Szabo, K., Hennerici, M.G. (Eds.), *Frontiers of Neurology and Neuroscience*. S. KARGER AG, Basel, pp. 6–17. <https://doi.org/10.1159/000360925>
- Scott, J., Selby, M., Urdea, M., Quiroga, M., Bell, G.I., Rutter, W.J., 1983. Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. *Nature* 302, 538–540.
- Scott, J.D., Fischer, E.H., Demaille, J.G., Krebs, E.G., 1985. Identification of an inhibitory region of the heat-stable protein inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4379–4383.
- Scott, J.D., Glaccum, M.B., Fischer, E.H., Krebs, E.G., 1986. Primary-structure requirements for inhibition by the heat-stable inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 1613–1616.
- Scoville, W.B., Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.
- Seet, B.T., Dikic, I., Zhou, M.-M., Pawson, T., 2006. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 473–483. <https://doi.org/10.1038/nrm1960>
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M., Murphy, R.A., 1996. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Letters* 379, 247–250. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01520-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01520-5)
- Sendtner, M., Holtmann, B., Kolbeck, R., Thoenen, H., Barde, Y.-A., 1992. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 360, 757–759. <https://doi.org/10/d4pmp5>

- Seroogy, K.B., Lundgren, K.H., Tran, T.M., Guthrie, K.M., Isackson, P.J., Gall, C.M., 1994. Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *J. Comp. Neurol.* 342, 321–334. <https://doi.org/10/b4fpkv>
- Shaltiel, S., Schwartz, I., Korc-Grodzicki, B., Kreizman, T., 1993. Evidence for an extra-cellular function for protein kinase A. *Mol. Cell. Biochem.* 127–128, 283–291.
- Shanks, R.A., Steadman, B.T., Schmidt, P.H., Goldenring, J.R., 2002. AKAP350 at the Golgi apparatus. I. Identification of a distinct Golgi apparatus targeting motif in AKAP350. *J. Biol. Chem.* 277, 40967–40972. <https://doi.org/10/bkcjhz>
- Sharma, P., McNeill, H., 2013. Fat and Dachshous cadherins. *Prog Mol Biol Transl Sci* 116, 215–235. <https://doi.org/10/gddm79>
- Shennan, K.I.J., Taylor, N.A., Jermany, J.L., Matthews, G., Docherty, K., 1995. Differences in pH Optima and Calcium Requirements for Maturation of the Prohormone Convertases PC2 and PC3 Indicates Different Intracellular Locations for These Events. *J. Biol. Chem.* 270, 1402–1407. <https://doi.org/10/dkxbrm>
- Shi, Y., 2009. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* 139, 468–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.006>
- Shimojo, M., Courchet, J., Pieraut, S., Torabi-Rander, N., Sando, R., Polleux, F., Maximov, A., 2015. SNAREs Controlling Vesicular Release of BDNF and Development of Callosal Axons. *Cell Rep* 11, 1054–1066. <https://doi.org/10/gddtcp>
- Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S., Wang, Y., 1992. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 201–206.
- Sim, A.T., Scott, J.D., 1999. Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell Calcium* 26, 209–217. <https://doi.org/10/dbd9xp>
- Skålhegg, B.S., Huang, Y., Su, T., Idzerda, R.L., McKnight, G.S., Burton, K.A., 2002. Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol. Endocrinol.* 16, 630–639. <https://doi.org/10.1210/mend.16.3.0793>
- Skaper, S.D., 2008. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7, 46–62.
- Skeberdis, V.A., Chevaleyre, V., Lau, C.G., Goldberg, J.H., Pettit, D.L., Suadicani, S.O., Lin, Y., Bennett, M.V.L., Yuste, R., Castillo, P.E., Zukin, R.S., 2006. Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* 9, 501–510. <https://doi.org/10/db9vhq>
- Skilleter, A.J., Weickert, C.S., Moustafa, A.A., Gendy, R., Chan, M., Arifin, N., Mitchell, P.B., Weickert, T.W., 2014. BDNF val66met genotype and schizotypal personality traits interact to influence probabilistic association learning. *Behav. Brain Res.* 274, 137–142. <https://doi.org/10/f6m65m>
- Skroblin, P., Grossmann, S., Schäfer, G., Rosenthal, W., Klusmann, E., 2010. Mechanisms of protein kinase A anchoring. *Int Rev Cell Mol Biol* 283, 235–330. <https://doi.org/10/fr875>
- Søberg, K., Jahnsen, T., Rognes, T., Skålhegg, B.S., Laerdahl, J.K., 2013. Evolutionary paths of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) catalytic subunits. *PLoS ONE* 8, e60935. <https://doi.org/10/gddtfn>
- Song, M., Lee, F.S., 2016. New Insights into the Biology of the BDNF Transcriptional ‘Code.’ *Neuropsychopharmacology* 41, 1941–1942. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.29>
- Spacek, J., Harris, K.M., 2004. Trans-Endocytosis via Spinules in Adult Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* 24, 4233–4241. <https://doi.org/10/bnbsvq>
- Squire, L.R., 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82, 171–177. <https://doi.org/10/d3rnqf>
- Stastna, M., Eyk, J.E.V., 2012. Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. *PROTEOMICS* 12, 722–735. <https://doi.org/10/dj6fc5>
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B., Buetow, K.H., Schaefer,

- C.F., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Jordan, H., Moore, T., Max, S.I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A.A., Rubin, G.M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Usdin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S.S., Loquellano, N.A., Peters, G.J., Abramson, R.D., Mullahy, S.J., Bosak, S.A., McEwan, P.J., McKernan, K.J., Malek, J.A., Gunaratne, P.H., Richards, S., Worley, K.C., Hale, S., Garcia, A.M., Gay, L.J., Hulyk, S.W., Villalon, D.K., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Lu, X., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, Anuradha, Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madan, Anup, Young, A.C., Shevchenko, Y., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Touchman, J.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S.N., Krzywinski, M.I., Skalska, U., Smailus, D.E., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J.M., Marra, M.A., Mammalian Gene Collection Program Team, 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899–16903. <https://doi.org/10/bqdrwj>
- Suter, U., Heymach, J.V., Shooter, E.M., 1991. Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *EMBO J.* 10, 2395–2400.
- Sutherland, E.W., Wosilait, W.D., 1955. Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* 175, 169–170.
- Sweatt, J.D., 1999. Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learn. Mem.* 6, 399–416.
- Tabuchi, A., Yamada, T., Sasagawa, S., Naruse, Y., Mori, N., Tsuda, M., 2002. REST4-mediated modulation of REST/NRSF-silencing function during BDNF gene promoter activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 415–420. <https://doi.org/10/d458tx>
- Tagliabracci, V.S., Engel, J.L., Wen, J., Wiley, S.E., Worby, C.A., Kinch, L.N., Xiao, J., Grishin, N.V., Dixon, J.E., 2012. Secreted Kinase Phosphorylates Extracellular Proteins That Regulate Biomineralization. *Science* 336, 1150–1153. <https://doi.org/10.1126/science.1217817>
- Tagliabracci, V.S., Pinna, L.A., Dixon, J.E., 2013. Secreted protein kinases. *Trends in Biochemical Sciences* 38, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.11.008>
- Tagliabracci, V.S., Wiley, S.E., Guo, X., Kinch, L.N., Durrant, E., Wen, J., Xiao, J., Cui, J., Nguyen, K.B., Engel, J.L., Coon, J.J., Grishin, N., Pinna, L.A., Pagliarini, D.J., Dixon, J.E., 2015. A Single Kinase Generates the Majority of the Secreted Phosphoproteome. *Cell* 161, 1619–1632. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.028>
- Tagliablatela, G., Hogan, D., Zhang, W.-R., Dineley, K.T., 2009. Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behav. Brain Res.* 200, 95–99. <https://doi.org/10/c4thfg>
- Tan, Y.L., Zhou, D.F., Cao, L.Y., Zou, Y.Z., Zhang, X.Y., 2005a. Decreased BDNF in serum of patients with chronic schizophrenia on long-term treatment with antipsychotics. *Neurosci. Lett.* 382, 27–32. <https://doi.org/10/bvs49m>
- Tan, Y.L., Zhou, D.F., Zhang, X.Y., 2005b. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenic patients with tardive dyskinesia: association with dyskinesic movements. *Schizophr. Res.* 74, 263–270. <https://doi.org/10/cvfzmk>
- Tanaka, J.-I., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H., 2008. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319, 1683–1687. <https://doi.org/10/cdw5k2>
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E., 1998. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709–726.
- Tao, X., West, A.E., Chen, W.G., Corfas, G., Greenberg, M.E., 2002. A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron* 33, 383–395.

- Taskén, K., Aandahl, E.M., 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol. Rev.* 84, 137–167. <https://doi.org/10/dhzhqz>
- Taskén, K., Solberg, R., Zhao, Y., Hansson, V., Jahnsen, T., Siciliano, M.J., 1996. The gene encoding the catalytic subunit C alpha of cAMP-dependent protein kinase (locus PRKACA) localizes to human chromosome region 19p13.1. *Genomics* 36, 535–538. <https://doi.org/10/dp3786>
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., Kraemer, R.T., Nykjaer, A., Hempstead, B.L., 2005. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci.* 25, 5455–5463. <https://doi.org/10/fsjq9q>
- Teng, K.K., Felice, S., Kim, T., Hempstead, B.L., 2010. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol* 70, 350–359. <https://doi.org/10/dqc3fm>
- Tennant-Eyles, A.J., Moffitt, H., Whitehouse, C.A., Roberts, R.G., 2011. Characterisation of the FAM69 family of cysteine-rich endoplasmic reticulum proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406, 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.076>
- Tenorio, M.J., Luchsinger, C., Mardones, G.A., 2015. Protein Kinase A Activity Is Necessary for Fission and Fusion of Golgi to Endoplasmic Reticulum Retrograde Tubules. *PLOS ONE* 10, e0135260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135260>
- Terracciano, A., Piras, M.G., Lobina, M., Mulas, A., Meirelles, O., Sutin, A.R., Chan, W., Sanna, S., Uda, M., Crisponi, L., Schlessinger, D., 2013. Genetics of serum BDNF: Meta-analysis of the Val66Met and genome-wide association study. *World J Biol Psychiatry* 14. <https://doi.org/10/bnzxsd>
- Tholey, A., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Kinzel, V., Reed, J., 2001. Influence of Myristoylation, Phosphorylation, and Deamidation on the Structural Behavior of the N-Terminus of the Catalytic Subunit of CAMP-Dependent Protein Kinase †. *Biochemistry* 40, 225–231. <https://doi.org/10.1021/bi0021277>
- Thomas, K., Davies, A., 2005. Neurotrophins: A Ticket to Ride for BDNF. *Current Biology* 15, R262–R264. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.03.023>
- Tian, F., Hu, X.-Z., Wu, X., Jiang, H., Pan, H., Marini, A.M., Lipsky, R.H., 2009. Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor-mediated activation of Bdnf gene promoter 1. *J. Neurochem.* 109, 1375–1388. <https://doi.org/10/db3wxp>
- Tillo, S.E., Xiong, W.-H., Takahashi, M., Miao, S., Andrade, A.L., Fortin, D.A., Yang, G., Qin, M., Smoody, B.F., Stork, P.J.S., Zhong, H., 2017. Liberated PKA Catalytic Subunits Associate with the Membrane via Myristoylation to Preferentially Phosphorylate Membrane Substrates. *Cell Reports* 19, 617–629. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.070>
- Timmusk, T., Belluardo, N., Persson, H., Metsis, M., 1994. Developmental regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNAs transcribed from different promoters in the rat brain. *Neuroscience* 60, 287–291. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90242-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90242-9)
- Timmusk, T., Palm, K., Lendahl, U., Metsis, M., 1999. Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element. *J. Biol. Chem.* 274, 1078–1084.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., Persson, H., 1993. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10, 475–489. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90335-O](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90335-O)
- Tomasoni, R., Morini, R., Lopez-Atalaya, J.P., Corradini, I., Canzi, A., Rasile, M., Mantovani, C., Pozzi, D., Garlanda, C., Mantovani, A., Menna, E., Barco, A., Matteoli, M., 2017. Lack of IL-1R8 in neurons causes hyperactivation of IL-1 receptor pathway and induces MECP2-dependent synaptic defects. *eLife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.21735>

- Tongiorgi, E., Sartori, A., Baj, G., Bratina, A., Di Cola, F., Zorzon, M., Pizzolato, G., 2012. Altered serum content of brain-derived neurotrophic factor isoforms in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 320, 161–165. <https://doi.org/10/f2g8fm>
- Torres, J., Rodriguez, J., Myers, M.P., Valiente, M., Graves, J.D., Tonks, N.K., Pulido, R., 2003. Phosphorylation-regulated Cleavage of the Tumor Suppressor PTEN by Caspase-3. *Journal of Biological Chemistry* 278, 30652–30660. <https://doi.org/10/fmsg75>
- Torres-Quesada, O., Mayrhofer, J.E., Stefan, E., 2017. The many faces of compartmentalized PKA signalosomes. *Cell. Signal.* 37, 1–11. <https://doi.org/10/gbv934>
- Trajkovska, V., Marcussen, A.B., Vinberg, M., Hartvig, P., Aznar, S., Knudsen, G.M., 2007. Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data. *Brain Res. Bull.* 73, 143–149. <https://doi.org/10/cszhs9>
- Tramontina, J., Frey, B.N., Andreatza, A.C., Zandona, M., Santin, A., Kapczinski, F., 2007. Val66met polymorphism and serum brain-derived neurotrophic factor levels in bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* 12, 230–231. <https://doi.org/10/fwp4p5>
- Tsai, S.-J., Hong, C.-J., Yu, Y.W.-Y., Chen, T.-J., 2004. Association study of a brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism and personality trait and intelligence in healthy young females. *Neuropsychobiology* 49, 13–16. <https://doi.org/10/d33dn8>
- Tsien, J.Z., Huerta, P.T., Tonegawa, S., 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327–1338.
- Tunquist, B.J., Hoshi, N., Guire, E.S., Zhang, F., Mullendorff, K., Langeberg, L.K., Raber, J., Scott, J.D., 2008. Loss of AKAP150 perturbs distinct neuronal processes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12557–12562. <https://doi.org/10/bhhddc>
- Turnham, R.E., Scott, J.D., 2016. Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene* 577, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.052>
- Uegaki, K., Kumanogoh, H., Mizui, T., Hirokawa, T., Ishikawa, Y., Kojima, M., 2017. BDNF Binds Its Pro-Peptide with High Affinity and the Common Val66Met Polymorphism Attenuates the Interaction. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1042. <https://doi.org/10.3390/ijms18051042>
- Uhler, M.D., Chrivia, J.C., McKnight, G.S., 1986. Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 261, 15360–15363.
- Ullrich, A., Gray, A., Berman, C., Dull, T.J., 1983. Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* 303, 821–825.
- Vaegter, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., Lewin, G.R., Willnow, T.E., Chao, M.V., Nykjaer, A., 2011. Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat. Neurosci.* 14, 54–61. <https://doi.org/10/fmqp63>
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191–198. <https://doi.org/10/ffttkb>
- Ventriglia, M., Bocchio Chiavetto, L., Benussi, L., Binetti, G., Zanetti, O., Riva, M.A., Gennarelli, M., 2002. Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 7, 136–137. <https://doi.org/10/dh83j4>
- Vicario, A., Colliva, A., Ratti, A., Davidovic, L., Baj, G., Gricman, Ł., Colombrita, C., Pallavicini, A., Jones, K.R., Bardoni, B., Tongiorgi, E., 2015. Dendritic targeting of short and long 3' UTR BDNF mRNA is regulated by BDNF or NT-3 and distinct sets of RNA-binding proteins. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00062>
- Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R.S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., Choi, S., Bothwell, M., Mingarro, I., Friedman, W.J., Schiavo, G., Bastiaens, P.I.H., Verveer, P.J., Carter, B.D., Ibáñez, C.F., 2009. Activation of the p75 Neurotrophin Receptor through Conformational Rearrangement of Disulphide-Linked Receptor Dimers. *Neuron* 62, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.020>

- Villano, J.L., Katz, F.N., 1995. four-jointed is required for intermediate growth in the proximal-distal axis in *Drosophila*. *Development* 121, 2767–2777.
- Vlastaridis, P., Kyriakidou, P., Chaliotis, A., Van de Peer, Y., Oliver, S.G., Amoutzias, G.D., 2017. Estimating the total number of phosphoproteins and phosphorylation sites in eukaryotic proteomes. *GigaScience* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giw015>
- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W., 2016. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*, Fifth edition. ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Wagner, N., Wagner, K.-D., Theres, H., Englert, C., Schedl, A., Scholz, H., 2005. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev.* 19, 2631–2642. <https://doi.org/10/dvbk8w>
- Walsh, D.A., 1978. Role of the cAMP-dependent protein kinase as the transducer of cAMP action. *Biochem. Pharmacol.* 27, 1801–1804.
- Walsh, D.A., Ashby, C.D., Gonzalez, C., Calkins, D., Fischer, E.H., 1971. Krebs EG: Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 246, 1977–1985.
- Wang, H., Li, M., Lin, W., Wang, W., Zhang, Z., Rayburn, E.R., Lu, J., Chen, D., Yue, X., Shen, F., Jiang, F., He, J., Wei, W., Zeng, X., Zhang, R., 2007. Extracellular Activity of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase as a Biomarker for Human Cancer Detection: Distribution Characteristics in a Normal Population and Cancer Patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 789–795. <https://doi.org/10/bndbhv>
- Wang, J., Zhang, F., Zhu, W., Liu, Y., Zhou, Z., 2015. Meta-analysis of the association of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with obsessive-compulsive disorder. *Acta Neuropsychiatrica* 27, 327–335. <https://doi.org/10/gddtd7>
- Wang, K.-S., Liu, X.-F., Aragam, N., 2010. A genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr. Res.* 124, 192–199. <https://doi.org/10/ddrmwq>
- Wang, L., Chang, X., She, L., Xu, D., Huang, W., Poo, M., 2015. Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 35, 8384–8393. <https://doi.org/10/f7j6r4>
- Watanabe, Y., Nunokawa, A., Someya, T., 2013. Association of the *BDNF* C270T polymorphism with schizophrenia: Updated meta-analysis: *BDNF* C270T and schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 67, 123–125. <https://doi.org/10.1111/pcn.12018>
- Weickert, C.S., Hyde, T.M., Lipska, B.K., Herman, M.M., Weinberger, D.R., Kleinman, J.E., 2003. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 8, 592–610. <https://doi.org/10/bbjcqh>
- Weinberg, F., Schulze, E., Fatouros, C., Schmidt, E., Baumeister, R., Brummer, T., 2014. Expression pattern and first functional characterization of riok-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Gene Expr. Patterns* 15, 124–134. <https://doi.org/10/gddngh>
- Weinstock-Guttman, B., Benedict, R.H.B., Tamaño-Blanco, M., Ramasamy, D.P., Stosic, M., Polito, J., Zivadinov, R., Ramanathan, M., 2011. The rs2030324 SNP of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with visual cognitive processing in multiple sclerosis. *Pathophysiology* 18, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2010.04.005>
- Wen, W., Taylor, S.S., Meinkoth, J.L., 1995. The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated. *J. Biol. Chem.* 270, 2041–2046.
- West, A.E., Pruunsild, P., Timmusk, T., 2014. Neurotrophins: Transcription and Translation, in: Lewin, G.R., Carter, B.D. (Eds.), *Neurotrophic Factors*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 67–100. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_4
- Wetsel, W.C., Rodriguiz, R.M., Guillemot, J., Rousset, E., Essalmani, R., Kim, I.H., Bryant, J.C., Marcinkiewicz, J., Desjardins, R., Day, R., Constam, D.B., Prat, A., Seidah, N.G., 2013. Disruption of the expression of the proprotein convertase PC7 reduces BDNF production and affects learning and memory in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 17362–17367. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314698110>

- Whalley, H.C., Baig, B.J., Hall, J., Job, D.E., McIntosh, A.M., Cunningham-Owens, D.G., Johnstone, E.C., Lawrie, S.M., 2010. Effects of the BDNF val66met polymorphism on prefrontal brain function in a population at high genetic risk of schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 153B, 1474–1482. <https://doi.org/10/b55zgs>
- Wheal, H.V., Lancaster, B., Bliss, T.V., 1983. Long-term potentiation in Schaffer collateral and commissural systems of the hippocampus: in vitro study in rats pretreated with kainic acid. *Brain Res.* 272, 247–253.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F., 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093–1097. <https://doi.org/10/cgtbpb>
- Williamson, D.M., Elferich, J., Shinde, U., 2015. Mechanism of Fine-tuning pH Sensors in Proprotein Convertases. *J Biol Chem* 290, 23214–23225. <https://doi.org/10/f7sf6x>
- Witter, M.P., Amaral, D.G., 1991. Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J. Comp. Neurol.* 307, 437–459. <https://doi.org/10/dkf3ts>
- Wong, J., Hyde, T.M., Cassano, H.L., Deep-Soboslay, A., Kleinman, J.E., Weickert, C.S., 2010. Promoter specific alterations of brain-derived neurotrophic factor mRNA in schizophrenia. *Neuroscience* 169, 1071–1084. <https://doi.org/10/czbqv6>
- Wong, W., Scott, J.D., 2004. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 959.
- Wong, Y.-H., Lee, C.-M., Xie, W., Cui, B., Poo, M., 2015. Activity-dependent BDNF release via endocytic pathways is regulated by synaptotagmin-6 and complexin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E4475-4484. <https://doi.org/10/f7ndfj>
- Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.-J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., Lu, B., 2005. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* 8, 1069–1077. <https://doi.org/10/btw8cq>
- Wood, M.A., Kaplan, M.P., Park, A., Blanchard, E.J., Oliveira, A.M.M., Lombardi, T.L., Abel, T., 2005. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn. Mem.* 12, 111–119. <https://doi.org/10/dd6ftj>
- Xu, L., Tian, D., Li, J., Chen, L., Tang, L., Fan, D., 2017. The Analysis of Two BDNF Polymorphisms G196A/C270T in Chinese Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Aging Neuroscience* 9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00135>
- Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., Yao, X., 2008. GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 7, 1598–1608. <https://doi.org/10/brhn5t>
- Yalak, G., Vogel, V., 2015. Ectokinases as novel cancer markers and drug targets in cancer therapy. *Cancer Med* 4, 404–414. <https://doi.org/10/f67gz8>
- Yalak, G., Vogel, V., 2012. Extracellular Phosphorylation and Phosphorylated Proteins: Not Just Curiosities But Physiologically Important. *Science Signaling* 5, re7–re7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003273>
- Yamashita, T., Fujitani, M., Hata, K., Mimura, F., Yamagishi, S., 2005. Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. *Anat Sci Int* 80, 37–41. <https://doi.org/10.1111/j.1447-073x.2005.00095.x>
- Yan, Q., Radeke, M.J., Matheson, C.R., Talvenheimo, J., Welcher, A.A., Feinstein, S.C., 1997. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 378, 135–157.
- Yang, J., Harte-Hargrove, L.C., Siao, C.-J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., Jing, D., LaFrancois, J.J., Bath, K.G., Mark, W., Ballon, D., Lee, F.S., Scharfman, H.E., Hempstead, B.L., 2014. proBDNF Negatively Regulates Neuronal Remodeling, Synaptic Transmission, and Synaptic Plasticity in Hippocampus. *Cell Reports* 7, 796–806. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.040>

- Yang, J., Siao, C.-J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z.-Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F.S., Lu, B., Hempstead, B.L., 2009. Neuronal release of proBDNF. *Nature Neuroscience* 12, 113–115. <https://doi.org/10.1038/nn.2244>
- Yin, J.C., Wallach, J.S., Del Vecchio, M., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G., Tully, T., 1994. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 49–58.
- Ying, S.-W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M.J., Hunt, S.P., Bliss, T.V.P., Bramham, C.R., 2002. Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J. Neurosci.* 22, 1532–1540.
- Yoshida, T., Ishikawa, M., Niitsu, T., Nakazato, M., Watanabe, H., Shiraishi, T., Shiina, A., Hashimoto, T., Kanahara, N., Hasegawa, T., Enohara, M., Kimura, A., Iyo, M., Hashimoto, K., 2012. Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with major depressive disorder. *PLoS ONE* 7, e42676. <https://doi.org/10/gddtdd>
- You, J., Yuan, Y., Zhang, Z., Zhang, X., Li, H., Qian, Y., 2010. A preliminary association study between brain-derived neurotrophic factor (BDNF) haplotype and late-onset depression in mainland Chinese. *J Affect Disord* 120, 165–169. <https://doi.org/10/c5b67w>
- Zafra, F., Castrén, E., Thoenen, H., Lindholm, D., 1991. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10037–10041.
- Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., Lindholm, D., 1990. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 9, 3545–3550.
- Zagrebelsky, M., Holz, A., Dechant, G., Barde, Y.-A., Bonhoeffer, T., Korte, M., 2005. The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 25, 9989–9999. <https://doi.org/10/frw8c>
- Zai, C.C., Manchia, M., Sønderby, I.E., Yilmaz, Z., De Luca, V., Tiwari, A.K., Squassina, A., Zai, G.C., Shaikh, S.A., Strauss, J., King, N., Le Foll, B., Kaplan, A.S., Finseth, P.I., Vaaler, A.E., Djurovic, S., Andreassen, O.A., Vincent, J.B., Kennedy, J.L., 2015. Investigation of the genetic interaction between BDNF and DRD3 genes in suicidal behaviour in psychiatric disorders. *World J. Biol. Psychiatry* 16, 171–179. <https://doi.org/10/gddtfc>
- Zakharenko, S.S., Patterson, S.L., Dragatsis, I., Zeitlin, S.O., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., Morozov, A., 2003. Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* 39, 975–990.
- Zhang, M., Storm, D.R., Wang, H., 2011. Bidirectional synaptic plasticity and spatial memory flexibility require Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases. *J. Neurosci.* 31, 10174–10183. <https://doi.org/10/cqpnt9>
- Zhou, C., Dacheux, R.F., 2004. All amacrine cells in the rabbit retina possess AMPA-, NMDA-, GABA-, and glycine-activated currents. *Vis. Neurosci.* 21, 181–188.

RÉSUMÉ

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor) est une protéine qui joue un rôle essentiel dans la survie et la différenciation des neurones, ainsi que dans l'induction et l'expression de la plasticité synaptique (Deinhardt and Chao, 2014; Lu et al., 2005). Le BDNF est très exprimé à l'âge adulte et la réduction de son expression est impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives et troubles psychologiques (Anastasia and Hempstead, 2014). Son action sur la plasticité synaptique est majeure pour la mise en place de fonctions cognitives et pour la mise en place de la mémoire (Bekinschtein et al., 2008; Egan et al., 2003).

Le BDNF existant sous deux formes ayant des fonctions opposées, on peut parler d'effet Yin et Yang du BDNF (Lu et al., 2005). En effet, le BDNF est synthétisé en tant que molécule précurseur, le proBDNF, qui a des effets négatifs « Yin ». Par sa liaison au récepteur p75^{NTR}, le proBDNF favorise l'apoptose, la rétraction dendritique et la dépression à long-terme. Au contraire, la forme clivée, le BDNF mature (mBDNF), se lie préférentiellement au récepteur TrkB qui active les voies de signalisation de survie cellulaire, de différenciation et de potentialisation à long terme. On parle alors d'effets positifs ou « Yang ». Le clivage de BDNF joue donc un rôle capital dans la régulation de sa balance fonctionnelle vers l'une ou l'autre voie. Il est généralement admis que le proBDNF est clivé en mBDNF par la furine dans le Golgi ou par la pro-protéine convertase 1/3 dans les vésicules de sécrétion (Mowla et al., 2001; Seidah et al., 1996). Le proBDNF restant n'ayant pas été clivé dans la cellule peut être sécrété et être rapidement clivé par la plasmine ou les métalloprotéases de matrice (MMP7) dans l'espace extracellulaire (Lee et al., 2001).

Par leurs rôles diamétralement opposés, le BDNF mature et le proBDNF permettent une régulation fine de la survie et la différenciation des neurones et leur plasticité synaptique en fonction de l'activité neuronale (Lu et al., 2014; Yang et al., 2014). BDNF ayant des rôles critiques dans la fonction neuronale, il n'est pas étonnant que son expression et son action soient extrêmement régulées dans le temps et dans l'espace. Cependant, si les enzymes de conversion du BDNF sont bien connues, les mécanismes de régulation du clivage ne sont pas encore compris.

Nous montrons ici un nouveau mécanisme de régulation de la maturation de BDNF via une phosphorylation qui impacte directement la balance fonctionnelle. En effet, nous montrons que la phosphorylation du résidu S130, localisé à l'interface entre le pro-domaine et le domaine mature, diminue l'efficacité du clivage de BDNF par la furine, régulant ainsi l'équilibre entre les formes immature et mature. Cette phosphorylation au site S130 est catalysée par les ectokinases FJX1 et FAM69B qui sont localisées dans l'appareil de Golgi avec BDNF. De plus, grâce à l'utilisation de souris transgéniques knock-in phospho-mutantes, nous montrons que la phosphorylation de BDNF, en favorisant la forme proBDNF, inhibe la potentialisation à long-terme et diminue la dynamique de plasticité des épines dendritiques après stimulation neuronale. Ces résultats suggèrent ainsi une nouvelle voie de régulation de la balance fonctionnelle de BDNF et suggèrent un rôle critique de la phosphorylation S130 dans les processus d'apprentissage et de la mémoire.

En parallèle, la recherche de kinases potentielles de BDNF nous a amenés à identifier une exoPKA, localisée dans le Golgi et qui interagit directement avec BDNF. Cette exoPKA atypique phosphoryle BDNF au niveau de la sérine S130 et régule sa maturation et donc l'équilibre entre les formes pro et matures de BDNF. Cette exoPKA est différente de la PKA cytosolique ce qui suggère l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation de la plasticité par PKA via BDNF. Enfin, nous sommes en train de tester le rôle de l'exoPKA sur la régulation négative de la plasticité synaptique via la régulation du clivage de BDNF. Ces résultats permettent de déterminer l'existence d'une dichotomie d'action de PKA sur la plasticité en fonction de la forme activée, cytosolique ou golgienne/sécrétée.

TITLE: Identification of a phosphorylated form of BDNF: a new mechanism for the regulation of synaptic plasticity and memory?

ABSTRACT

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a protein that plays an essential role in the survival and differentiation of neurons, as well as in the induction and expression of synaptic plasticity (Deinhardt and Chao, 2014; Lu et al., 2005). BDNF is highly expressed during adulthood and the reduction of its expression is implicated in many neurodegenerative diseases and psychological disorders (Anastasia and Hempstead, 2014). Its action on synaptic plasticity is critical for the establishment of cognitive functions and for the establishment of memory (Bekinschtein et al., 2008; Egan et al., 2003).

BDNF exists as two forms with opposite functions, or Yin and Yang effects (Lu et al., 2005). Indeed, BDNF is synthesized as a precursor molecule, proBDNF, which has negative effects "Yin". By binding to the p75^{NTR} receptor, proBDNF promotes apoptosis, dendritic retraction and long-term depression. In contrast, the cleaved form, mature BDNF (mBDNF), binds preferentially to the TrkB receptor that activates the signaling pathways promoting cell survival, differentiation, and long-term potentiation. Thus, mBDNF has positive effects or "Yang". The cleavage of BDNF therefore plays a key role in regulating its functional balance towards one or the other pathway. It is believed that proBDNF is cleaved into mBDNF by furin in the Golgi network or by pro-protein convertase 1/3 in secretory vesicles (Mowla et al., 2001; Seidah et al., 1996). The remaining proBDNF that has not been cleaved in the cell can be secreted and rapidly cleaved by plasmin or matrix metalloproteases (MMP7) into the extracellular space (Lee et al., 2001). Having diametrically opposite roles, together, mature BDNF and proBDNF allow fine regulation of neuronal survival and differentiation and of their activity-dependent synaptic plasticity (Lu et al., 2014; Yang et al., 2014). Since BDNF has critical roles in neuronal functions, it is not surprising that its expression and action are extremely regulated in time and space. However, even if the enzymes processing BDNF are well known, the mechanisms regulating BDNF cleavage are not yet understood.

Here we show a new mechanism for the regulation of BDNF maturation via phosphorylation which directly impacts the functional balance. Indeed, we show that phosphorylation of the S130 residue, located at the interface between the pro- and the mature domain, decreases the efficiency of BDNF cleavage by furin, thus regulating the balance between immature and mature forms. This phosphorylation at the S130 site is catalyzed by ectokinases FJX1 and FAM69B which are localized in the Golgi apparatus with BDNF. Furthermore, by using phospho-mutant knock-in transgenic mice, we show that the phosphorylation of BDNF, by promoting the proBDNF form, inhibits the long-term potentiation and decreases the plasticity dynamics of the dendritic spines after neuronal stimulation. These results suggest a novel regulatory pathway for BDNF functional balance and suggest a critical role for S130 phosphorylation in learning and memory processes.

In parallel, the search for potential kinases of BDNF led us to identify an exoPKA, located in the Golgi and interacting directly with BDNF. This atypical exoPKA phosphorylates BDNF at serine S130 and regulates its maturation and therefore the balance between the pro- and mature forms of BDNF. This exoPKA is different from the cytosolic PKA which suggests the existence of a new mechanism of regulation of plasticity by PKA via BDNF. Finally, we are testing the role of exoPKA on the downregulation of synaptic plasticity via the regulation of BDNF cleavage. These results will allow to determine the existence of a dichotomous action of PKA on plasticity whether cytosolic or Golgi/secreted PKA is activated.