



HAL
open science

Régulation et conséquences fonctionnelles de la SUMOylation à la synapse

Marie Pronot

► **To cite this version:**

Marie Pronot. Régulation et conséquences fonctionnelles de la SUMOylation à la synapse. Biologie cellulaire. Université Côte d'Azur, 2021. Français. NNT : 2021COAZ6019 . tel-04216244

HAL Id: tel-04216244

<https://theses.hal.science/tel-04216244>

Submitted on 24 Sep 2023

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 DE DOCTORAT

Régulation et conséquences fonctionnelles
de la SUMOylation à la synapse

Marie PRONOT

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en**

Sciences de la vie et de la Santé
De l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr Stéphane Martin

Soutenue le : 23/09/2021

Devant le jury, composé de :

Jacques Barik, MCU, IPMC, Valbonne

Pascal Dournaud, DR, Université Paris Diderot

Carole Gwizdek, CR, IPMC, Valbonne

Stéphane Martin, DR, IPMC, Valbonne

Patrick Vourc'h, PU-PH, Université de Tours

Alessia Zamborlini, Pr, Université Paris Saclay

Régulation et conséquences fonctionnelles de la SUMOylation à la synapse

Jury :

Président du jury

Jacques Barik, MCU, IPMC, Université Côte d'Azur

Rapporteurs

Pascal Dournaud, DR, NeuroDiderot, Université Paris Diderot

Alessia Zamborlini, Pr, I2BC, Université Paris Saclay

Examineur

Patrick Vourc'h, PU-PH, iBrain, Université de Tours

Invitée

Carole Gwizdek, CR, IPMC, Université Côte d'Azur

Régulation et conséquences fonctionnelles de la SUMOylation à la synapse

Résumé

Les modifications post-traductionnelles sont essentielles à la régulation des fonctions protéiques et, par conséquent, au maintien de l'intégrité cellulaire. Ces modifications interviennent à tous les niveaux de la communication neuronale. Lors de mon doctorat, j'ai étudié l'une de ces modifications, la SUMOylation. Elle consiste en la conjugaison enzymatique covalente mais réversible, de la protéine SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) sur des résidus lysine spécifiques de protéines cibles. Au cours des dix dernières années, la SUMOylation est apparue comme un régulateur important de la fonction neuronale, jouant un rôle dans le développement du cerveau, l'excitabilité neuronale, la transmission et la plasticité synaptique. Il existe par ailleurs une balance entre l'état SUMOylé et désSUMOylé des protéines cérébrales, permettant une régulation fonctionnelle à la fois dans le temps et dans l'espace. Il est important de noter que les altérations du processus d'homéostasie de la SUMOylation sont associées à une variété de troubles cérébraux. Pour mieux comprendre les fonctions synaptiques de la SUMOylation, il est donc essentiel d'identifier les protéines de la synapse modifiées par SUMO ainsi que de déterminer les mécanismes qui y régulent la balance SUMO/désSUMOylation. Cependant, les mécanismes de régulation restent à élucider et le répertoire disponible des substrats SUMO identifiés au niveau des synapses est encore extrêmement limité. Mon travail de thèse a donc été découpé en deux axes : l'étude de la régulation synaptique de la balance SUMOylation/désSUMOylation et l'identification et la caractérisation d'un SUMOylome à la synapse.

La balance SUMOylation/désSUMOylation est maintenue par l'action coordonnée de la seule enzyme de conjugaison SUMO, Ubc9, et des enzymes de désSUMOylation appelées SENP. Nous avons dans un premier temps démontré qu'une activation brève des récepteurs métabotropique du glutamate mGlu5R piège transitoirement Ubc9 aux post-synapses, ce qui entraîne une augmentation rapide de la SUMOylation synaptique globale et des changements dans l'excitabilité neuronale. Une activation prolongée des récepteurs mGlu5R entraîne une accumulation post-synaptique de SENP1 et une diminution de la SUMOylation synaptique. Étant donné que les deux processus sont contrôlés par l'activation des récepteurs mGlu5R mais sur des échelles de temps différentes, d'autres mécanismes doivent coexister pour réguler cet équilibre au niveau des synapses. En utilisant une combinaison d'imagerie en temps réel et d'approches biochimiques et pharmacologiques, nous avons montré une régulation bidirectionnelle de la désSUMOylation synaptique par les mGluRs du groupe I (mGluR1 et 5) et mis en évidence un rôle de l'activation des kinases PKC et CaMKII ainsi que la polymérisation des microtubules dans la redistribution synaptique de SENP1.

En combinant fractionnements subcellulaires à partir de cerveaux de rats post-nataux (P14) et immunoprécipitations SUMO2/3 spécifiques pour isoler les protéines synaptiques SUMO2/3-ylées, nous avons identifié 803 protéines synaptiques SUMOylées. Ces protéines sont importantes pour la fonction synaptique comme par exemple Synapsin3 impliquée dans l'exocytose. Parmi les nouvelles cibles identifiées, on retrouve et SynGAP, ce qui souligne le rôle central de la SUMOylation dans la fonction synaptique. De nombreuses autres protéines identifiées sont directement impliquées dans des troubles neurologiques laissant suggérer une participation du processus de SUMOylation dans l'étiologie de ces maladies cérébrales.

Ainsi, mes travaux de thèse ont permis de collecter des informations importantes sur les mécanismes de régulation séquentiels dépendants de l'activité qui conduisent à l'homéostasie de la SUMOylation des protéines au niveau de la synapse et d'établir la première cartographie des cibles SUMO2/3 synaptiques.

Mots clés : Synapse, SUMO, communication neuronale, SUMOylome, récepteurs mGlu

Identifying the regulatory mechanisms and functional consequences of SUMOylation at the mammalian synapse

Abstract

SUMOylation is a dynamic post-translational modification that consists in the covalent but reversible enzymatic conjugation of the Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) protein on specific lysine residues of target proteins. In the last 10 years, SUMOylation has emerged as an important regulator of the neuronal function, playing a role in brain development, neuronal excitability and synaptic transmission and plasticity. Importantly, alterations in the SUMOylation homeostasis process are associated with a variety of brain disorders. Nevertheless, the regulatory mechanisms remain poorly studied and the available repertoire of identified SUMO substrates at synapses is still extremely limited.

The SUMOylation/deSUMOylation balance is orchestrated by the coordinated action of the sole SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and SUMO-deconjugating enzymes called SENPs. A tight regulation of this balance is therefore critical to the brain function and its disruption is associated with several neurological disorders. We previously demonstrated that a short activation of mGlu5R transiently traps Ubc9 at the post-synapse, resulting in a rapid increase in the overall synaptic SUMOylation and changes in neuronal excitability. A sustained activation of mGlu5R leads to post-synaptic accumulation of SENP1 and a decrease in synaptic SUMOylation to basal levels. Given that both processes are controlled by the activation of mGlu5R but on a different timescale, other mechanisms must coexist to regulate their spatiotemporal balance at synapses. Using a combination of advanced live-cell imaging, biochemical and pharmacological approaches, we revealed a bidirectional regulation of synaptic deSUMOylation targeting by the group I mGluRs and highlight how PKC and CaMKII activation as well as the polymerization of microtubules drive the neuronal and synaptic redistribution of SENP1.

The poor identification of endogenous synaptic SUMOylation substrates is mainly due to the low levels of SUMOylated proteins at synapses but also to the developmental ages investigated. To overcome these difficulties, we combined subcellular fractionation approaches on post-natal (P14) rat brains with specific SUMO2/3 immunoprecipitation to isolate synaptic SUMO2/3-ylated proteins. Then using Orbitrap mass spectrometry (MS), we identified around 800 synaptic SUMO2/3-ylated proteins including the previously reported SUMO targets Ubc9, CASK and Synapsin1. We identified many novel synaptic SUMO targets including PSD95 and SynGAP, further highlighting the central role of SUMOylation in the synaptic function. Interestingly, many of the proteins identified are directly linked to neurological disorders suggesting that the SUMOylation process per se could participate in the aetiology of these brain diseases.

Altogether, my PhD work provides additional insights into the sequential activity-dependent regulatory mechanisms driving the homeostasis of protein SUMOylation at the mammalian synapse and establishes the first detailed cartography of synaptic SUMO2/3 substrates.

Keywords : Synapse, SUMO, neuronal communication, SUMOylome, mGlu Receptors

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury : **Pr Alessia Zamborlini**, **Dr Pascal Dournaud** et **Pr Patrick Vourc'h** pour leur temps et leurs expertises ainsi que **Dr Jacques Barik** d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je n'aurais pas pu tenir le rythme sans les merveilleux membres, présents ou déjà partis, de l'équipe SM ! Merci pour tous les moments agréables dans et hors du laboratoire : pauses café, apéros, anniversaires, fêtes de Noël...

Je remercie mon superviseur de master devenu mon directeur de thèse, **Dr Stéphane Martin**. Chef, merci pour ta confiance et pour l'opportunité de faire une thèse sous ta supervision. Tu as été un vrai mentor pour moi tant sur le plan professionnel que personnel. Merci aussi pour ta disponibilité ! Tu nous as toujours laissé ta porte ouverte pour toutes questions (même si on a bien compris que tu faisais exprès de pas mettre le chauffage ou de laisser la fenêtre ouverte pour qu'on ne reste pas longtemps ^^). J'ai apprécié travailler avec toi pour ta bienveillance, les critiques constructives et les conseils avisés. Je ne regrette pas le peu de one-to-one, j'ai largement préféré les discussions scientifiques en dessinant sur un coin de paillasse :) Merci d'avoir pris le temps de partager tes connaissances scientifiques, ton expertise, mais aussi de m'aiguiller sur les choix à faire pour réussir à allier vie pro/perso et continuer dans ma future carrière.

Gwen Gyver, tu m'as beaucoup épaulé pendant ces années au laboratoire. Tu m'as tant apporté professionnellement mais aussi et surtout personnellement ! A nos discussions et leçons de vie que nous nous sommes mutuellement données (travail d'équipe ^^). J'ai beaucoup appris sur moi-même et j'en ressors plus que grandie.

La Martinette, ma collègue de bureau et de labo ... La seule et l'unique ! Merci d'avoir été un pilier lors de cette aventure que l'on a pu partager. Je te remercie d'avoir toujours eu le temps pour m'aider pour les expériences et discuter du projet. Mais j'ai encore plus apprécié nos conversations d'ordre personnelles autour d'un thé ou quand la situation devenait plus critique, autour d'un Spritz ! Tu es devenue une véritable amie. Et puis, Merci de m'avoir fait découvrir les olives espagnoles Comment je vais réussir à vivre sans elle maintenant !

Ale, taquina ! It was a real pleasure to learn from you all the biochemistry tricks, to work with you on several projects and to have discussions (scientific or not) over Aperol Spritz. You truly supported me scientifically and mentally during my PhD and I cannot be more grateful! Thank you so much for the faith you had in me to start a collaboration on your projects.

Je remercie **Carole** pour ses conseils avisés sur le projet SUMOylome ainsi que pour toutes les discussions scientifiques à n'importe quelle heure et **Félicie** pour son expertise en bio-info. Ça paraissait tellement simple quand tu m'expliquais tout ça de façon ludique !

Une thèse est une expérience de dépassement de soi mais accompagnée par des proches qui ont répondu toujours présents !

Lara, thank you so much for your help on my PhD project! I discover a kind, strong and powerful woman. More than that, I have gained a good friend!

Guillaume, tu es une personne formidable qui prend grand soin des gens qu'il apprécie. Je me suis toujours sentie entourée et guidée grâce à toi. Merci pour ta bienveillance et ton soutien sans faille dans toutes les situations, bonnes comme mauvaises, et d'avoir aussi su me remettre en place quand j'en avais bien besoin ! :) On a fait le pari fou de créer un Escape Game ensemble et on peut le dire : on forme une équipe de choc, frère ! Toi qui ne voulais pas faire de thèse au départ, je suis tellement fière du chemin que tu as accompli jusqu'ici et j'espère un jour pouvoir retravailler avec toi !

Sans oublier les pauses café, les apéros à l'institut, les fous rires, la pétanque et les burgers avec le reste de l'équipe de choc, **Alberto, Joris, Marin et Thomas** ! « Vous êtes sympa mais ... » Merci pour tous ces super moments passés dans le bureau B09! Vous m'avez toujours accueilli les bras ouverts ! Qui a dit, qu'au travail, on devait toujours être sérieux ?!?! :)

Johanna, la première personne que j'ai rencontrée en arrivant ici ! Il est bien loin le temps où on allait au cinéma et où l'on mangeait chez toi entre les cours. Très loin le temps où on se faisait des soirées entre filles et que l'on se plaignait de nos équipes respectives ! Quelle chance j'ai eu de t'avoir ! J'ai découvert une personne avec un cœur énorme. Merci de m'avoir aidé à traverser les moments difficiles ! Je suis tellement fière de toi, de ton doctorat et du chemin que nous avons parcouru ensemble.

Merci à **ma famille** pour leur soutien dans tous mes projets et pour leur amour inconditionnel ! J'avais peur qu'après ce refus essuyé en médecine, je ne puisse pas trouver un domaine qui me fasse vibrer mais j'avais tort. Grâce à vos conseils, vos messages de tendresse et vos encouragements, je réalise aujourd'hui un de mes plus grands accomplissements !

Enfin, je remercie les personnes de l'IPMC qui m'ont toujours soutenu lors de ce parcours du combattant qu'est la thèse. Je ne vous remercierais jamais assez pour tous les moments que l'on a passé dans le labo mais aussi en dehors ... La Côte d'Azur n'est pas ma région natale mais vous avez réussi à me faire me sentir comme à la maison et je peux fièrement dire que Nice c'est chez moi maintenant !

... Merci à tous !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1	La Synapse Glutamatergique	7
1.1	La transmission synaptique	8
1.2	La présynapse	9
1.3	La postsynapse	13
1.3.1	Morphologie	14
1.3.2	Cytosquelette.....	16
1.3.3	Densité postsynaptique ou PSD	19
1.4	Récepteurs glutamatergiques postsynaptiques.....	25
1.4.1	Récepteurs Kainate (rKAs).....	25
1.4.2	Récepteurs NMDA ou N-méthyl-D-aspartate (rNMDAs).....	25
1.4.3	Récepteurs AMPA ou alpha-amino-3hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid (rAMPA).....	26
1.4.4	Récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs)	28
1.5	La plasticité synaptique	34
2	SUMOylation, une modification post-traductionnelle essentielle	38
2.1	La machinerie de SUMOylation	38
2.1.1	Distribution de la machinerie de la voie de SUMOylation dans les neurones.....	40
2.1.2	Régulation neurodéveloppementale de la machinerie de SUMOylation.....	41
2.1.3	Régulation de la machinerie de SUMOylation par l'activité neuronale	42
2.2	Rôles de la SUMOylation dans les fonctions neuronales	43
2.2.1	SUMOylation, développement embryonnaire et formation des synapses.	43
2.2.2	SUMOylation et excitabilité neuronale	48
2.2.3	SUMOylation et transmission synaptique.....	48
2.2.4	SUMOylation, plasticité synaptique, apprentissage et mémorisation	52
2.3	SUMOylation et pathologies.....	55
2.3.1	Cancers	55
2.3.2	Ischémie cérébrale.....	55
2.3.3	Douleurs chroniques.....	56
2.3.4	Synaptopathies	57
3	Vers un SUMOylome synaptique	58
3.1	Liaisons covalentes et non covalentes de SUMO aux protéines cibles.....	59
3.2	Protéomique de la SUMOylation	59
3.3	SUMOylation synaptique : controverses ?.....	65
	OBJECTIFS	67
	AXE 1 - Régulation de la balance SUMOylation/désSUMOylation à la synapse	
	Hypothèse de travail.....	69
	Matériels et méthodes	71
	Résultats	77
	Discussion.....	93
	AXE 2 - Identification et caractérisation d'un SUMOylome synaptique chez le rat	
	Hypothèse de travail.....	101
	Matériel et méthodes.....	103
	Résultats	107
	Discussion.....	119
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	129
	REFERENCES	135
	ANNEXES	159

Liste des figures

Figure 1. Schéma simplifié de l'architecture d'une synapse excitatrice.	9
Figure 2. Structure de la zone active.	10
Figure 3. Cycle des vésicules présynaptiques.	11
Figure 4. Machinerie moléculaire à l'origine de la fusion des vésicules déclenchée par le Ca^{2+}	12
Figure 5. Classification morphologique des épines dendritiques.	15
Figure 6. Processus d'instabilité dynamique d'un microtubule.	18
Figure 7. Organisation moléculaire de la PSD à la synapse excitatrice.	21
Figure 8. Voies de signalisation lors de l'activation des récepteurs métabotropiques du glutamate.	28
Figure 9. Schéma explicatif de la technique de complémentarité du domaine de liaison au ligand	29
Figure 10. Voies de l'endocytose des récepteurs mGlu.	33
Figure 11. Schéma simple de la plasticité synaptique.	35
Figure 12. Cascade de SUMOylation et conséquences moléculaires.	39
Figure 13. Régulation neurodéveloppementale de la machinerie de SUMOylation.	42
Figure 14. Rôles de la SUMOylation de FMRP dans la fonction neuronale.	47
Figure 15. Protéines cibles de la SUMOylation et pathologies associées.	58
Figure 16. Méthodes de protéomique pour l'étude de la SUMOylation	63
Figure 17. Schéma de la régulation synaptique des enzymes de la voie de SUMOylation par les mGlu5R	78
Figure 18. La redistribution de GFP-SEN1 dans les épines dendritiques est dépendante de l'activation des mGlu1R/5.	80
Figure 19. L'activité constitutive de mGlu1R régule la redistribution de GFP-SEN1 dans les épines dendritiques.	81
Figure 20. L'activation des récepteurs mGlu1R régule la redistribution de GFP-SEN1 dans les synapses.	82
Figure 21. Effets des différents agonistes sur la phosphorylation de ERK1/2.	83
Figure 22. L'activation de la PKC est requise pour la relocalisation de GFP-SEN1 à la postsynapse.	85
Figure 23. L'activation de la CaMKII est requise pour la diffusion de GFP-SEN1 à la postsynapse.	86
Figure 24. L'activation de PKA n'est pas requise pour la redistribution de GFP-SEN1 dans la synapse.	87
Figure 25. La dynamique des microtubules est impliquée dans la diffusion de GFP-SEN1 à la synapse.	89
Figure 26. L'accumulation de SEN1 endogène est régulée par l'activation des mGluRs du groupe 1.	90
Figure 27. Préparation des synaptosomes à partir de tranches de cerveaux de rat.	91
Figure 28. L'inhibition de l'activation de mGlu1R augmente les niveaux synaptiques de SEN1 chez le rat.	92
Figure 29. Niveaux de SUMOylation dans les différents compartiments cellulaires.	107

Figure 30. Contrôle qualité du fractionnement synaptique.....	109
Figure 31. Immunoprécipitation des protéines synaptiques SUMO2/3ylées	111
Figure 32. Ubc9 est SUMO2/3-ylée à la synapse.	113
Figure 33. La Flotilline-1 est modifiée par SUMO2/3 à la synapse.....	113
Figure 34. SynGAP, protéine majoritaire de la PSD est SUMO2/3-ylée.	114
Figure 35. PSD95, protéine centrale de la synapse, est SUMO2/3ylée.....	114
Figure 36. PKCγ est modifiée par SUMO2/3 à la synapse.	115
Figure 37. Analyse d'enrichissement des termes du SUMO2/3ylome à partir des bases de données Gene Ontology, KEGG, Reactome.	116
Figure 38. Organisation du réseau synaptique des protéines SUMO2/3-ylées.....	117
Figure 39. Analyse de l'enrichissement des pathologies associées au SUMO2/3-ylome synaptique.	118
Figure 40. Comparaison de notre synaptome à la littérature.....	119
Figure 41. Protéines SUMO2/3-ylées de la vésicule synaptique.....	125
Figure 42. Modèle de régulation bidirectionnelle de la désSUMOylation synaptique par les récepteurs métabotropiques du groupe I.....	129

Liste des tableaux

Tableau 1. Protéines d'échafaudage de la densité postsynaptique.....	22
Tableau 2. Localisation subcellulaire des différentes SUMO protéases dans les neurones.....	41
Tableau 3. Substrats SUMOylés synpatiques ou associés à la synapse.....	51
Tableau 4. Agents pharmacologiques utilisés.....	73
Tableau 5. Anticorps utilisés lors de l'étude de la régulation de SENP1 à la synapse.....	75
Tableau 6. Anticorps utilisés lors de l'étude du SUMOylome synaptique.....	105
Tableau 7. Comparaison des pathologies connectées au SUMOylome ou aux récepteurs mGlu du groupe I.....	130

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-isoxazolePropionic Acid
AMPC	Adénosine MonoPhosphate Cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CA	Corne d'Amon
CaM	Calmoduline
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmoduline Kinase II
DAG	Diacylglycérol
DAT	Transporteur de la dopamine
DHPG	(S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine, agoniste des mGluRs de groupe I
FMRP	Fragile X mental retardation Protein
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GAP	protéine activatrice de la GTPase
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	facteur d'échange GDP/GTP
GFP	Green Fluorescent Protein
GKAP	Guanylate kinase-associated protein
GTP	Guanosine TriPhosphate
JNJ	JNJ16259685, antagoniste mGlu1R
KA	Kaïnate
KD	Knock-Down
KI	Knock-In
KO	Knock-Out
LBD	Ligand Binding Domain
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long-Term Potentiation
MAGUK	Membrane-Associated GUanylate Kinase
MAP	Microtubule Associated Protein

mGluR	Récepteur métabotropique du glutamate
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine, antagoniste mGlu5R
NMDA	N-méthyl-D-Aspartate
PD98059	Inhibiteur de ERK
PDZ	Postsynaptic density protein (PSD-95), Drosophila disk large tumor suppressor (DLG1), zonula occludens -1 protein (zo-1)
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PSD	Post-Synaptic Density
PSD-95	Post-synaptic Density 95
rAMPA	Récepteur du type AMPA
RBP	RNA-Binding Protein
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines-G
RE	Réticulum endoplasmique
RIM	Rab-interacting molecule
rKA	Récepteur de type Kainate
rNMDA	Récepteur de type NMDA
SENP	Sentrin-Protease
SNC	Système Nerveux Central
SUMO	Small Ubiquitin like MOdifier
SynGAP	Synapse specific Ras/Rao GTPASE Activating Protein
TAT	Tyrosine AminoTransferase
Ubc9	SUMO-conjugating enzyme
VAMP	Vesicle Associated membrane Protein
VFT	Venus Fly Trap
VGlut	Transporteur vésiculaire du Glutamate
ZA	Zone active

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cerveau est une structure complexe composée de plus de 100 milliards de neurones. Les neurones sont les cellules du système nerveux permettant la transmission de l'information cérébrale. Ils sont constitués d'un corps cellulaire qui centralise et intègre les informations électriques et des prolongements plus ou moins ramifiés, les dendrites (voies d'entrée) et un axone (voie de sortie). La communication entre neurones est assurée par une jonction hautement spécialisée appelée synapse. Les synapses sont également présentes entre les neurones et d'autres types cellulaires comme les cellules gliales ou les fibres musculaires. Un seul neurone peut établir jusqu'à 10 000 synapses, ce qui explique la complexité du réseau neuronal. Il existe deux types de synapse : la synapse électrique et la synapse chimique. Présentes dans tout le système nerveux mais minoritaire en nombre, les synapses électriques relient le cytoplasme de deux cellules et permettent le passage direct de courants ioniques à travers des jonctions dites « serrées ». Ces jonctions comportent des canaux appariés perméables aux ions permettant une vitesse de transmission élevée et dans la majorité des cas, la communication est bidirectionnelle. Ce type de synapse est retrouvé dans les systèmes qui nécessitent une réponse rapide. Ils contribuent ainsi à la synchronisation de l'activité neuronale. Majoritaires dans le système nerveux, les synapses chimiques font intervenir des neurotransmetteurs qui seront libérés par les neurones présynaptiques pour propager l'information aux neurones postsynaptiques. La synapse chimique est caractérisée par la présence de trois compartiments : 1) La pré-synapse qui correspond à la partie terminale de l'axone ; 2) La fente synaptique ou espace inter-synaptique ; 3) La postsynapse ou épine dendritique. Des altérations de la fonction synaptique jouent un rôle central dans l'étiologie de nombreuses maladies neurologiques et neurodégénératives comme les troubles du spectre autistique, le Syndrome du X-Fragile, l'épilepsie, les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou d'Huntington. Ces maladies de la synapse sont généralement rassemblées sous le nom de synaptopathies (Lepeta *et al.*, 2016).

1 La Synapse Glutamatergique

Le glutamate est le neurotransmetteur majoritaire des synapses excitatrices du Système Nerveux Central (SNC) des mammifères. La capacité « excitatrice » du glutamate est connue depuis les années 1950 (Curtis *et al.*, 1960; Curtis and Watkins, 1960). Ce n'est pourtant qu'à la fin des années 1970 que le glutamate est accepté comme étant le neurotransmetteur excitateur majeur du SNC. Les récepteurs du glutamate présents aux synapses glutamatergiques assurent la transduction du signal, entre le neurone présynaptique, qui libère le glutamate de façon transitoire, et le neurone postsynaptique, dont la liaison du glutamate sur son récepteur se traduit par des variations de l'excitabilité neuronale. Ces dernières années, les astrocytes et autres cellules

gliales, qui entourent la synapse, apparaissent comme des modulateurs de la fonction synaptique. Ces cellules jouent un rôle prédominant dans la recapture du glutamate présent dans la fente synaptique et permettent ainsi d'éviter l'excitotoxicité due au glutamate. L'ensemble des éléments pré- et postsynaptique et l'astrocyte forme un complexe fonctionnel que l'on appelle synapse « tripartite » (Araque *et al.*, 1999). Le concept de synapse « tétrapartite » est apparu récemment, étant donnée le nombre croissant d'étude sur le rôle des cellules gliales et de la matrice extracellulaire dans la régulation de la fonction synaptique (Dityatev and Rusakov, 2011).

1.1 La transmission synaptique

Les neurones sont des cellules polarisées présentant un voltage différent de part et d'autre de leur membrane plasmique. Ceci confère un potentiel de membrane de l'ordre de -70 mV au repos. Ce potentiel dépend des flux d'ions entrants et sortants de la cellule via des canaux ou des pompes spécialisées. Ce potentiel de membrane peut être augmenté (dépolarisation) ou diminué (hyperpolarisation) lors d'un stimulus excitateur ou inhibiteur. Le potentiel d'action est le résultat d'une dépolarisation au niveau de l'axone allant jusqu'au potentiel seuil de -55 mV. Après la dépolarisation, qui correspond à une entrée d'ions sodique Na^+ dans la cellule, le potentiel de membrane va chuter à un potentiel plus bas que le potentiel de repos, phase dite d'hyperpolarisation, avant de revenir à une valeur proche de -70 mV grâce à une sortie d'ions potassiques K^+ . La propagation de cet influx nerveux le long de l'axone va déclencher l'ouverture de canaux calciques voltage dépendant permettant l'entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) à l'intérieur des neurones.

L'élément présynaptique ou bouton est caractérisé par la présence de vésicules synaptiques de 40 à 60 nm de diamètre, remplies de différents types de médiateurs chimiques que l'on appelle des neurotransmetteurs. La dépolarisation liée au potentiel d'action permet l'entrée de calcium au niveau du compartiment présynaptique et induit la fusion de vésicules contenant les neurotransmetteurs à la membrane présynaptique. Ces neurotransmetteurs vont diffuser dans la fente synaptique. La fente synaptique a une largeur de 20 à 25 nm, ce qui permet la concentration des neurotransmetteurs au niveau de la terminaison postsynaptique. L'élément postsynaptique se caractérise par la présence de deux grandes classes de récepteurs : les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs), qui sont des récepteurs couplés aux protéines-G (RCPGs), et les récepteurs-canaux ou récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluRs), qui regroupent les récepteurs AMPA (rAMPA), NMDA (rNMDAs) et Kaïnate (rKAs ; (Borges and Dingledine, 1998; Niswender and Conn, 2010; Rondard *et al.*, 2011). Les récepteurs AMPA, NMDA et mGluRs sont responsables de la majeure partie des courants excitateurs rapides dans la transmission synaptique glutamatergique. Le contrôle de la dynamique et de l'organisation de ces récepteurs dans la synapse, via une combinaison de diffusion latérale et d'endo/exocytose, est essentiel à la régulation de l'intensité de la transmission synaptique rapide. Les protéines

de la densité postsynaptique (PSD), telles que Homer, Shank et GKAP, participe à la régulation de la diffusion des récepteurs du glutamate et au contrôle de leur nombre et de leur organisation à la postsynapse (Fig. 1). Les membranes pré- et postsynaptiques sont maintenues proches l'une de l'autre grâce à des interactions entre des molécules d'adhérence cellulaire comme les protéines de la famille des neuroligines, des neurexines, de SynCAMs et des cadhérines, ce qui permet de stabiliser la structure synaptique (Sudhof, 2018).

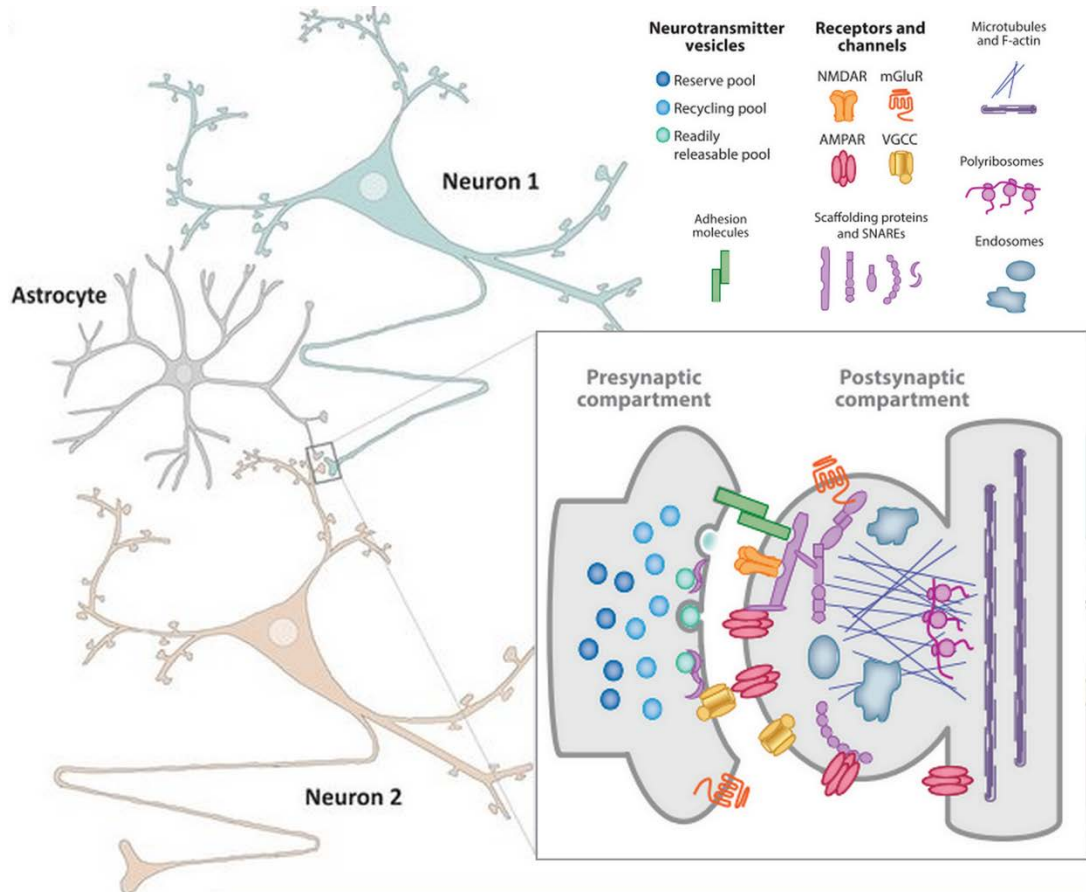


Figure 1. Schéma simplifié de l'architecture d'une synapse excitatrice.

Une synapse excitatrice est généralement composée d'un compartiment présynaptique caractérisé par la présence de vésicules synaptiques remplies de neurotransmetteurs (ex : Glutamate). Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, les neurotransmetteurs sont libérés dans la fente synaptique. La postsynapse contient des protéines membranaires, des récepteurs spécifiques aux neurotransmetteurs et différents canaux qui activent des cascades de signalisation intracellulaire en aval pour transmettre l'information. Les membranes pré- et postsynaptiques sont maintenues ensemble par des interactions entre les molécules d'adhésion stabilisant ainsi les deux compartiments de la synapse (adapté de (Volk et al., 2015).

1.2 La présynapse

La terminaison présynaptique a pour caractéristique d'être riche en mitochondries et de renfermer de nombreuses vésicules présynaptiques contenant les neurotransmetteurs.

Les vésicules renferment deux types de composants : des protéines de transports des neurotransmetteurs et des protéines de trafic qui participent à l'exocytose, l'endocytose et au recyclage des vésicules synaptiques.

Les composants des vésicules synaptiques sont initialement transportés vers la pré-synapse à l'aide de moteurs moléculaires (Yonekawa *et al.*, 1998).

Les vésicules se chargent en glutamate grâce à l'activité de transporteurs vésiculaires du glutamate (vGLUTs). Ces transporteurs sont des pompes à proton qui dépendent du potentiel de membrane établi par le gradient électrochimique créé par la H⁺/ATPase vacuolaire (V-ATPase) à la membrane vésiculaire. Une fois chargées, les vésicules s'arriment à la membrane près de leur site de libération et sont amorcées pour fusionner rapidement avec la membrane plasmique lors d'un influx de Ca²⁺ intracellulaire suite à l'arrivée d'un potentiel d'action (Kaesler *et al.*, 2011). Les neurotransmetteurs sont ainsi libérés puis les vésicules sont recyclées et rechargées en neurotransmetteurs. Les vésicules chargées dites matures migrent ensuite vers une région de la membrane plasmique dense aux électrons que l'on nomme « zone active » (ZA ; Fig. 2). La ZA de la synapse, aussi appelée « cytomatrice présynaptique », est une région riche en protéines impliquées dans la fusion vésiculaire. Cette zone est une structure en forme de disque d'environ 0.2-0.5 µm entouré de la zone péri-synaptique enrichie en récepteurs présynaptiques régulant la libération des neurotransmetteurs ainsi qu'en protéines d'adhésions trans-synaptiques (Fig. 2).

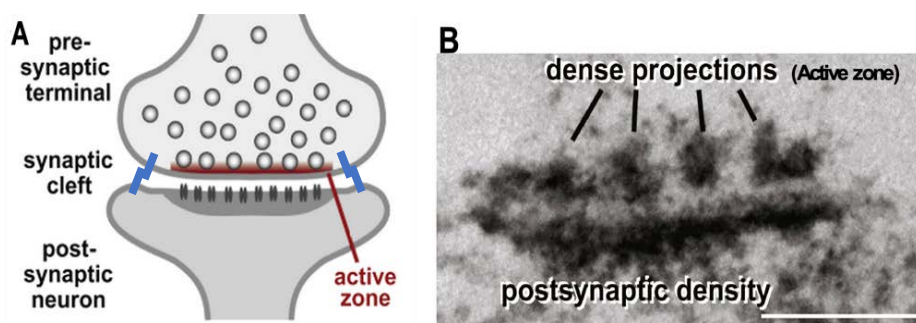


Figure 2. Structure de la zone active.

A. Schéma de la synapse et localisation de la zone active. B. Image en microscopie électronique d'une synapse colorée à l'acide phosphotungstique pour visualiser les spécialisations pré- et postsynaptiques. Échelle = 200 nm. (Sudhof, 2012)

La ZA est composée d'un ensemble de protéines responsables de l'arrimage et de l'amorçage de la fusion membranaire des vésicules de neurotransmetteurs ainsi que du recrutement des canaux Ca²⁺ voltage-dépendant à la pré-synapse. Ces canaux Ca²⁺ voltage-dépendant permettent un couplage rapide et synchrone de l'excitation et de la libération de neurotransmetteurs (Sudhof, 2004) ; Fig. 3). La ZA comprend également des récepteurs métabotropiques du glutamate. On va retrouver en particulier les récepteurs métabotropiques du groupe III (mGlu4R, mGlu7R et mGlu8R) au niveau des neurones excitateurs et des interneurons suggérant ainsi un rôle inhibiteur du glutamate dans certains types de synapse (Ferraguti *et al.*, 2005). Concernant les protéines d'adhésion de la ZA, on peut retrouver des récepteurs des protéines tyrosine phosphatases et des neurexines en interaction avec les α -liprines. Des protéines à multi-domaines, comme Piccolo et Bassoon, s'associent avec des protéines de la ZA pour maintenir les vésicules synaptiques à la ZA. L'importance de ces protéines a été mise en évidence par l'inactivation fonctionnelle par suppression de la région centrale (exon 4-

5 du gène *Bsn*) de la protéine Bassoon entraînant une libération anarchique de neurotransmetteurs (Altrock *et al.*, 2003). De plus, la diminution de l'expression de Bassoon par shRNA dans des neurones KO pour la protéine Piccolo altère la densité, le regroupement ainsi que l'amarrage des vésicules synaptiques. Bien que la composition protéique des synapses déficientes en Piccolo et en Bassoon soit normale, la taille de la PSD est augmentée sans modification de la libération des vésicules (Mukherjee *et al.*, 2010). Enfin, alors que les microtubules sont absents de la terminaison présynaptique, on y retrouve l'actine qui joue un rôle dans la formation de ces terminaisons, de l'élaboration des arborisations au recrutement des vésicules présynaptiques et des composants de la ZA.

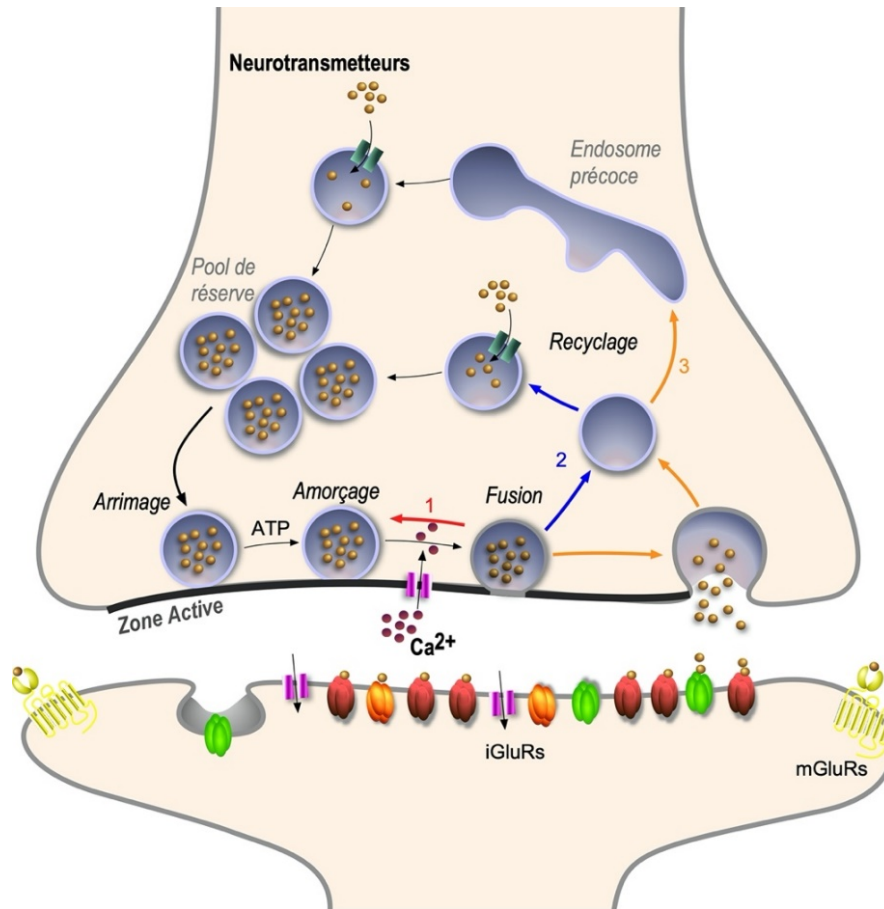


Figure 3. Cycle des vésicules présynaptiques.

Le cycle vésiculaire consiste en une étape d'exocytose représentée par les flèches noires suivie d'une étape de recyclage représentée par des flèches de couleurs. Les vésicules synaptiques se chargent en neurotransmetteurs (NT; points jaunes) par un transport actif alimenté par un gradient électrochimique établi par une pompe à protons qui acidifie l'intérieur de la vésicule. Pour préparer l'exocytose synaptique, les vésicules sont arrimées à la zone active (ZA) et amorcées par un processus dépendant de l'ATP qui rend les vésicules compétentes en réponse à un influx calcique. Lorsqu'un potentiel d'action dépolarise la membrane présynaptique, les canaux calciques s'ouvrent, provoquant une augmentation locale du Ca^{2+} intracellulaire dans la zone active qui déclenche l'achèvement de la réaction de fusion. Les NT libérés

dans la fente synaptique se lient alors aux récepteurs de la postsynapse. Les vésicules synaptiques sont ensuite recyclées probablement par 3 voies alternatives : (1) remplissage local avec des NT sans désarrimage des vésicules de la ZA ("kiss-and-stay"), (2) recyclage local ("kiss-and-run") et (3) recyclage complet des vésicules avec un passage par un intermédiaire endosomal. (Adapté de (Sudhof, 2004).

La fusion des vésicules à la ZA implique les protéines SNARE (SNAP receptors). Plusieurs membres de cette famille ont été identifiés dont les principaux sont la Synaptobrevine et des protéines membranaires associées aux vésicules VAMP formant les v-SNAREs, ainsi que la Syntaxine et SNAP-25 (synaptosomal associated protein of 25 kDa) appelées t-SNARE, qui se trouvent au niveau de la membrane plasmique présynaptique (Fig. 4). Une protéine v-SNARE interagit avec un complexe t-SNARE pour induire, de manière spécifique, la fusion de la

bicouche lipidique. Une communication sous la forme d'un pore s'établit entre les deux compartiments membranaires à l'endroit où les membranes fusionnent, permettant ainsi la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Südhof and Rothman, 2009). L'amorçage de la fusion membranaire est une étape importante dans la préparation de l'exocytose et permet un couplage rapide et synchrone entre excitation présynaptique et libération des neurotransmetteurs (Sudhof, 2012). Cette étape fait intervenir des protéines d'échafaudage, les RIMs (Rab-interacting molecules) impliquées dans l'arrimage et l'amorçage des vésicules, le recrutement des canaux calciques à la zone active (Kaeser *et al.*, 2011) et la plasticité à court terme de la libération des neurotransmetteurs (Castillo *et al.*, 2002). Les RIMs sont connues pour interagir avec Munc13. La protéine Munc13 liée à la zone active, joue un rôle primordial dans l'amorçage des vésicules synaptiques (Brose *et al.*, 1995). Munc13 va permettre un changement de conformation de la syntaxine-1 par l'intermédiaire de son domaine MUN et ainsi favoriser la formation des complexes SNARE (Gerber *et al.*, 2008). La liaison des RIM aux protéines Munc13 perturbe la formation d'homodimères Munc13, activant ainsi les monomères Munc13 pour exercer leur fonction d'amorçage (Deng *et al.*, 2011).

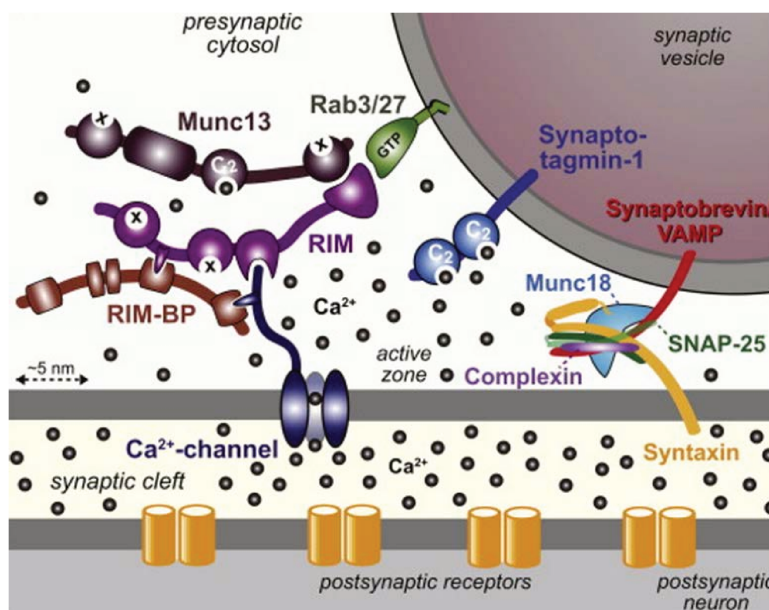


Figure 4. Machinerie moléculaire à l'origine de la fusion des vésicules déclenchée par le Ca^{2+} .

Segment d'une vésicule synaptique arrimée à la zone active. La machinerie de libération des neurotransmetteurs est composée de 3 éléments fonctionnels. Le complexe SNARE comprenant la Synaptobrevine/VAMP, la Syntaxine-1, SNAP-25 et Munc-18 (droite). Le complexe protéique contenant RIM, Munc13, RIM-BP et un canal calcique transmembranaire (gauche). La synaptotagmine-1 se lie les ions Ca^{2+} (centre). Ce complexe coordonne les 3 fonctions de la zone active : l'arrimage des vésicules via la liaison de Rab3/27 avec RIM, l'amorçage activé par Munc13 et le couplage rapide excitation-sécrétion grâce à la liaison de RIM avec les canaux calciques (Kaeser *et al.*, 2011).

La fusion membranaire déclenchée par l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire présynaptique est finement régulée. La Synaptotagmine-1, protéine membranaire des vésicules synaptiques, agit comme un senseur calcique et régule la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique (Geppert *et al.*, 1994; Nishiki and Augustine, 2004; Südhof, 2013). L'augmentation en ions Ca^{2+} dans la terminaison présynaptique favorise l'interaction de la Synaptotagmine-1 avec le complexe SNARE, les phospholipides et des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants.

Après la fusion, les vésicules ainsi que les complexes SNARE sont recyclés par endocytose rapide (indépendante de la clathrine) ou lente (dépendante de la clathrine) pour permettre la régénération d'un pool de vésicules présynaptiques qui participeront aux prochains cycles de libération de neurotransmetteurs. Les protéines de la famille des Synapsines contrôlent ce pool de vésicules en maintenant l'organisation et l'abondance des vésicules à la terminaison présynaptique. Au niveau fonctionnel, les vésicules sont séparées en 3 groupes : facilement libérable, recyclable ou de réserve et les différentes isoformes de la Synapsine assurent la transition entre ces groupes. La Synapsine-1 joue un rôle dans la synchronisation entre potentiels d'action et libération des neurotransmetteurs. La Synapsine-2 a un rôle primordial dans le maintien du pool de réserve de vésicules synaptiques et délivre activement les vésicules au niveau de la zone active (Bykhovskaia, 2011).

1.3 La postsynapse

La postsynapse a été observée dès la fin du XIXe siècle par Santiago Ramón y Cajal sur des neurones du cervelet. Il y remarque notamment la présence de protrusions membranaires (d'environ 1 à 2 μm) le long de l'arbre dendritique. Il postule déjà à l'époque, que les épines dendritiques pourraient servir de zones de contact entre les neurones. Cependant, ce n'est qu'en 1959, avec l'arrivée de la microscopie électronique que Georges Gray montre le contact en amont de l'épine dendritique par le bouton axonal et fait le lien entre synapses et épines dendritiques. Il a par ailleurs distingué deux catégories de synapses :

- Les synapses symétriques qui présentent des zones denses aux électrons de même épaisseur à la pré- et à la postsynapse, caractéristiques des synapses inhibitrices (Guillery, 2000);
- Les synapses asymétriques qui présentent elles, une zone dense plus épaisse au niveau de la terminaison postsynaptique, et appartiennent pour la majorité au système exciteur.

De nos jours, la synapse n'est plus vue comme une jonction statique entre neurones mais au contraire, est considérée comme une organelle très dynamique dont la fonction est régulée finement à la fois dans le temps et dans l'espace grâce à des interactions moléculaires qui façonnent la synapse (Choquet and Triller, 2013).

L'épine dendritique est riche en protéines et est directement en apposition avec la zone active présynaptique par la densité postsynaptique (PSD, Post-Synaptic Density ; (Gray, 1959; Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Ce domaine dendritique est extrêmement spécialisé et dynamique. Sa forme évolue continuellement grâce au cytosquelette d'actine, particulièrement dense (Landis and Reese, 1983). Le cytosquelette joue un rôle dans le maintien de l'intégrité des épines dendritiques et participe à l'organisation de la machinerie de signalisation à la PSD. La visualisation de l'actine marquée à la GFP dans les épines a permis de révéler que le cytosquelette d'actine, extrêmement dynamique, favorise ainsi des changements rapides de la forme des épines (Dillon and Goda, 2005). La force synaptique, c'est-à-dire l'intensité avec laquelle une épine va répondre à un stimulus donné, va notamment dépendre de ses changements morphologiques.

1.3.1 Morphologie

La morphologie des épines dendritiques est hétérogène, variant en taille ainsi qu'en forme sur un même neurone, un même arbre dendritique ou même d'une épine voisine à une autre (Bourne and Harris, 2008). De manière intéressante, la morphologie, la distribution ou encore la densité synaptique reflète souvent les propriétés fonctionnelles de l'épine dendritique. Avec une longueur qui varie de 0.2 à 2 μm et une densité comprise entre 1 à 10 épines par 10 μm de dendrites, un neurone pyramidal peut compter jusqu'à 10 000 épines dendritiques.

Les épines dendritiques ont été classées arbitrairement par Peters et Kaiserman-Abramof en 1970 en fonction des types morphologiques les plus retrouvés (Fig. 5). Les épines dendritiques sont classifiées ainsi suivant la taille de leur tête et en fonction de la largeur et de la longueur de leur cou :

- Les filopodes sont des excroissances très longues (2 à 5 μm) qui ne possèdent pas de tête à leur extrémité. Ils sont considérés comme l'état immature d'une épine dendritique, c'est-à-dire son précurseur.
- Les épines dites « thin » sont plutôt longues avec un cou aminci (< 1 μm) se terminant par une petite tête d'environ 0.2 μm de diamètre. Elles représentent la plus grande part des épines dendritiques dans l'hippocampe et le cortex chez l'adulte (Harris, Jensen and Tsao, 1992). Ces épines sont particulièrement dynamiques et capables de changements morphologiques spontanés. Ces modifications de forme et de volume sont associées à des modulations de neurotransmission au niveau de la pré-synapse, ce qui permet à l'épine de s'adapter au stimulus présynaptique. Du fait de cette plasticité, les épines dites « thin » sont aussi appelées « learning spines » (Bourne and Harris, 2008).
- Les épines « mushroom » représentent environ 25% des épines du SNC (Bourne and Harris, 2008). Elles sont considérées comme des épines matures capables de créer une connexion avec l'élément présynaptique. Elles sont caractérisées par un cou étroit (<0,1 μm) et une tête bulbeuse de diamètre bien supérieur (environ 0.6 μm) à celui de leur cou. Elles présentent la plus forte concentration en éléments constitutifs de la PSD.

- Les épines dites « stubby » possèdent une large tête mais aucun cou. Elles correspondent à des formes intermédiaires d'épines en cours de formation ou encore à des contacts axono-dendritiques qui se rétractent.

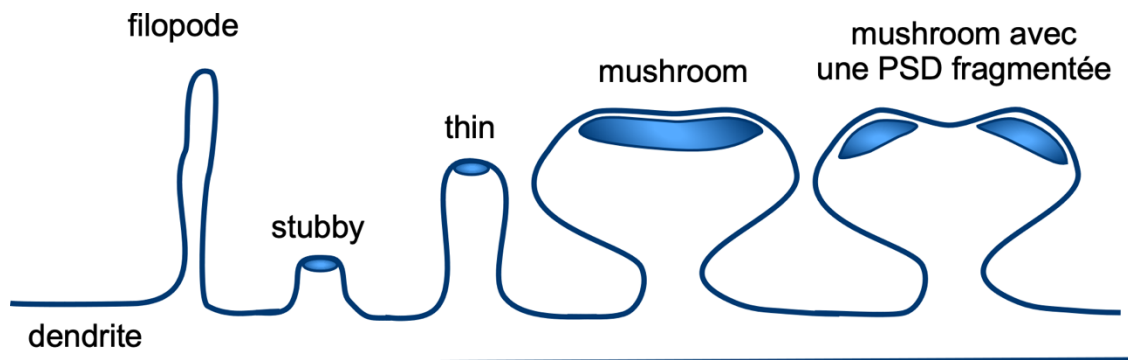


Figure 5. Classification morphologique des épines dendritiques.

Les épines dendritiques peuvent être classées en 3 groupes : les épines « stubby » sans cou apparent ; les épines « thin » fines avec une petite tête et un long cou ; les épines « mushroom » en forme de champignon avec une grosse tête et un cou fin. Les filopodes sont des protubérances dendritiques longues, minces et immatures qui se développent plus tard en épines dendritiques. Bien que plus rare, on peut retrouver des épines en forme de coupe ou ramifiées qui ont deux têtes et partagent le même cou. Adapté de (Bourne and Harris, 2008).

Ce classement très pratique établi par Harris et ses collaborateurs en 1992 est toujours utilisé aujourd'hui. Cependant, il faut garder à l'esprit que l'épine dendritique est une structure très dynamique qui fait l'objet de remodelage morphologique (taille et forme) ainsi que des changements de densité pendant le développement cérébral et au cours de l'activité synaptique.

L'arborisation dendritique se développe en fonction de signaux spécifiques qui permettent la formation de synapses fonctionnelles. L'imagerie *in vivo* a révélé que le développement dendritique est un processus en plusieurs étapes, qui commence peu après la spécification des axones. Les axones établissent des connexions spécifiques avec les ramifications dendritiques cibles grâce à une structure terminale, le cône de croissance. Véritable tête chercheuse de la cellule, cette structure assure la navigation précise de l'axone au sein des tissus. Enfin, avant d'établir un réseau neuronal interconnecté mature, une grande partie des connexions synaptiques subit un élagage (Paolicelli *et al.*, 2011). Ce processus d'élimination des synapses surnuméraires est une étape normale du développement cérébral chez les vertébrés. Chez les mammifères, après la naissance, 50% des neurones meurent par apoptose et les neurones restants subissent une importante élimination synaptique. Un autre pic d'élimination des synapses peut être observé plus tard dans le cerveau en cours de maturation principalement au stade de l'adolescence (Semple *et al.*, 2013). Tous ces processus dynamiques sont essentiels pour la maturation du cerveau. Des modifications rapides et dynamiques de la morphologie des épines ont lieu lors d'évènements de plasticité synaptique. Ainsi lors de la potentialisation à long terme (Long-Term Potentiation ; LTP), un élargissement des épines dendritiques est retrouvé dans les régions de l'hippocampe et

du cortex (Matsuzaki *et al.*, 2004) alors que lors de la dépression à long terme (Long-Term Depression ; LTD) on observe plutôt une réduction du volume des épines (Zhou *et al.*, 2004).

1.3.2 Cytosquelette

Le cytosquelette regroupe trois composants majoritaires, qui diffèrent par le diamètre en microscopie électronique :

- Les microtubules (25 nm de diamètre)
- Les filaments intermédiaires (10 nm de diamètre)
- Les microfilaments d'actine (7 à 9 nm de diamètre)

Les microtubules sont les composants majeurs des dendrites alors que les épines dendritiques contiennent principalement des microfilaments d'actine. Cependant, dans les dernières années, l'actine a été montré comme participant à la croissance de l'arbre dendritique. De plus, les microtubules sont également présents dans les épines dendritiques (Hoogenraad and Bradke, 2009).

Microtubules

Les microtubules sont des structures protéiques cylindriques creuses de 25 nm de diamètre et de longueur variable. Ce sont des polymères composés de sous-unités de Tubuline (8 nm de longueur) : α -Tubuline et β -Tubuline. L'association de chaque dimère (α et β) est dépendante de leur liaison au GTP. La sous-unité α lie du GTP non échangeable alors que la sous-unité β lie du GTP hydrolysable. L'hydrolyse du GTP- β -Tubuline en GDP- β -Tubuline va permettre l'association d'un dimère α/β -Tubuline à l'extrémité du microtubule (Kirschner and Mitchison, 1986).

Une des clés de la genèse des microtubules est leur comportement dynamique. La formation des microtubules est gouvernée par un mécanisme d'instabilité dynamique (Kirschner and Mitchison, 1986). L'instabilité dynamique se traduit par des périodes intenses d'élongation puis le microtubule atteint un point dit « catastrophe » qui se traduit par une dépolymérisation rapide (Fig. 6). Cette phase peut s'interrompre pour induire une nouvelle phase de croissance, dite de « sauvetage » où la polymérisation du microtubule reprend.

La polarisation des microtubules participe à ce comportement dynamique. Les microtubules présentent des extrémités « moins », orientées vers le centre de la cellule et des extrémités « plus », en direction de la périphérie cellulaire. Cette polarité des microtubules est essentielle pour le transport de complexes protéiques le long des microtubules neuronaux. L'extrémité « plus » correspond à la zone où la vitesse d'assemblage des dimères de Tubulines est la plus élevée. Cette vitesse d'assemblage est dépendante de la présence au niveau de l'extrémité « plus » de GTP ou de GDP. Le microtubule est protégé de la dépolymérisation par une coiffe de GTP. En raison de la nature stochastique de ce mécanisme, la population des microtubules alterne

fréquemment entre croissance et dépolymérisation en simultanée. Si les mécanismes moléculaires de perte de la coiffe de Tubuline-GTP qui déclenchent les catastrophes sont encore mal connus, ceux qui gouvernent les sauvetages de la structure des microtubules sont plus clairs. Un anticorps recombinant reconnaissant la conformation Tubuline-GTP a permis la visualisation de la coiffe GTP en croissance ainsi que de montrer la présence d'îlots de Tubuline-GTP dans les régions internes des microtubules (de Forges *et al.*, 2013).

Du fait de leur rôle important dans le transport intraneuronal, l'organisation des microtubules axonaux ou dendritiques est finement régulée. Les microtubules de l'axone sont orientés dans leurs extrémités « plus » vers la périphérie cellulaire (Heidemann *et al.*, 1981) tandis que les microtubules dendritiques ont une orientation mixte (Baas *et al.*, 1988). Cette orientation mixte est importante car des moteurs moléculaires tels que la Dynéine ou la Kinésine sont impliqués dans le transport bidirectionnel des cargos. De plus, les microtubules neuronaux sont particulièrement stables comparés à ceux d'autres types cellulaires (Seitz-Tutter *et al.*, 1988). Cette stabilité est due à des modifications de la Tubuline ou à une conformation particulière des microtubules. En effet, plusieurs microtubules peuvent s'associer en faisceau via des protéines associées aux microtubules ou MAP (Microtubule Associated proteins) régulant ainsi la dynamique des microtubules, le transport et le développement dendritique.

Depuis la découverte de l'action de la colchicine en 1967, la Tubuline et les microtubules sont des cibles des chimiothérapies dans divers types de cancers. Parmi les agents pharmacologiques permettant de moduler la polymérisation/dépolymérisation des microtubules, nous retrouvons des facteurs stabilisants tels que les taxanes, et des facteurs déstabilisants comme les alcaloïdes de pervenche ; les colchinoïdes ou les dérivés du benzimidazole.

Le taxol est une molécule naturelle de la famille des taxanes qui est extraite de l'écorce de l'if de Californie (*Taxus brevifolia*). En se liant à la β -Tubuline au niveau d'une poche à la surface luminale du microtubule, le taxol contrecarre les effets de l'hydrolyse du GTP se produisant de l'autre côté de la molécule β -Tubuline (Prota *et al.*, 2013). Cet agent pharmacologique supprime ainsi le désassemblage du polymère et agit en faveur de la polymérisation des microtubules et donc stabilise les microtubules (Fig. 6). La colchicine, un alcaloïde dérivé du colchique, se lie au niveau de l'interface intradimère Tubulines α et β et perturbe ainsi la dynamique d'assemblage des microtubules. Les alcaloïdes issus de la pervenche de Madagascar comme la vinblastine et les dérivés du benzimidazole comme le nocodazole interagissent, eux, avec les sous-unités de Tubuline libres réduisant ainsi leur capacité à s'assembler aux polymères diminuant fortement la concentration de dimères de Tubuline libres disponibles pour participer à la dynamique des microtubules (Fig. 6). Le nocodazole et la vinblastine déplacent donc l'équilibre entre polymères et sous-unités libres en faveur de la dépolymérisation et déstabilise ainsi les microtubules.

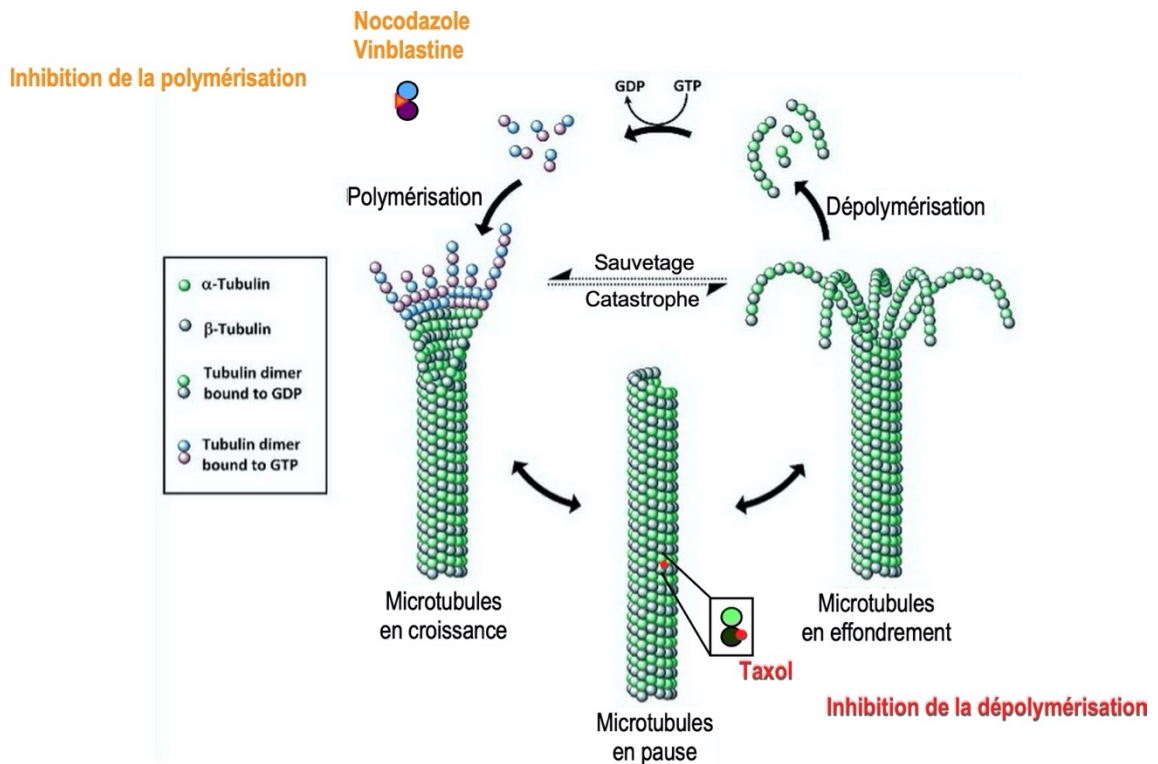


Figure 6. Processus d'instabilité dynamique d'un microtubule.

Illustration des transitions aléatoires entre la phase de croissance et de décroissance qui caractérisent l'instabilité dynamique des microtubules. Le passage de la phase de croissance à la phase de décroissance est nommé « catastrophe » et l'événement inverse « sauvetage », s'il survient avant la destruction complète du microtubule. La phase de croissance est caractérisée par la polymérisation de dimères de Tubuline GTP libres. Une fois incorporées au sein du microtubule, les Tubulines GTP peuvent être hydrolysées en GDP. La phase d'effondrement est caractérisée par la perte de dimères de Tubuline qui sont alors majoritairement sous la forme GDP. Les dimères GDP libérés du microtubule retrouvent leurs formes GTP par un mécanisme d'échange GDP/GTP et peuvent à nouveau polymériser un microtubule. Des agents pharmacologiques peuvent interférer cette instabilité. Le Taxol va se lier à la β -Tubuline dans les microtubules en pause et va empêcher la dépolymérisation du microtubule. Le nocodazole ou la vinblastine va se lier à l'interface α et β -Tubuline du dimère et empêche son intégration dans le microtubule en croissance.

La présence de microtubules dans les épines dendritiques a représenté un sujet controversé. Des études ont suggéré la présence transitoire des microtubules dans les épines dendritiques (Hu *et al.*, 2008; Merriam *et al.*, 2013; Jaworski *et al.*, 2009). Lors de la dépolarisation neuronale, la polymérisation et l'invasion des microtubules dans les épines dendritiques se déclenchent (Hu *et al.*, 2011). De plus, l'entrée locale des microtubules dans les épines est régulée par l'influx local de calcium dépendant de l'activité des récepteurs NMDA dirigeant ainsi les microtubules dans les épines actives (Merriam *et al.*, 2013). De manière intéressante, l'entrée des microtubules dans les épines dendritiques régulerait directement le transport des cargos moléculaires depuis et vers les épines dendritiques (Schapitz *et al.*, 2010).

Microfilaments d'Actine

Les épines dendritiques sont des structures riches en actine. Le cytosquelette d'actine est indispensable pour la morphogénèse des épines ainsi que la signalisation synaptique. L'actine se présente sous la forme de

microfilaments de 7 à 9 nm de diamètre, qui résultent de la polymérisation de l'actine globulaire. Les monomères d'Actine globulaire ou Actine-G s'associent entre eux pour former une structure fibrillaire, les microfilaments sous la forme Actine-F. Il existe 3 types d'Actine, l'Actine α présente dans les cellules musculaires et l'Actine β et γ qui sont présentes dans les autres types cellulaires dont les neurones. Les microfilaments d'Actine sont des structures polarisées avec une extrémité où la polymérisation est rapide et une extrémité où la polymérisation est plus lente.

La polymérisation et le remodelage des microfilaments sont contrôlés par un grand nombre de molécules qui dépendent de l'activité synaptique. Ces molécules régulatrices sont en aval des récepteurs comme, par exemple, le complexe Arp2/3 et ses activateurs. La Cortactine, un facteur favorisant la nucléation de l'Actine, recrute et relocalise Arp2/3 dans les épines dendritiques. De plus, il a été montré que les protéines SHANK interagissent avec la Cortactine stabilisant ainsi le cytosquelette d'Actine dans les épines (MacGillavry *et al.*, 2016). L'invalidation génétique d'Arp2/3 ou d'un de ses activateurs révèle un rôle important dans la régulation de la morphologie et de la densité des épines dendritiques (Hotulainen and Hoogenraad, 2010). De nombreuses protéines associées à l'organisation du cytosquelette d'Actine comme la Cortactine ou l'Anilline ont été identifiées comme jouant un rôle important dans la plasticité structurale des épines (Borovok *et al.*, 2016). Enfin, les changements structurels du cytosquelette d'actine induit à la base de l'épine dendritiques par l'activité neuronale sont directement impliqués dans l'entrée des microtubules dans le compartiment synaptique suggérant ainsi un lien étroit entre microtubules, microfilaments d'Actine et fonction synaptique (Schatzle *et al.*, 2018).

1.3.3 Densité postsynaptique ou PSD

Il existe deux types de neurotransmission, une dite excitatrice et une autre qualifiée d'inhibitrice. Les synapses excitatrices se forment principalement au niveau des épines dendritiques tandis que la neurotransmission inhibitrice se produit généralement sur l'arbre dendritique, le corps cellulaire et le segment initial des axones. La localisation de l'innervation axonale peut aider à prédire le type de neurotransmission mais la composition moléculaire de la terminaison synaptique est aussi un bon indicateur de sa fonction. Les synapses excitatrices sont caractérisées par la présence de la densité post synaptique (PSD) alors que les synapses inhibitrices ne possèdent pas de PSD a proprement parlé car la composition d'une terminaison postsynaptique inhibitrice est beaucoup moins riche en protéines (Sheng and Kim, 2011).

Localisée à l'extrémité de l'épine dendritique, la PSD est identifiée comme une structure dense aux électrons située à environ 35 à 50 nm en dessous de la membrane plasmique de la postsynapse. La PSD est une zone riche en récepteurs aux neurotransmetteurs et en protéines de signalisation et de structure intervenant dans la transmission et la plasticité synaptique. Les protéines de la PSD sont organisées autour de protéines

d'échafaudage qui se lie aux récepteurs postsynaptiques ainsi qu'aux molécules d'adhésion, aux enzymes de signalisation et au cytosquelette (Fig. 7). La composition de la PSD est modifiée par l'activité neuronale qui va renforcer ou affaiblir la connexion synaptique. Due à son importance dans la transmission synaptique, la composition de la PSD a été très étudiée après la mise au point de la purification des synaptosomes et de la PSD par l'utilisation de détergents (Whittaker, 1959; Carlin *et al.*, 1980). L'utilisation de la spectrométrie de masse a révélé la présence d'environ 300 protéines à la PSD (Collins *et al.*, 2006). On retrouve en abondance des calcium-calmoduline kinases telles que CaMKII α et β ainsi que des protéines d'échafaudage comme PSD95 et SynGAP (Synapse specific Ras/Rap GTPase Activating Protein ; Fig. 7). On retrouve aussi les récepteurs glutamatergiques de type NMDA, AMPA et Kainate qui sont impliqués dans la neurotransmission excitatrice (Sheng and Kim, 2011).

La composition de la PSD varie aussi en fonction des régions du cerveau et du stade de développement cérébral (Carlin *et al.*, 1980). La composition de la PSD peut également rapidement évoluer en réponse à l'activité neuronale, et les niveaux protéiques sont régulés à la fois par des modifications post-traductionnelles et par une traduction locale essentielle pour la transmission et la plasticité synaptique (Sheng, 2001; Bingol and Schuman, 2005; Hafner *et al.*, 2019).

Les protéines d'échafaudage

La PSD contient un grand nombre de protéines d'échafaudage qui inclut notamment PSD-95, GKAP, Shank, SynGAP et Homer (Fig. 7). Ces protéines d'échafaudage synaptiques sont abondantes à la PSD et contiennent de multiples domaines d'interaction protéine-protéine. Par exemple, la sous-famille PSD95 appartient à la famille des membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) et se caractérise par la présence d'au moins un domaine PDZ. Le domaine PDZ est un domaine structurel de 80-90 acide-aminés qui permet l'ancrage, la stabilisation et l'organisation des complexes de signalisation au niveau des membranes (Fig. 7).

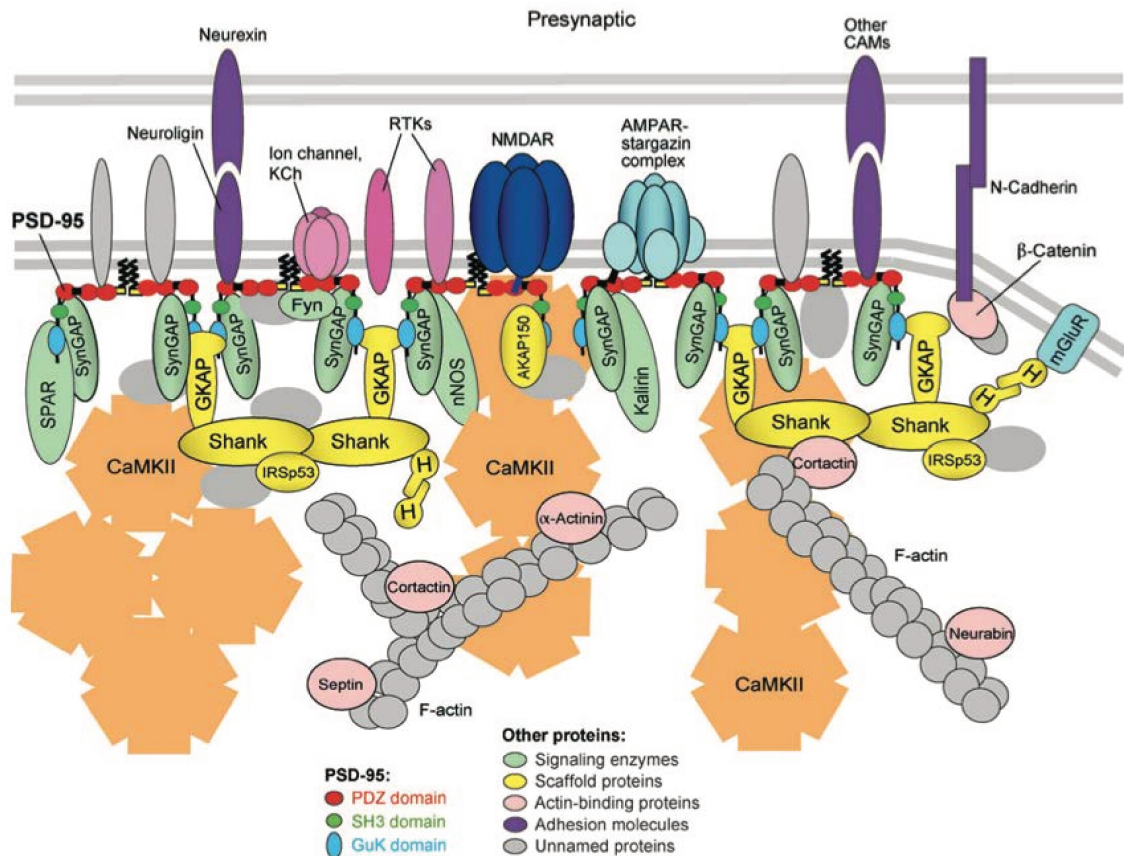


Figure 7. Organisation moléculaire de la PSD à la synapse excitatrice.

Schéma simplifié des principaux composants et des interactions protéiques se produisant à la PSD. Les protéines d'échafaudage présentent une organisation laminaire. PSD95 est proche de la membrane postsynaptique, tandis que d'autres protéines comme GKAP, SHANK ou Homer, sont retrouvées plus profondément du côté cytoplasmique. PSD95 et les protéines des voies de signalisation CaMKII et SynGAP sont les plus abondantes de la PSD. Tiré de (Sheng and Hoogenraad, 2007)

Ces domaines PDZ jouent un rôle clé dans la formation et la fonction des complexes de transduction du signal. La sous-famille PSD95 est formée de 4 membres : PSD-95, PSD-93, SAP102, SAP97. Il a été montré que PSD-95 interagit directement avec le domaine C-terminal de la sous-unité GluN2 des récepteurs NMDA, permettant ainsi de stabiliser ces récepteurs à la synapse (Prybylowski *et al.*, 2005). Des changements dynamiques lors du remodelage de la synapse s'opèrent entre PSD-95 et la sous-unité GluN2 sous le contrôle de l'activité de la calpaïne, de la CaMKII et des kinases de la famille Src (Dore *et al.*, 2014). De plus, PSD-95 participe au recrutement et à l'organisation des récepteurs AMPA à la postsynapse et ainsi, dans l'association de ces récepteurs à leurs voies de signalisation synaptique (Nair *et al.*, 2013). Bien que les récepteurs AMPA possèdent un domaine PDZ, ils sont incapables d'interagir directement avec PSD95 et ont besoin de protéines intermédiaires appelées TARP (Transmembrane AMPAR Regulatory Proteins ; (Bats *et al.*, 2007). L'association PSD95/GKAP/SHANK, abondantes à la PSD, forme ainsi un complexe directement lié à la membrane

postsynaptique comprenant récepteurs NMDA et récepteurs métabotropiques du glutamate de groupe I (Naisbitt *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 1999).

PROTEINES D'ECHAFAUDAGE	FONCTIONS	PARTENAIRES
PSD95	Organisation de la PSD Modulation de la maturation synaptique et de la force synaptique	rNMDAs TARPs
HOMER	Plateforme structurale reliant les composants de la synapse. Adressage des mGluR à la membrane Modulation de la transmission synaptique	Canaux calciques de type P-Q Canaux TRPC Dynamine III Facteur NFAT mGlu1R mGlu5R PIKE-L Récepteurs IP3 Récepteurs de la ryanodine Shank
SHANK	Recrutement et couplage fonctionnel des rAMPAs, rNMDAs et mGluRs Modulation de la transmission glutamatergique et de la force synaptique	GKAP GRIP Homer MAGUK (PSD-93 / PSD-95) Rich2 SSTR2
GKAP	Régulation de l'adressage et de la stabilité de Shank dans les épines dendritiques	DLC nArgBP2 SAP-97 Shank SSCAM PSD-95
TARPs	Adressage, régulation de la diffusion et modulation des propriétés biophysiques des rAMPAs	rAMPAs PSD-95

Tableau 1. Protéines d'échafaudage de la densité postsynaptique

Voies de signalisation postsynaptiques

Les ions calcium (Ca²⁺)

Les ions Ca²⁺ constituent le messager central de la transmission synaptique et de l'induction de la LTP. L'entrée de Ca²⁺ dans l'épine est nécessaire à l'induction de la LTP et dépend de l'ouverture des rNMDA. La suppression

du Ca^{2+} libre de l'épine par l'ajout d'un chélateur calcique tel que l'EGTA bloque l'induction de la LTP (Lynch *et al.*, 1983). Le Ca^{2+} est concentré dans la tête de l'épine dendritique grâce à son cou étroit ce qui restreint ainsi la capacité de diffusion des ions hors de l'épine. Le Ca^{2+} va contribuer à l'activation de kinases telles que les Protéines Kinases A et C (PKA et PKC) ainsi que de la Ca^{2+} /Calmoduline Kinase II (CaMKII) (Malinow *et al.*, 1988; Roberson and Sweatt, 1996).

La CaMKII

La CaMKII est une Sérine-Thréonine kinase régulée par le complexe Ca^{2+} /calmoduline. La CaMKII est nécessaire pour l'homéostasie neuronale et est essentielle pour les processus d'apprentissage et de mémorisation (Zalcman *et al.*, 2018). La CaMKII est la kinase la plus abondamment exprimée de la famille des Sérine/Thréonine kinases. Il existe différentes isoformes issues de l'expression de quatre gènes (α , β , γ et δ). Bien que la famille CaMKII soit omniprésente, les isoformes α et β sont principalement exprimées dans le cerveau. La CaMKII α assure un rôle essentiel dans la plasticité synaptique et la mémorisation (Frankland *et al.*, 2001). La CaMKII est activée par la liaison des ions calciques à la calmoduline (CaM). L'influx calcique à l'intérieur de l'épine dendritique via les récepteurs NMDA entraîne la relocalisation transitoire de la CaMKII du cytosol à la PSD via les microtubules (Lemieux *et al.*, 2012). Cet enrichissement nécessite l'interaction de la CaMKII aux éléments des microtubules, l'activation de la kinase et son autophosphorylation à la synapse. Ceci entraîne un remodelage de l'épine et l'insertion de récepteurs rAMPA à la synapse (Lemieux *et al.*, 2012). La CaMKII activée interagit également avec les filaments d'actine via l' α -actinine permettant ainsi une redistribution de la kinase à la PSD (Hell, 2014). De plus, l'interaction directe de la CaMKII avec la sous-unité GluN2 des rNMDAs est un prérequis pour la phosphorylation de la sous-unité GluA1 des rAMPA entraînant une augmentation de la conductance du canal lors de la LTP (Kristensen *et al.*, 2011). C'est pour ces raisons que la CaMKII est considérée comme le régulateur central de la LTP.

Lors de l'activation neuronale, la CaMKII participe au renouvellement des protéines synaptiques en agissant sur le recrutement du protéasome dans l'épine dendritique (Bingol *et al.*, 2010). En effet, la CaMKII a la capacité de recruter le protéasome à la postsynapse suite à son activation par le complexe Ca^{2+} /CaM, de son autophosphorylation en T286 et de sa liaison à GluN2B (Hamilton *et al.*, 2012) ce qui permet de façonner le contenu protéique de la synapse en réponse à l'activité neuronale.

La PKC

La PKC est une sérine/thréonine kinase considérée comme un médiateur classique de nombreux agonistes extracellulaires. De ce fait, elle est impliquée dans différentes fonctions physiologiques. Il existe 12 isoformes de la PKC et sont regroupés en 4 sous-familles : classique ou conventionnelle ($\alpha, \beta\text{I}, \beta\text{II}$ et γ), nouvelle ($\delta, \epsilon, \eta, \theta$),

atypique ($\zeta, \lambda/1$) et PKC-related kinases 1-3. Ce découpage repose sur la structure, l'expression tissulaire ainsi que la sensibilité des PKCs aux effets régulateurs de seconds messagers comme le Ca^{2+} et le diacylglycérol (DAG ; (Newton, 2010). Les mécanismes d'activation des PKC semblent cependant similaires pour l'ensemble de ces enzymes malgré des voies d'activation différentes.

Les différentes PKC possèdent un domaine catalytique très conservé et un domaine régulateur qui varie selon l'isoforme. Ce domaine régulateur est le domaine où se fixe les activateurs, le calcium ou les cofacteurs. Il joue également un rôle dans les interactions protéines-protéines. Ce domaine régulateur comprend les deux régions C1 et C2. La région C1 est présente dans toutes les isoformes et est le lieu de fixation du diacylglycérol, de ses analogues fonctionnels et des esters de phorbol. La région C2 est très affine pour les ions calciques. La liaison de la région C2 aux Ca^{2+} provoque un changement de conformation de la protéine qui permet de stabiliser l'enzyme en conformation active. Les études sur la PKC et la CaMKII suggèrent que chaque kinase serait responsable de phases temporelles différentes lors de la LTP avec un rôle de la CaMKII dans l'induction de la LTP et un rôle plus tardif de la PKC dans le maintien des changements liés à la LTP (Malinow *et al.*, 1989).

La PKA

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et la PKA sont impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques. La stimulation de certains récepteurs couplés aux protéines-G conduit à l'activation de protéines stimulatrices (Gs) ou inhibitrices (Gi) qui à leur tour, modulent l'activité des adénylyl cyclases et la production d'AMPC. La PKA est un tétramère constitué de deux sous-unités régulatrices R et de deux sous-unités catalytiques C. Les sous-unités R s'homodimérisent par des interactions en N-ter, et chaque sous-unité R se lie à une sous-unité C donnant une holoenzyme tétramérique. L'activation de la PKA se produit lorsque l'AMPC se lie à la sous-unité R, libérant la sous-unité C catalytique (Beebe, 1994) permettant la phosphorylation des protéines cibles à proximité. La temporalité ainsi que la spatialité sont des facteurs clé dans la signalisation de la PKA. Le signal AMPC augmente à la suite d'un stimulus neuromodulateur en formant un gradient de concentration dû à la diffusion de l'AMPC dans le cytosol. Ce gradient diminue progressivement lorsque la stimulation cesse et/ou lorsque les mécanismes de rétroactivation tel que la dégradation de l'AMPC par les phosphodiesterases, ramènent la [AMPC] vers son niveau basal. Les interactions protéiques médiées notamment par des protéines d'ancrage telles que les AKAP, maintiennent à proximité tous les partenaires de la cascade de signalisation dans ce que l'on définit comme un microdomaine de signalisation (Scott *et al.*, 2013). La géométrie du compartiment subcellulaire affecte le signal et son intégration, en favorisant une concentration élevée d'AMPC et une activation maximale de la PKA dans des espaces restreints (Neves *et al.*, 2008). Les effets fonctionnels de la cascade de signalisation AMPC ont été largement documentés dans les neurones et l'évolution de nombreuses maladies du SNC s'accompagne de remodelage de la signalisation

AMPC/PKA (Castro *et al.*, 2016). Des études cliniques et pharmacologiques ont montré une diminution de l'expression des sous-unités régulatrices et catalytiques de la PKA chez certains patients dépressifs (Akin *et al.*, 2005) alors qu'une augmentation de l'expression de ces sous-unités apparaît chez des patients atteints de troubles bipolaires (Chang *et al.*, 2003).

1.4 Récepteurs glutamatergiques postsynaptiques

Les récepteurs postsynaptiques du glutamate sont classés en deux familles : les récepteurs ionotropiques qui sont des récepteurs-canaux perméables aux cations (AMPA, NMDA et KAR) et les récepteurs métabotropiques (mGluR) qui sont eux, des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines-G.

1.4.1 Récepteurs Kainate (rKAs)

Les récepteurs de type Kainate sont des complexes tétramériques constitués des sous-unités GluK1-3 et GluK4-5. Les rKA sont composés des sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3 pouvant s'assembler en homomères fonctionnels dans des systèmes d'expression hétérologue. Les sous-unités GluK4 et GluK5 sont incapables de former des récepteurs homomériques fonctionnels et doivent s'assembler avec l'une des 3 autres sous-unités pour former des récepteurs hétérotétramériques fonctionnels, présentant des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes des homomères (Barberis *et al.*, 2008).

Les rKA jouent une grande variété de rôles dans la transmission synaptique glutamatergique. Ils peuvent être médiateurs de la réponse synaptique (Bureau *et al.*, 2000; Kidd and Isaac, 2001; Cossart *et al.*, 2002), modulateurs de la libération de neurotransmetteurs (Schmitz *et al.*, 2001) ou encore régulateurs de l'excitabilité neuronale et de la plasticité synaptique (Kamiya and Ozawa, 2000; Kamiya *et al.*, 2002; Bortolotto *et al.*, 2003).

1.4.2 Récepteurs NMDA ou N-méthyl-D-aspartate (rNMDAs)

Les rNMDAs sont des récepteurs glutamatergiques perméables aux cations essentiels pour la plasticité synaptique. Alors que les récepteurs AMPA et kainate peuvent être des homo- ou des hétérotétramères dont chaque sous-unité lie une molécule de glutamate, les récepteurs de type NMDA sont des hétéromères composés obligatoirement de deux sous-unités GluN1 liant son co-agoniste : la glycine ou la D-sérine et de deux autres sous-unités, généralement GluN2 liant le glutamate (Paoletti *et al.*, 2013). Les rNMDAs sont ancrés à la PSD grâce à l'interaction des sous-unités GluN2 avec le domaine PDZ de PSD95 (Kornau *et al.*, 1995). La sous-unité GluN3 a des effets inhibiteurs sur l'activité du récepteur. Au potentiel de repos, les rNMDAs sont bloqués par un ion magnésium. Cette inhibition est levée par une dépolarisation de la membrane qui va

permettre la dissociation de Mg^{2+} du canal permettant le flux de Ca^{2+} à travers le pore du canal. L'activation des rNMDAs entraîne le recrutement des rAMPAs à la membrane postsynaptique, alors qu'une stimulation prolongée de faible intensité entrainera plutôt une internalisation des rAMPAs.

1.4.3 Récepteurs AMPA ou alpha-amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (rAMPAs)

Les rAMPAs sont responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide. Quatre gènes codent pour les sous-unités des récepteurs : GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4. Les sous-unités sont d'abord assemblées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) sous forme de dimères et associées en homo- ou hétérotétramère. Les rAMPAs présentent des domaines transmembranaires et extracellulaires extrêmement conservés et impliqués respectivement dans l'assemblage du pore du canal et la liaison au glutamate (Shepherd and Huganir, 2007). La composition en sous-unités des rAMPAs varie en fonction des régions et du stade de développement cérébral (Lu *et al.*, 2009). Alors que GluA1-3 sont exprimées dans la plupart des types neuronaux, GluA4 est principalement exprimé pendant le développement (Zhu *et al.*, 2000). Chez l'adulte, GluA4 est retrouvée au niveau des neurones granulaires du cervelet et de certaines populations d'interneurones. Ils sont absents de la majorité des neurones pyramidaux excitateurs (Diering and Huganir, 2018). Au niveau de la région CA1 de l'hippocampe de rat, les hétéromères GluA1/2 et GluA2/3 sont prédominants (Wenthold *et al.*, 1996).

Les rAMPAs sont classés en fonction de la longueur de leur domaine C-terminal qui est une région régulée par des modifications post-traductionnelles et qui régule le trafic des récepteurs. Ils sont ainsi divisés en 2 groupes : 1) Les récepteurs à domaine C-terminal court (GluA2, GluA3 et un isoforme issu de l'épissage de GluA4) ou 2) Les récepteurs à domaine C-terminal long (GluA1, GluA4 et une isoforme issu de l'épissage de GluA2). Dans le cerveau adulte la plupart des sous-unités GluA2 subissent une édition de l'ARN (Q607R) dans la région du pore du canal. Cette édition rend les récepteurs GluA2 imperméables au Ca^{2+} . Les tétramères rAMPAs dépourvus de la sous-unité GluA2 ou d'une forme non éditée sont perméables au calcium (CP-rAMPAs) alors que les tétramères pourvu de la forme éditée sont imperméables au Ca^{2+} (CI-rAMPAs ; (Diering and Huganir, 2018).

Les rAMPAs sont endocytés, recyclés et réinsérés à la membrane plasmique. Les rAMPAs sont tout d'abord transportés le long des dendrites dans des vésicules via des protéines de transport, les kinésines et les dynéines. Le domaine C-terminal de GluA1 peut se lier à une protéine moteur sensible aux ions Ca^{2+} , la myosine Vb, qui transporte les rAMPAs contenant GluA1 jusqu'à leur site d'exocytose (Lise *et al.*, 2006). La myosine Va joue quant à elle, un rôle dans le transport des endosomes recyclant les sous-unités GluA1 phosphorylées par la CaMKII à la surface du neurone (Wang *et al.*, 2008).

Les rAMPAs sont très mobiles et diffusent latéralement à la surface des neurones entre sites synaptiques et extra-synaptiques. L'apparition de nouvelles techniques de microscopie a permis de mieux comprendre la dynamique des rAMPAs à la synapse et de visualiser leur mobilité à la surface du neurone. La technique de single particle tracking ou SPT (Tardin *et al.*, 2003) a permis de visualiser cette diffusion latérale des rAMPAs. Alors que les rAMPAs extra-synaptiques diffusent assez librement, la diffusion des rAMPAs synaptiques est plus contraintes. Les TARPs, protéines auxiliaires des rAMPAs, jouent un rôle dans leur adressage à la surface des neurones en facilitant l'export des rAMPAs depuis le réticulum endoplasmique et en favorisant leur trafic intracellulaire. Les TARPS régulent aussi la diffusion latérale des rAMPAs ainsi que leurs propriétés biophysiques (Milstein and Nicoll, 2008; Coombs and Cull-Candy, 2009; Sager *et al.*, 2009).

Les rAMPAs peuvent être totalement immobilisés à la synapse, via ses interactions au TARPs et indirectement à PSD95, pour y exercer leur activité de canal Na^{2+} (Opazo and Choquet, 2011; Opazo *et al.*, 2012). Désormais la diffusion des rAMPAs est reconnue comme un moyen pour les neurones d'opérer des échanges rapides entre récepteurs désensibilisés et récepteurs naïfs, assurant ainsi le maintien de la transmission synaptique (Heine *et al.*, 2008). Leur dynamique, affectant leur localisation au sein de la synapse, joue donc un rôle important dans l'efficacité de la transmission synaptique.

Les récepteurs AMPA ayant une affinité assez faible pour le glutamate, ils ne voient donc qu'une fraction de leur population synaptique activée lors de la libération du NT. Seuls ceux situés face au site de libération du glutamate, soit dans un rayon de 100 nm, seront activés (Savtchenko and Rusakov, 2014). De nombreuses approches d'imagerie à super-résolution (STED, PALM et STORM) ont permis de caractériser l'organisation des récepteurs AMPA dans les synapses. Ces études ont montré que les rAMPAs sont organisés en sous-structures fonctionnelles appelés « nanodomains ». 50% des nanodomains comprennent entre 20 et 25 récepteurs dans un diamètre d'environ 80-150 nm et le reste forment des nanodomains plus petits de 5 à 15 récepteurs (Goncalves *et al.*, 2020). Ces nanodomains colocalisent avec des protéines d'échafaudage telles que PSD-95 (Nair *et al.*, 2013; MacGillavry *et al.*, 2013; Goncalves *et al.*, 2020). De manière intéressante, la protéine présynaptique RIM intervenant dans la libération des vésicules synaptiques, présente une organisation clusterisée similaire aux nanodomains de PSD-95 en termes de taille et de nombre à la synapse (Tang *et al.*, 2016). Ces clusters présynaptiques sont alignés en face des clusters postsynaptiques de PSD95. Des récents travaux ont identifié la Neuroligine et la Neurexine comme liens potentiels entre les nanodomains postsynaptiques et la ZA (Goncalves *et al.*, 2020). Ceci soulève l'hypothèse d'une organisation moléculaire entre pré- et postsynapse sous forme d'un domaine transsynaptique qui pourrait ainsi participer à l'efficacité de la transmission synaptique (Choquet and Hosy, 2020).

1.4.4 Récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs)

Les mGluRs sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines-G présentant un large domaine N-terminal extracellulaire contenant le site de liaison au glutamate (Fig. 8). L'extrémité N-terminale est associée à une succession de 7 hélices transmembranaires. Le couplage aux protéines-G se fait au niveau de la 3ème boucle intracellulaire et de l'extrémité C-terminale des récepteurs et la variabilité de cette région résulte d'épissages alternatifs.

La famille des mGluRs est divisée en 3 grands groupes basés sur les homologies de séquences primaires, leurs seconds messagers et leur pharmacologie (Fig. 8 ; Niswender and Conn, 2010). Les récepteurs du groupe I sont généralement retrouvés dans la zone péri-synaptique où ils contribuent à la dépolarisation et la transmission synaptique (Shigemoto *et al.*, 1993). Les récepteurs du groupe II (mGluR2 et mGluR3) ainsi que les récepteurs du groupe III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8) sont présynaptiques et modulent aussi bien la neurotransmission excitatrice qu'inhibitrice. Ils sont négativement couplés à l'adénylyl cyclase (AMPc) via une protéine $G_{i/o}$, inhibant ainsi la voie dépendante de l'AMPc (Gerber *et al.*, 2007). La transduction du signal quant à elle, est basée sur des interactions protéiques, dites en cascade, qui nécessitent une régulation spatiotemporelle fine. Ces propriétés complexes des mGluRs font d'eux d'importants modulateurs de la transmission synaptique excitatrice.

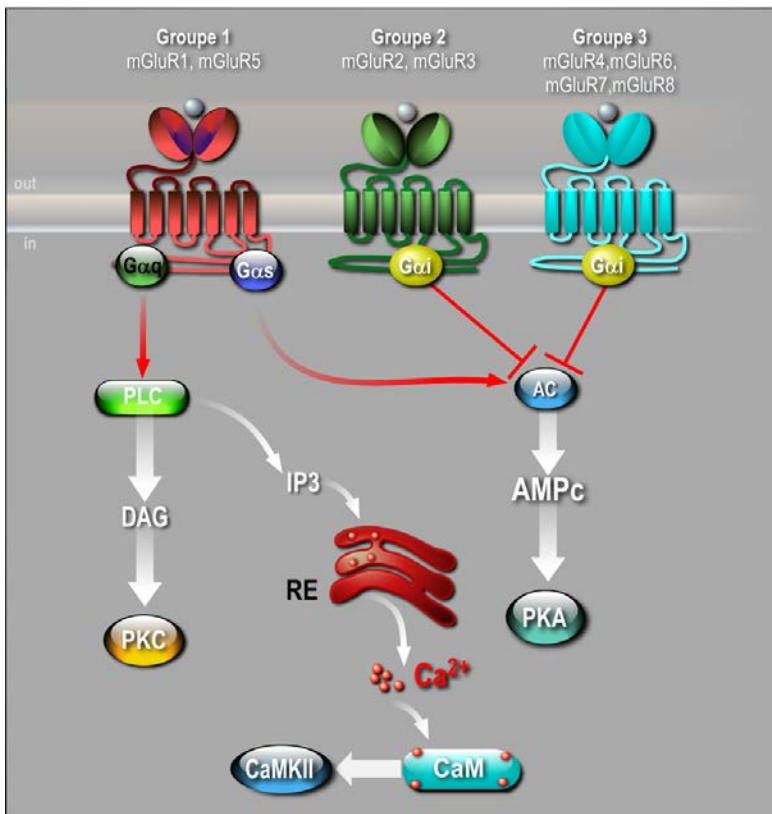


Figure 8. Voies de signalisation lors de l'activation des récepteurs métabotropiques du glutamate.

La famille mGluRs est composée de 8 RCPG différents subdivisés en 3 groupes selon leur homologie de séquence, leur pharmacologie et l'association de leurs voies de signalisation. Les mGluR du groupe I sont couplés aux protéines Gq et leur activation stimule la phospholipase C (PLC) et l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) générant de l'inositol (1,4,5)-trisphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). Ceci stimule la libération intracellulaire de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique et activent la protéine kinase C (PKC) et la CaMKII. En revanche, les mGluR des groupes II et III sont principalement couplés aux protéines $G_{i/o}$ et sont classiquement couplés à l'inhibition de l'adénylyl cyclase (AC) et régulent directement l'activité des canaux ioniques auxquels ils sont couplés.

Dimérisation des mGluRs

Les mGluRs peuvent exister sous forme de dimères. Cette dimérisation est essentielle à leur activation et nécessite la formation de ponts disulfures entre les domaines N-terminaux extracellulaires des récepteurs (Romano *et al.*, 1996; Beqollari and Kammermeier, 2010). Les structures des sites de liaison au glutamate ont deux conformations principales : une conformation ouverte ou « inactive » qui crée une poche entre les deux lobes et une conformation fermée ou « active » rapprochant ainsi les deux lobes. En absence de l'agoniste, ces deux types de conformations sont en équilibre constant (Doumazane *et al.*, 2011). Cependant des états conformationnels intermédiaires ont été mis en évidence et seraient essentiels pour la transition de la forme inactive à active du dimère (Pin and Bettler, 2016).

Des études ont montré que certaines isoformes mGluRs peuvent former des récepteurs hétéromériques (par exemple mGluR2 et mGluR4) dans les neurones (Kammermeier, 2012a; Yin *et al.*, 2014). Le manque d'agonistes sélectifs a tout d'abord entravé l'étude du rôle d'un possible hétérodimère mGlu1R/5 (Kammermeier, 2012b). L'utilisation de modulateurs allostériques négatifs dans des neurones exprimant mGlu1R et mGlu5R a permis de postuler que les deux récepteurs ne formaient pas d'hétérodimères (Sevastyanova and Kammermeier, 2014) et qu'une association physique entre dimère mGlu1R et dimère mGlu5R permet un couplage efficace des protéines-G (Doumazane *et al.*, 2011). Ce sujet reste en débat puisque, l'utilisation récente d'une technique de fluorescence consistant à mettre en contact le mGluR fusionné à la GFP et le domaine de liaison du ligand (Ligand Binding Domain, LBD) de l'autre mGluR étiqueté SNAP a permis d'identifier des hétérodimères mGlu1R/5 dans des cultures de neurones corticaux ainsi que dans le cortex de souris (Fig. 9 ; (Lee *et al.*, 2020).

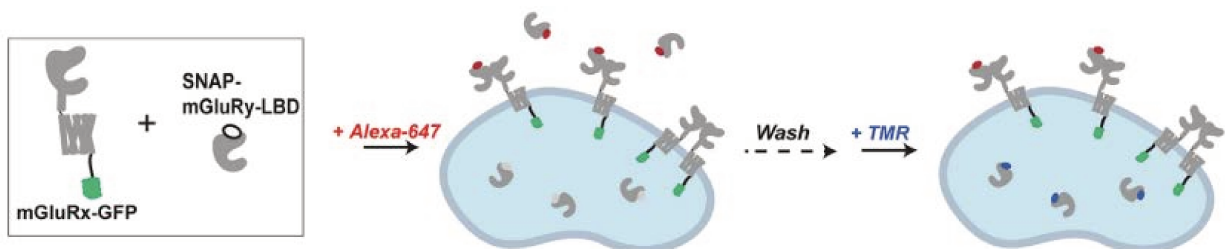


Figure 9. Schéma explicatif de la technique de complémentarité du domaine de liaison au ligand

mGluRy-LBD étiqueté SNAP dans sa partie N-terminale « SNAP-mGluRy-LBD » est co-exprimé avec mGluRx étiqueté GFP « mGluRx-GFP » dans sa partie C-terminale. Les cellules sont d'abord incubées avec l'Alexa-647, fluorophore imperméable à la membrane qui vont marquer uniquement les SNAP-mGluRy-LBD lié à mGluRx-GFP à la surface des cellules et marquées avec TMR, un fluorophore perméable, qui marque le SNAP-mGluRy-LBD intracellulaire. L'intensité de la fluorescence Alexa 647 est utilisée comme mesure d'efficacité de capture du SNAP-mGluRy-LBD par la mGluRx-GFP. La fluorescence du TMR et GFP est utilisée pour normaliser l'expression dans les différentes conditions.

Le domaine de liaison du ligand est requis pour la dimérisation des mGluRs et est le déterminant majeur de son habilité à créer des hétérodimères. Ils observent que SNAP-mGluR2-LBD forment des hétérodimères avec

mGluR4-GFP et mGluR3-GFP et montrent une préférence pour l'hétérodimérisation avec mGluR3-GFP. De plus, des hétérodimères mGluR2/3 sont retrouvés dans le cortex frontal de souris. Comme pour mGluR2, les deux SNAP-mGluR4-LBD et SNAP-mGluR7-LBD montrent une forte préférence pour un co-assemblage avec mGluR3-GFP mais aussi un assemblage avec mGluR2-GFP, mGluR4-GFP et mGluR7-GFP. Enfin, ils démontrent que mGlu1R et mGlu5R forment des hétérodimères et que mGlu1R montrent une préférence pour l'hétérodimérisation avec mGlu5R plutôt qu'une homomérisation alors que mGlu5R ne montrent aucune préférence entre hétérodimérisation avec mGlu1R et homomérisation. L'ensemble de ces données plaide en faveur d'une co-expression et d'un co-assemblage fonctionnel de dimères mGluRs notamment mGluR2/4, mGlu1R/5, mGluR3/4 et mGluR3/7 (Lee *et al.*, 2020).

Les mGluRs du groupe I

L'activation des mGluRs du groupe I induit une variété de changement dans la physiologie neuronale. Ce sont ces modulations multiples qui permettent aux mGluRs du groupe I de jouer des rôles importants dans les événements de plasticité synaptique. Les mGluRs du groupe I ont été largement étudiés de par leur lien avec de nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques. Une étude pharmacologique a abouti à la découverte de plusieurs agents pharmacologiques ciblant spécifiquement les isoformes du groupe I (Niswender and Conn, 2010). **Lors de mon projet de thèse, je me suis intéressée au rôle des récepteurs mGlu du groupe I dans la régulation de la voie de SUMOylation à la synapse.**

Les mGluRs du groupe I comprennent les récepteurs mGlu1 et mGlu5. Ces deux récepteurs présentent des homologies de séquence, des voies de signalisation similaires et sont souvent retrouvés co-exprimés dans les mêmes populations neuronales. L'épissage alternatif produit plusieurs isoformes de ces récepteurs avec un domaine C-terminal long (mGlu1Ra, mGlu5Ra-b) ou court (mGlu1Rb, mGlu5Rd) dont leur localisation cellulaire, l'efficacité de la signalisation via les protéines-G et leur désensibilisation diffèrent d'une isoforme à l'autre (Grandes *et al.*, 1994; Mary *et al.*, 1998; Malherbe *et al.*, 2002; Malherbe *et al.*, 2003). De plus, leur localisation tissulaire diffère : mGlu1R est fortement exprimé dans les cellules de Purkinje, les cellules pyramidales de CA3 dans l'hippocampe, le bulbe olfactif et le thalamus alors que mGlu5R est abondamment retrouvé dans l'hippocampe, le cortex, le striatum, le bulbe olfactif et faiblement dans le cervelet (Dhami and Ferguson, 2006).

Activation et Signalisation des mGluRs

Les mGluRs de groupe I sont couplés à la protéine $G\alpha_{q/11}$ et stimule l'activation de la phospholipase C (PLC), ce qui hydrolyse le PIP_2 en IP3 et en diacylglycérol (DAG). L'IP3 va ensuite se lier à son récepteur au RE pour libérer le calcium intracellulaire. La libération de calcium et diacylglycérol conduit à l'activation de la $PKC\gamma$ (Ferraguti *et al.*, 2008). L'activation de mGlu1R et mGlu5R dans les cellules génère des réponses oscillatoires du

diacylglycérol, de l'IP3 et du calcium à des fréquences distinctes qui peuvent être traduites par des oscillations dans l'activation de la PKC (Dale *et al.*, 2001). Cependant, ces récepteurs peuvent moduler d'autres voies de signalisation, y compris les cascades en aval de $G\alpha q$ et les voies provenant de G_i/o et $G\alpha s$. Selon le type cellulaire ou la population neuronale, les mGluRs du groupe I peuvent activer une série d'effecteurs tel que la phospholipase D, la CaMKII, la kinase Jun, les composants de la voie des MAPK/ERK et la mTOR/p70 S6 kinase. Ces deux dernières voies sont particulièrement importantes pour la régulation de la plasticité synaptique par les mGluRs du groupe I. Récemment, l'utilisation d'un senseur optogénétique dans des neurones hippocampiques a montré une activation non-canonique de la PKA via les récepteurs couplés à la protéine $G\alpha q$ incluant les mGluRs du groupe I (O'Hayre *et al.*, 2017). De plus, Mundell et ses collègues montre que la PKA est un régulateur clé du couplage et du trafic de mGlu1R et mGlu5R (Mundell *et al.*, 2004). Cependant, la PKA semble avoir un effet opposé à celui de la PKC. Les récepteurs mGlu1R et mGlu5R présentent également une activité indépendante de l'agoniste appelée activité constitutive (Joly *et al.*, 1995; Prezeau *et al.*, 1996; Ango *et al.*, 2001). Les niveaux de phosphorylation des MAPK ERK1/2 sont diminués en présence d'agents pharmacologiques bloquant spécifiquement l'activation de mGlu1R et mGlu5R sans activation préalable démontrant une activité constitutive de ces deux récepteurs sur des cultures primaires de neurones corticaux (Hu *et al.*, 2010).

Liaison des mGluRs à des protéines synaptiques

De multiples protéines interagissent directement avec la partie C-terminale des mGluRs et jouent un rôle important dans la régulation de la signalisation des récepteurs. Parmi ces protéines, HOMER est la mieux caractérisée. Localisée à la PSD, HOMER interagit avec les acides aminés PPXXF de la partie C-terminale des mGlu1R/5 par l'intermédiaire de leur domaine PDZ. HOMER agit comme une plateforme liant les mGluRs à des complexes protéiques de la PSD qui sont importants à la fois pour l'activité des récepteurs et pour l'activation des voies de signalisation. Différents variants d'épissage de HOMER régulent la localisation des mGluRs dans le neurone. Les longues formes Homer 1b et 1c jouent un rôle dans la localisation synaptique des mGluRs du groupe I, leur insertion à la membrane et les interactions avec les autres effecteurs intracellulaires (Kammermeier, 2006). La forme courte 1a dont son expression augmente au cours d'un stress cellulaire ou suite à l'activation neuronale, agit comme un modulateur dominant négatif qui rentre en compétition avec les formes longues d'HOMER réduisant le couplage de mGlu5R avec certains effecteurs perturbant ainsi la signalisation intracellulaire (Kammermeier and Worley, 2007). HOMER1a contrebalance l'hyperexcitabilité des neurones et joue un rôle clé dans la neuroprotection endogène. Les formes longues de HOMER interagissent avec des protéines régulatrices de la signalisation calcique et les iGluRs (Bockaert *et al.*, 2010). Les protéines d'échafaudage HOMER1b/c, SHANK et PSD95 permettent l'association des mGluRs du groupe I avec les rNMDAs (Tu *et al.*, 1999). Inversement, la protéine d'échafaudage PICK1 qui contient un site de liaison pour

mGluR3/7 et les rAMPA donne la possibilité d'une compétition pour sa fixation aux mGluRs ou iGluRs (Perroy *et al.*, 2002).

Désensibilisation et endocytose des mGluRs du groupe I

La réponse des mGluR du groupe I est régulée par la désensibilisation. La désensibilisation des récepteurs se produit après une exposition prolongée à l'agoniste. C'est un mécanisme « rétroactif » qui protège à la fois contre la surstimulation aiguë et chronique des récepteurs. Ce processus implique, la phosphorylation des récepteurs, la liaison à la β -arrestine et l'internalisation des récepteurs (Dhami and Ferguson, 2006). Le modèle canonique de désensibilisation fait intervenir une kinase des récepteurs au protéines G (GRK) qui favorise la liaison des β -Arrestines pour découpler les RCPG de ses effecteurs. Les β -Arrestines participent alors à l'endocytose des récepteurs via les vésicules recouvertes de clathrine en fonctionnant comme des molécules adaptatrices endocytiques qui recrutent la clathrine et β 2-Adaptine (Fig. 10). Une fois internalisés, la plupart des RCPG sont soit déphosphorylés dans le compartiment endosomal et sont rapidement recyclés à la surface cellulaire, soit adressés aux lysosomes pour dégradation. Comme pour de nombreux autres RCPG, la transduction du signal des voies mGluRs sont régulées par de multiples mécanismes agissant à différents niveaux. Les mGluRs du groupe I peuvent subir une désensibilisation à la fois agoniste-dépendante et agoniste-indépendante (Fig. 10). La PKC va permettre la désensibilisation des mGluRs sélectivement via $G\alpha_q$ mais n'atténue pas le couplage du récepteur à l'adénylyl cyclase via $G\alpha_s$. La phosphorylation par la PKC de la sérine 901 (S901) de mGlu5R provoque la dissociation de la calmoduline conduisant à l'internalisation du récepteur phosphorylé. L'équilibre entre la phosphorylation de mGlu5R et la liaison à la calmoduline est un déterminant clé du trafic des mGlu5R et de la signalisation intracellulaire calcique stimulée par ces récepteurs (Lee *et al.*, 2008). Choi et ses collègues ont montré que mGlu1R ne s'associe pas à la calmoduline et ils émettent l'hypothèse que les différences dans la signalisation des mGluRs du groupe I peuvent résulter de cette différence de liaison à la calmoduline (Choi *et al.*, 2011).

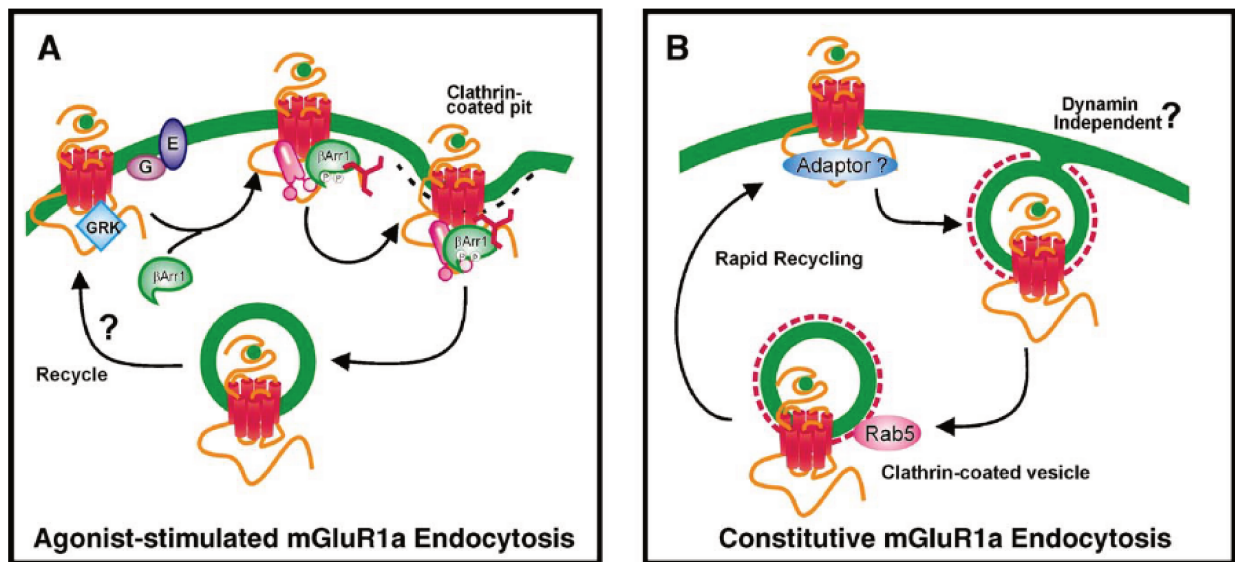


Figure 10. Voies de l'endocytose des récepteurs mGlu.

(A) L'internalisation stimulée par l'agoniste est médiée par un mécanisme β -arrestines, dynamine- et clathrine-dépendant. (B) Le mécanisme d'internalisation de la mGluR indépendant de l'agoniste est indépendant de β -arrestins et de la dynamine, mais est médié par des vésicules recouvertes de clathrine. β arr, β -arrestin ; E, enzyme effectrice ; G, protéine G ; GRK, kinase couplé aux RCPG (D'après Dhami and Ferguson, 2006).

L'imagerie en temps réel des neurones ou des cellules HEK exprimant les mGluRs du groupe I a permis de montrer une internalisation des récepteurs indépendante de l'agoniste représentant une caractéristique importante de cette classe de récepteurs. L'internalisation constitutive était initialement proposée comme une simple conséquence de la libération de glutamate par les cellules en culture. Cependant, le traitement des cellules avec des agents pharmacologiques pour métaboliser le glutamate libéré n'a aucun effet sur la diminution de l'expression des mGluRs à la surface (Dale *et al.*, 2001). L'internalisation constitutive des mGlu1R semble indépendante de la phosphorylation médiée par les GRK. L'internalisation constitutive du mGlu1Ra peut être abolie à l'aide d'agonistes inverses de ces récepteurs (Pula *et al.*, 2004) alors que l'endocytose constitutive des mGlu5Ra n'est pas affecté par l'utilisation d'agonistes inverses (Fourgeaud *et al.*, 2003) révélant des mécanismes de trafic différents pour ces deux types de récepteurs.

mGlu1R et cytosquelette

Les mGlu1R sont associés au cytosquelette et en particulier aux microtubules. Le domaine C-terminal de mGlu1Ra interagit avec la tubuline (Ciruela *et al.*, 1999; Ciruela *et al.*, 2001) et les protéines associées aux microtubules MAPs (Huang and Hampson, 2000). De plus, l'activation de mGlu1R inhibe la capacité des protéines associées aux microtubules (MAPs) à promouvoir la polymérisation de la tubuline (Huang and Hampson, 2000). Cela suggère qu'à la synapse, l'activation des mGlu1R entraîne des changements avec des conséquences importantes pour des événements dépendants des microtubules comme l'endocytose,

l'exocytose, le trafic vésiculaire et le transport moléculaire ainsi que sur le remodelage et la plasticité synaptique (Mandelkow and Mandelkow, 1992). Récemment, il a été montré que le complexe SNAP23-Kif5 contrôle le trafic des récepteurs mGlu1R le long des microtubules et contribue à son expression à la surface cellulaire (Raynaud *et al.*, 2018).

1.5 La plasticité synaptique

La plasticité synaptique est le terme regroupant l'ensemble des mécanismes morphologiques et moléculaires caractéristiques de la synapse excitatrice lui permettant d'adapter sa forme et sa composition en fonction du stimulus reçu. Pour cela, le neurone a la capacité de moduler le nombre, la composition ou les propriétés biophysiques des récepteurs à sa surface dans le but de renforcer ou d'affaiblir la réponse postsynaptique suite à une même libération de neurotransmetteurs. Il existe plusieurs types de plasticité synaptique, qui peuvent être induites expérimentalement et qui diffèrent dans leurs caractéristiques, les protocoles d'induction et le type neuronal ou la région cérébrale où ce type de plasticité opère. Néanmoins, on peut classer les différentes plasticités synaptiques en 4 catégories :

- La plasticité à court-terme : L'activité synaptique est modulée sur une échelle de quelques secondes à quelques minutes (Zucker and Regehr, 2002).
- La plasticité à long-terme : Les modifications de l'activité synaptique vont persister pendant des heures, des jours ou plus encore (Malenka and Bear, 2004).
- La métaplasticité : Modifications, à la suite d'un événement initial, de la capacité d'un stimulus à induire une plasticité synaptique à long terme. La nature de la plasticité n'est pas modifiée, c'est uniquement la réactivité aux stimuli présynaptiques qui est modulée. On la réfère souvent comme « la plasticité de la plasticité » (Rebola *et al.*, 2017).
- La plasticité homéostatique : Modifications persistantes de l'activité du réseau neuronal qui entraînent des changements compensatoires de l'excitabilité neuronale (Turrigiano, 2008).

En théorie, chacune de ces formes de plasticité peut subir des modifications dépendantes de l'activité à la pré- ou à la postsynapse modulant ainsi l'efficacité de la réponse synaptique. Cependant, la question de savoir si la plasticité synaptique est médiée par la pré- (Salin *et al.*, 1996) ou la postsynapse (Bliss and Collingridge, 1993; Malenka and Bear, 2004) fait depuis longtemps l'objet de débats. Si les modifications présynaptiques sont à l'origine de plusieurs formes de plasticité synaptique, il est désormais largement admis que les modulations de la force synaptique sont principalement médiées par les propriétés biochimiques et le nombre de récepteurs postsynaptiques en particulier les récepteurs du glutamate de type AMPA (Malinow and Malenka, 2002; Shepherd and Huganir, 2007). La dépression à long terme (Long-Term Depression ; LTD) ou la potentialisation à long terme (Long-Term Potentiation ; LTP) sont les formes les plus étudiées de la plasticité synaptique et

jouent un rôle essentiel dans l'apprentissage et la mémorisation. Ces deux types de plasticité résultent de cascades de signalisation complexes faisant intervenir une augmentation de calcium intracellulaire et la régulation du trafic des rAMPAs. La nature spatiotemporelle de l'augmentation du calcium intracellulaire détermine l'orientation du processus de plasticité synaptique plutôt vers la LTD ou la LTP (Kerchner and Nicoll, 2008; Anggono and Huganir, 2012; Nicoll, 2017). Plus récemment, Diering et Huganir ont proposé un « code » de la plasticité synaptique dépendant des rAMPAs dans lequel il résume les connaissances sur les combinaisons des sous-unités rAMPAs et les interactions protéines-protéines impliquées dans la plasticité synaptique. Ce code met en avant le rôle essentiel des modifications post-traductionnelles dans la régulation des événements de plasticité synaptique (Diering and Huganir, 2018).

Pendant la plasticité synaptique, le nombre des rAMPAs et/ou leur affinité pour le glutamate sont modifiés à la PSD. Le trafic des rAMPAs colonise les emplacements à la PSD de façon hiérarchique basé sur leur affinité pour les emplacements ainsi que leur mobilisation et leur mobilité à la surface cellulaire. Les rAMPAs rejoignent leur emplacement via une diffusion latérale du pool extra-synaptique. Pendant la LTP, le pool de surface sont localement enrichis en récepteurs contenant GluA1 par l'exocytose dépendant d'activité alors que lors de la LTD, les rAMPAs à la surface sont localement diminués via l'endocytose des récepteurs contenant GluA2 (Fig. 11).

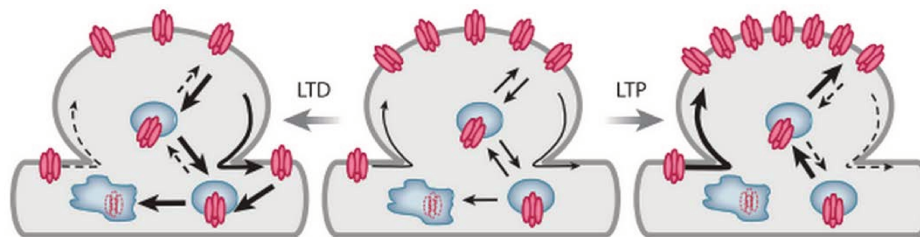


Figure 11. Schéma simple de la plasticité synaptique.

Les changements à long terme, dépendants de l'activité sont déterminés principalement par le nombre de rAMPAs à la synapse. Une augmentation de la diffusion latérale et/ou de l'insertion directe des rAMPAs à la PSD donne lieu à un LTP, tandis qu'une augmentation de la diffusion latérale hors de l'épine dendritique et/ou de l'internalisation et de la dégradation des AMPAR synaptiques donne lieu à un LTD. Les flèches épaisses représentent une augmentation (par rapport à l'état basal) et les flèches en pointillés représentent une diminution de l'étape de trafic du récepteur.

La LTP

La LTP se traduit par un renforcement persistant de la réponse postsynaptique qui requiert l'exocytose des rAMPAs et leur diffusion latérale jusqu'à la synapse. De manière expérimentale, la LTP peut être déclenchée par une stimulation électrique brève avec des impulsions à haute fréquence (100 Hz à intervalle de 200 ms) ou par stimulation chimique comme par exemple, le traitement de neurones en culture avec de la glycine, un co-agoniste des rNMDAs (Lu *et al.*, 2001). La forme de LTP la mieux caractérisée est la forme dépendante de l'activation des rNMDAs. Elle s'exprime par une augmentation de l'activité fonctionnelle ou du nombre de rAMPAs à la postsynapse. Les rNMDAs agissent comme des « détecteurs de coïncidence » entre excitation des

éléments pré- et postsynaptiques permettant l'entrée de calcium. Cette entrée massive de Ca^{2+} déclenche des cascades de signalisation faisant intervenir l'activation des kinases CaMKII, PKA et PKC et des événements de phosphorylation nécessaires à l'insertion des rAMPAs à la membrane postsynaptique (Diering and Huganir, 2018). La phosphorylation de différents résidus Sérine de GluA1, la S831 par la CAMKII, la S845 par la PKA et la S818 par la PKC, joue respectivement un rôle dans l'augmentation de la conductance et la probabilité d'ouverture des rAMPAs (Kristensen *et al.*, 2011), la stabilisation des récepteurs à la synapse via des interactions avec des protéines d'ancrage (Opazo and Choquet, 2011) et le maintien des rAMPAs perméables au calcium (He *et al.*, 2009) ou favorise encore l'interaction des récepteurs avec la protéine d'ancrage 4.1N et le cytosquelette (Lin *et al.*, 2009).

Il est maintenant bien accepté que les hétéromères GluA1/2 sont rapidement recrutés à la synapse lors de la LTP alors que les hétéromères GluA2/3 sont recrutés de manière constitutive et remplacent progressivement les rAMPAs contenant la sous-unité GluA1 au niveau des synapses potentialisées (Diering and Huganir, 2018). GluA2 et GluA3 interagissent avec GRIP1/2 et PICK1 qui à leur tour, se lient à des protéines impliquées dans le trafic des rAMPA. Les CP-AMPA sur les sites pérисynaptiques sont rapidement mais transitoirement insérés à la synapse et sont remplacés par des rAMPA contenant la sous-unité GluA2 dans un délai de 30 min (Plant *et al.*, 2006). En effet, PICK1 piège les rAMPA contenant GluA2 dans les endosomes pendant la phase précoce de la LTP (Clem *et al.*, 2010; Jaafari *et al.*, 2012). En outre, les souris knock-out pour la sous-unité GluA2 montrent une LTP améliorée, ce qui suggère que les rAMPAs contenant GluA2 jouent un rôle dans la modulation de l'intensité d'expression de la LTP (Meng *et al.*, 2003).

L'activité des récepteurs mGlu1R et mGlu5R module également l'induction et le maintien de la LTP. L'inhibition à la fois de l'activation de mGlu1R et de mGlu5R peut interférer complètement avec l'induction (Gubellini *et al.*, 2003) et le maintien de la LTP (Neyman and Manahan-Vaughan, 2008). Des expériences d'électrophysiologie sur des souris invalidées pour mGlu1R ont montré une LTP réduite dans différentes régions du cerveau (Conquet *et al.*, 1994). Dans l'hippocampe, les souris déficientes en mGlu1R présentent une LTP normale ou légèrement réduite dans le CA1 et le gyrus denté et une LTP altérée dans les fibres moussues du CA3. Ces souris montrent également une performance réduite dans la réalisation de tâches liés au conditionnement par la peur dépendant du contexte (Aiba, 1994). Inversement, les souris déficientes en mGlu5R présentent une réduction de la LTP dans le CA1 mais une LTP normale dans les fibres moussues du CA3 associée à une diminution de l'apprentissage spatial (Lu *et al.*, 1997). Il a été suggéré que le rôle des mGluR du groupe I sur la LTP soit lié à une augmentation de la réponse médiée par les NMDARs via l'activation de plusieurs mécanismes dépendant du calcium (Dineley *et al.*, 2001).

La LTD

Inversement, la LTD correspond à un affaiblissement des synapses qui est caractérisé par la diffusion latérale des rAMPAs en dehors de la synapse, suivie de leur endocytose. Il existe deux formes relativement bien caractérisées : la LTD dépendante des mGluRs (mGluR-LTD) et la LTD dépendante des rNMDA (rNMDA-LTD ; (Huganir and Nicoll, 2013). Leur induction se fait par des voies de signalisation distinctes et leurs effets peuvent être additifs. La mGluR-LTD requiert à la fois l'activation des mGluRs et un afflux de Ca^{2+} par les canaux calciques voltage-dépendant activant les voies de signalisation de la PKC et Erk/MAPK. Il a été montré que l'amplitude de la LTD est réduite dans les tranches de souris invalidées pour mGlu1R associée à une déficience de réflexe oculaire et de coordination motrice suggérant que l'expression de la LTD nécessite l'activation sélective des mGlu1R (Conquet *et al.*, 1994; Gubellini *et al.*, 2001).

La rNMDA-LTD requiert elle un influx calcique plus faible mais prolongée dans le temps qui va activer les molécules senseurs calciques, principalement des phosphatases, qui modifient les résidus phosphorylés des rAMPAs ou des protéines régulant leur trafic. La LTD dépendante de l'activité des mGlu5R fait aussi intervenir le gène de transcription *Arc* ce qui n'est pas le cas pour la forme dépendante de rNMDA (Park *et al.*, 2008). Les deux types de LTD mobilisent des populations distinctes de rAMPAs car la mGluR-LTD favorise l'internalisation des rAMPAs associés à la protéine GRIP alors que la rNMDA-LTD facilite l'internalisation des rAMPAs plus mobiles et non associés à GRIP (Casimiro *et al.*, 2011). De plus, la rNMDA-LTD requiert l'activation de la phosphatase PP2A (Nicholls *et al.*, 2008).

Comme détaillée dans cette partie, l'épine dendritique est composée de plusieurs acteurs moléculaires qui diffusent ou interagissent à la synapse comme les récepteurs du glutamate, les protéines d'ancrage et d'adhésion qui sont étroitement liées à la formation, la transmission et la plasticité synaptique. Ces processus synaptiques ne reposent pas uniquement sur leurs propriétés de diffusion ou le piégeage/ancrage des protéines à la terminaison postsynaptique mais dépendent également de la disponibilité des composants et de leurs affinités respectives. De ce fait, il existe un équilibre très strict entre diffusion et interaction des molécules qui est essentiel à la formation et à la stabilisation des synapses ainsi qu'à la transmission et à la plasticité synaptique. Des anomalies de cet équilibre sont à l'origine de la quasi-totalité des dysfonctionnements synaptiques et par conséquent, participe à l'étiologie même de nombreux désordres neurologiques. On retrouve des dysfonctionnements de la synapse dans les troubles du spectre autistique, la schizophrénie ou encore dans les maladies neurodégénératives de type Alzheimer, Parkinson ou Huntington...). Cet équilibre entre diffusion et interaction des acteurs moléculaires de la synapse est régulé par des modifications post-traductionnelles. Parmi ces modifications, on retrouve entre autres la phosphorylation, la palmitoylation, l'ubiquitination ou encore la SUMOylation.

2 SUMOylation, une modification post-traductionnelle essentielle

Découverte en 1996, la SUMOylation est un processus enzymatique qui consiste en la liaison covalente de la protéine SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) sur des résidus lysines d'une protéine cible (Matunis *et al.*, 1996). La protéine SUMO est une petite protéine d'environ 100 acides aminés (11 kDa) et de structure tridimensionnelle similaire à l'ubiquitine. SUMO partage 18% de similarité avec la séquence primaire de l'ubiquitine et possède une vingtaine d'acides aminés de plus au niveau de son domaine N-terminal. Ces différences permettent à ces deux protéines d'exercer des fonctions distinctes (pour revue : Folci *et al.*, 2020).

2.1 La machinerie de SUMOylation

La famille des protéines SUMO est très conservée chez les Eucaryotes. Cinq paralogues de SUMO ont été identifiés chez l'humain. SUMO1-3 sont exprimés de façon ubiquitaire (Hay, 2005) alors que SUMO4 est exprimé dans la rate, le rein et les ganglions lymphatiques (Bohren *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2004) et SUMO5 retrouvé dans les poumons et la rate (Liang *et al.*, 2016). Les paralogues SUMO2 et SUMO3 ne diffèrent que par 3 résidus et ne présentent que 47% d'homologie avec SUMO1. On les mentionne généralement comme une seule entité, SUMO2/3. Alors que certaines protéines peuvent être modifiées à la fois par SUMO1 et SUMO2/3, les paralogues diffèrent en termes de propriétés et d'abondance dans la cellule. SUMO2/3 peut former des chaînes poly-SUMOylées contrairement à SUMO 1 qui ne contient pas le résidu lysine au niveau N-terminal indispensable à la formation de ces chaînes poly-SUMO (Tammsalu *et al.*, 2015). De plus, les paralogues SUMO2/3 peuvent être retrouvés sous forme libre dans la cellule alors que SUMO1 est majoritairement conjuguée à ses protéines cibles.

La SUMOylation est un processus enzymatique dynamique et réversible. On retrouve ainsi des étapes de maturation, d'activation, de conjugaison, de liaison et de clivage (Fig. 12). La protéine SUMO est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif. La maturation se fait par l'activité hydrolase d'enzymes spécifiques appelées SENP (SUMO/Sentrin-specific protease). Ceci permet l'exposition d'un doublet de Glycine (G) au niveau C-terminal où se fera la liaison avec le résidu lysine de la protéine cible. La forme mature SUMO-GG est ensuite transférée sur le substrat via une cascade faisant intervenir une enzyme d'activation E1 (SAE1/SAE2), l'enzyme de conjugaison Ubc9 et la liaison covalente est souvent facilitée par une E3 SUMO ligase comme par exemple les protéines de la famille PIAS ou encore RanBP2. Ce processus est réversible par l'intermédiaire de désSUMOylases (SENPs) permettant une désSUMOylation rapide des protéines SUMOylées (Fig. 10).

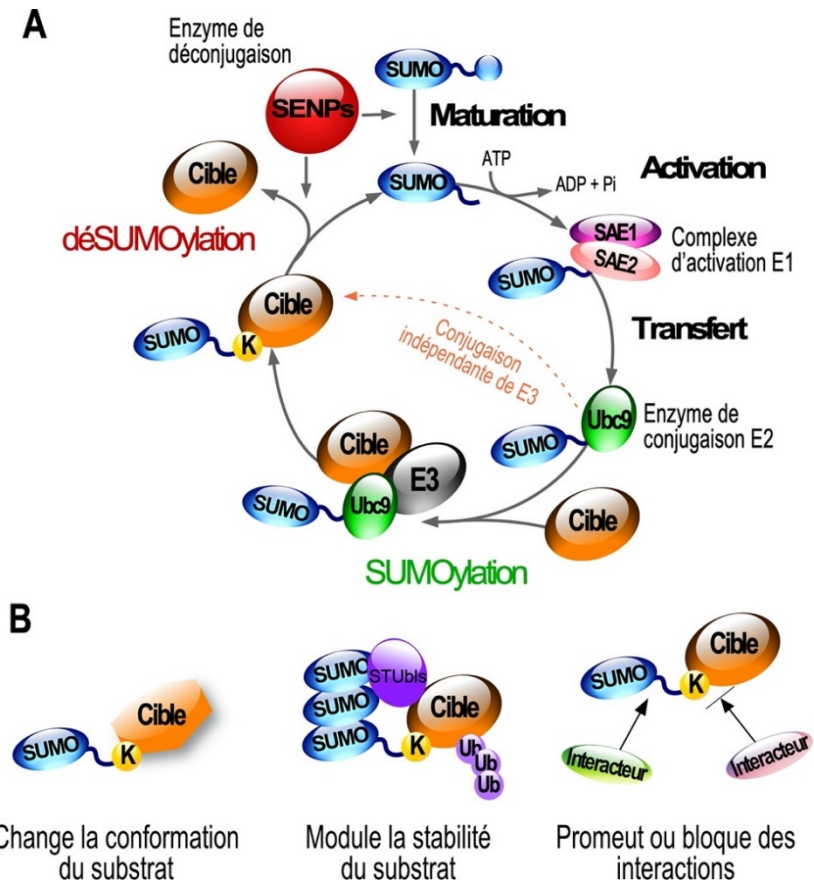


Figure 12. Cascade de SUMOylation et conséquences moléculaires.

A Le précurseur de SUMO est dans un premier temps clivé dans sa partie C-terminale par les SUMO protéases (SENPs) pour exposer le motif di-Glycine (étape de maturation). SUMO est activé par l'enzyme E1 constituée des sous-unités SAE1 et SAE2 (étape d'activation), puis transféré sur le site actif à l'enzyme de conjugaison Ubc9 (étape de transfert). En combinaison avec une enzyme E3 qui assure la reconnaissance de la cible, Ubc9 se rapproche de la protéine cible, facilitant sa modification covalente par SUMO. La réaction est réversible grâce à l'intervention de SUMO protéases ou désSUMOylases (SENPs, Sentrin Protease). **B** La SUMOylation peut avoir 3 conséquences moléculaires : SUMO peut réguler l'activité du substrat en induisant un changement de conformation des protéines, contrôler la stabilité du substrat par compétition avec l'ubiquitine ou par le biais de recrutement de l'Ubiquitine ligase (STUbls) ou peut encore modifier les profils d'interaction en bloquant la liaison d'une protéine ou en agissant comme un facteur de recrutement de nouveaux interacteurs.

Chez les mammifères, trois classes de désSUMOylases ont été décrites à ce jour, selon leur structure : les SENP (Sentrin Protease, en référence à l'ancien nom de SUMO), DESI1 et 2 (Desumoylating Isopeptidase 1 et 2 (Shin *et al.*, 2012), et USPL1 (Ubiquitin-Specific Protease-Like1 ; (Schulz *et al.*, 2012). Les SENPs sont les désSUMOylases les mieux décrites. Il existe 6 isoformes de SENP présentant une spécificité de substrat due à leur distribution subcellulaire (Tableau 2)

Les SENPs peuvent cliver SUMO1 et SUMO2/3, et ce, bien que certaines SENPs montrent une affinité supérieure pour l'un ou l'autre des paralogues. De même SENP1, SENP2 et SENP5 ont été décrites comme étant capables de cliver les précurseurs de SUMO alors que SENP6 et SENP7 sont les seules à pouvoir éditer les chaînes SUMO, c'est-à-dire cliver la liaison entre deux SUMO, sans ôter l'entité SUMO directement liée à la

protéine cible (Nayak and Muller, 2014). Ces enzymes de la machinerie de SUMOylation, comme Ubc9 pour la conjugaison et les SENPs pour la déconjugaison de SUMO, contrôlent ainsi l'équilibre entre l'état SUMOylé et désSUMOylé des protéines et sont de ce fait, indispensables pour l'homéostasie cellulaire.

2.1.1 Distribution de la machinerie de la voie de SUMOylation dans les neurones

La machinerie de la voie de SUMOylation est retrouvée majoritairement dans le noyau, mais aussi dans le cytosol, la mitochondrie ainsi qu'au niveau des terminaisons pré- et postsynaptiques (Loriol *et al.*, 2012; Loriol *et al.*, 2013). Récemment, Colnaghi et ses collègues ont utilisé la microscopie à haute résolution (SIM) pour confirmer la distribution subcellulaire des paralogues SUMO1 et SUMO2/3 et de l'enzyme de conjugaison Ubc9 dans des neurones en cultures (Colnaghi *et al.*, 2019). En accord avec toutes les études précédentes, ils rapportent qu'une majorité des paralogues SUMO 1-3 et de l'enzyme de conjugaison Ubc9 sont présents dans le noyau ainsi qu'au niveau des terminaisons pré- et postsynaptiques (Martin *et al.*, 2007b; Loriol *et al.*, 2012; Loriol *et al.*, 2013; Loriol *et al.*, 2014; Josa-Prado *et al.*, 2019). L'utilisation de 3 anticorps spécifiques reconnaissant différentes épitopes des paralogues SUMO2/3 sur des cultures de neurones hippocampiques ont permis de confirmer une colocalisation partielle de SUMO2/3 avec un marqueur présynaptique, la synaptophysine, et avec un marqueur postsynaptique, PSD95 (Colnaghi *et al.*, 2019).

Concernant les enzymes de désSUMOylation SENP1, SENP6 et SENP7, elles sont trouvées à la fois dans le noyau et dans le cytosol (Loriol *et al.*, 2012; Loriol *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2016; Schorova *et al.*, 2019; Colnaghi *et al.*, 2020) ; [Tableau 2](#)). Ces trois désSUMOylases sont également partiellement colocalisées avec des marqueurs pré- et postsynaptiques dans des cultures primaires de neurones hippocampiques de souris (Loriol *et al.*, 2012; Loriol *et al.*, 2013; Schorova *et al.*, 2019; Colnaghi *et al.*, 2020). Les fonctions neuronales et synaptiques de SENP7 restent encore peu étudiées, cependant les dernières données publiées (Colnaghi *et al.*, 2020) suggèrent la présence de polychaînes SUMO 2/3 à la synapse puisque SENP7 est capable d'éditer les chaînes SUMOylées formées des paralogues SUMO2/3. Bien que principalement identifiée dans le noyau, SENP3 est également présente au niveau des mitochondries et des synapses (Guo *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2017).

Les niveaux protéiques des multiples SENPs sont différemment régulés dans les neurones. Par exemple, les niveaux de SENP1 sont augmentés alors que les niveaux de SENP3 sont diminués dans les neurones pendant un stress cellulaire ischémique (Luo *et al.*, 2017) indiquant que les 2 désSUMOylases sont régulées par différentes voies, et qu'il y a probablement une relation mutuelle entre activité et/ou niveaux de SENP1 et SENP3.

SUMO Protease	Poids moléculaire	Localisation subcellulaire	Références
SENP1	70kDa	Majoritairement nucléaire ; cytoplasme et SYNAPSE.	(Loriol <i>et al.</i> , 2012; Loriol <i>et al.</i> , 2013; Schorova <i>et al.</i> , 2019; Colnaghi <i>et al.</i> , 2020)
SENP2	70kDa	Majoritairement nucléaire ; cytoplasme	(Fu <i>et al.</i> , 2014)
SENP3	65kDa	Nucléole et compartiments extranucléaires associés à la mitochondrie.	(Akiyama <i>et al.</i> , 2018)
SENP5	86kDa	Nucléole et compartiments extranucléaires comme la mitochondrie et la SYNAPSE.	(Akiyama <i>et al.</i> , 2018)
SENP6	130kDa	Noyau, majoritairement dans le cytosol et SYNAPSE.	(Loriol <i>et al.</i> , 2012; Loriol <i>et al.</i> , 2013; Colnaghi <i>et al.</i> , 2020)
SENP7	112kDa	Nucléoplasme, cytoplasme et SYNAPSE.	(Colnaghi <i>et al.</i> , 2020)

Tableau 2. Localisation subcellulaire des différentes SUMO protéases dans les neurones.

2.1.2 Régulation neurodéveloppementale de la machinerie de SUMOylation

Le niveau d'expression des enzymes de la machinerie de SUMOylation varie au cours du développement cérébral. Les niveaux d'ARNm codant pour Ubc9 et SUMO1 sont régulés lors du développement embryonnaire du cerveau de rat avec une surexpression de ces ARNm juste avant la naissance (Watanabe *et al.*, 2008). De plus, les niveaux de substrats SUMOylés et l'expression protéique des paralogues de SUMO, des enzymes de SUMOylation SAE1, SAE2 et Ubc9 ainsi que des enzymes de désSUMOylation SENP1 et SENP6 sont différenciellement régulés durant le développement cérébral chez le rat (Loriol *et al.*, 2012; Josa-Prado *et al.*, 2019). Une étude menée par le laboratoire montre un pic de SUMO1-ylation lors du 12^{ème} jour embryonnaire et une diminution lente jusqu'à la naissance chez le rat ainsi qu'une augmentation des protéines modifiées par SUMO2/3 après la naissance (Fig. 13). De manière intéressante, le niveau global des protéines SUMOylées par SUMO1 et/ou SUMO2/3 diminuent progressivement jusqu'à l'âge adulte dans le cerveau alors qu'il y a progressivement plus de substrats SUMOylés dans le compartiment synaptique après la naissance (Loriol *et al.*, 2012 ; Fig. 13). L'enzyme de conjugaison Ubc9 existe sous deux formes : Une forme libre et une forme conjuguée à SUMO. Le pic d'expression de la forme libre d'Ubc9 est observée avant la naissance alors que sa forme conjuguée à SUMO augmente à partir du 3^{ème} jour après la naissance (P3 ; Fig. 13). Au niveau du compartiment synaptique, Ubc9 est retrouvé majoritairement sous forme conjuguée à SUMO durant le développement cérébral et à l'âge adulte. Les désSUMOylases SENP1 et SENP6 sont inversement distribuées dans les neurones matures suggérant une distribution des enzymes modulée par l'activité neuronale (Loriol *et*

al., 2012). Ces données ont été confirmées par une autre étude montrant une modulation de la machinerie de SUMOylation ainsi que des niveaux de protéines SUMO1 et SUMO2/3-ylées avec l'âge dans le télencéphale et le cervelet de rat (Josa-Prado *et al.*, 2019).

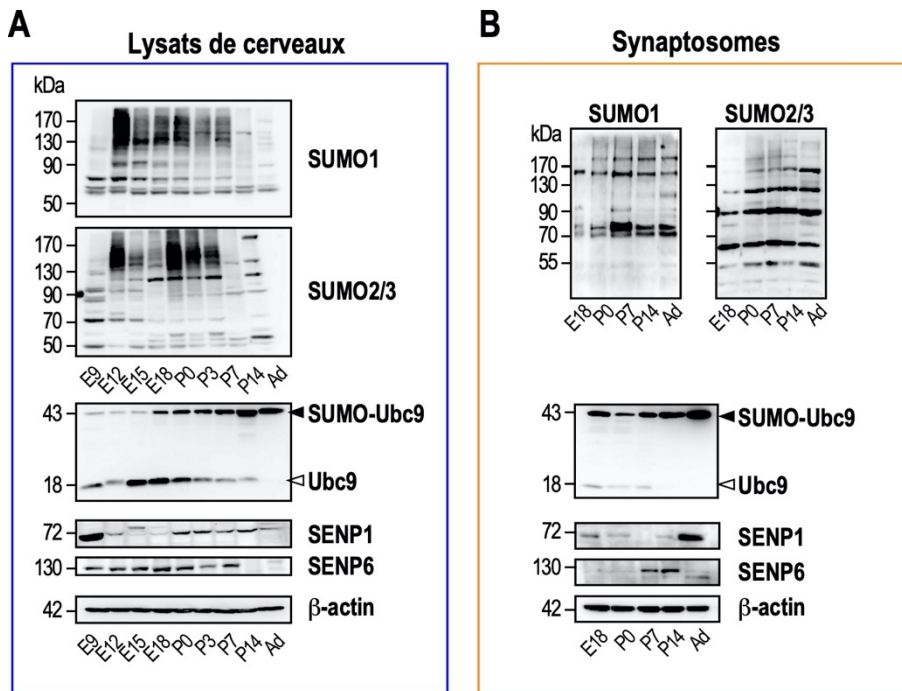


Figure 13. Régulation neurodéveloppementale de la machinerie de SUMOylation.

A Immunoblots de lysats de cerveau de rat à différents âges, du 9ème jour embryonnaire (E9) à l'âge adulte (Ad).

B Immunoblots de la fraction synaptique obtenue à partir de cerveau de rat à différents âges, du 18ème jour embryonnaire (E18) à l'âge adulte (Ad). D'après Loriol *et al.*, 2012.

Toutes ces observations suggèrent que la régulation spatiotemporelle des niveaux d'expression de la machinerie de SUMOylation semble importante pour les processus de neurogenèse et de synaptogenèse, qui sont tous les deux essentiels au développement cérébral.

2.1.3 Régulation de la machinerie de SUMOylation par l'activité neuronale

Les travaux du laboratoire ont montré que l'activité neuronale régule la distribution et la relocalisation de la machinerie de SUMOylation au niveau des terminaisons pré- et postsynaptiques (Loriol *et al.*, 2013). En effet, la dépolarisation par l'utilisation de KCl de neurones hippocampiques de rat en culture primaire entraîne une augmentation des niveaux de substrats SUMO1-ylés au niveau présynaptique associée à une diminution transitoire des substrats SUMOylés par SUMO2/3 au niveau postsynaptique. L'activité neuronale entraîne une redistribution et une relocalisation synaptique des enzymes de SUMOylation (Aos1 et Ubc9) et de désSUMOylation (SENP1 et SENP6 ; Loriol *et al.*, 2013). La répartition de ces enzymes de SUMOylation est différente entre les terminaisons pré- et postsynaptiques indiquant une régulation spécifique de la machinerie enzymatique dans chaque compartiment, probablement en raison de la différence de substrats à SUMOyler ou de désSUMOyler ou à la signalisation spécifique de ces compartiments subcellulaires.

Les travaux du laboratoire ont mis en évidence pour la première fois un mécanisme de régulation de la diffusion de l'enzyme de conjugaison Ubc9 par l'activité synaptique (Loriol *et al.*, 2014). L'activation des récepteurs mGlu5 entraîne une augmentation du temps de résidence d'Ubc9 dans les épines dendritiques. Une activation brève des mGlu5R déclenche la voie de signalisation en aval de ces récepteurs. La PKC activée va alors phosphoryler de nombreuses protéines synaptiques, qui vont en retour se comporter comme des scotchs moléculaires permettant ainsi à l'enzyme de conjugaison Ubc9, de prolonger son temps de résidence dans les épines dendritiques et par conséquent d'augmenter le niveau global de la SUMOylation synaptique. Cette régulation de la diffusion d'Ubc9 permet de moduler l'excitabilité neuronale (Loriol *et al.*, 2014). Plus récemment, nous avons montré que l'accumulation de l'enzyme de désSUMOylation SENP1 à la postsynapse requiert une activation soutenue de ces mêmes récepteurs mGlu5 (Annexe 2 ; Schorova *et al.*, 2019). Cette accumulation synaptique de la désSUMOylase SENP1 est dépendante de l'activité neuronale et résulte d'une diminution de la dynamique de sortie de SENP1 des épines dendritiques. Cet enrichissement postsynaptique en SENP1 a pour conséquence de diminuer les niveaux synaptiques de SUMOylation à l'état basal (Annexe 2 ; Schorova *et al.*, 2019). Ces résultats montrent que la SUMOylation et la désSUMOylation sont toutes deux régulées par l'activation des mGlu5R. Cependant, ces deux processus se produisent séquentiellement afin de permettre au système de répondre de manière coordonnée à l'activation des neurones.

2.2 Rôles de la SUMOylation dans les fonctions neuronales

La capacité du SNC des mammifères à stocker et traiter les informations nerveuses repose sur la formation et la plasticité de synapses fonctionnelles. Un grand nombre de protéines neuronales, nucléaires ou extranucléaires, a été identifié comme étant SUMOylées. Des anomalies de la SUMOylation entraînent des défauts dans la réponse neuronale au stress, de l'excitabilité neuronale et de la transmission et plasticité synaptique (Guo and Henley, 2014; Schorova and Martin, 2016; Henley *et al.*, 2018). La SUMOylation joue un rôle crucial dans la maturation neuronale, la formation et l'activité des synapses et pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique pour de nombreux désordres cérébraux.

2.2.1 SUMOylation, développement embryonnaire et formation des synapses.

Développement embryonnaire

La SUMOylation est un processus essentiel pour les fonctions cellulaires chez tous les eucaryotes. Pour évaluer l'importance et les rôles physiologiques de la SUMOylation des protéines lors du développement embryonnaire, plusieurs modèles d'animaux, dont les différents acteurs de la machinerie de SUMOylation sont invalidés génétiquement, ont été générés. L'invalidation génétique des différents éléments de la machinerie de SUMOylation induit des défauts de la SUMOylation et entraînent mort cellulaire, malformation et létalité

embryonnaire. L'inactivation génétique d'Ubc9, la seule enzyme de conjugaison de la SUMOylation, provoque des défauts nucléaires au stade des blastocytes. Ces anomalies sont notamment dues à une mauvaise localisation de RanGAP1 et Ran, des protéines impliquées dans les échanges nucléoplasmiques et la ségrégation des chromosomes. Les embryons des souris *Ubc9*^{-/-} meurent au début du stade post-implantatoire (Nacerddine *et al.*, 2005). Pour pallier les effets délétères de la suppression d'Ubc9 et étudier l'impact développemental d'Ubc9, le laboratoire du Dr Dejean a généré une souris où l'inactivation d'Ubc9 est inducible (Demarque *et al.*, 2011). La perte d'expression d'Ubc9 chez la souris adulte provoque une défaillance intestinale rapide et la mort subite empêchant l'étude des défauts dans d'autres tissus ou organes. Il est à noter que la perte d'Ubc9 n'a pas été induite dans le cerveau. Une alternative pour étudier le rôle d'Ubc9 sur le développement du cerveau et l'activité neuronale a été la génération d'une souris transgénique où l'expression d'Ubc9 est sous le contrôle du promoteur de la β -actine de poulet permettant à Ubc9 d'être fortement synthétisée dans tous les tissus. Cette stratégie a permis de montrer que l'augmentation de l'expression d'Ubc9 provoque une augmentation accrue de SUMOylation cérébrale globale et une protection contre les dommages liés à l'induction d'une ischémie cérébrale locale, suggérant un rôle neuroprotecteur de la SUMOylation (Lee *et al.*, 2011).

L'absence d'expression des enzymes SENP1 et SENP2 entraîne une augmentation de la SUMOylation et des anomalies du développement conduisant à la mort des animaux au stade embryonnaire ou juste après la naissance selon la stratégie d'inactivation et/ou le fond génétique utilisé. Cette létalité précoce est associée à des défauts placentaires et/ou cardiaques (Yamaguchi *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2013). Ces données démontrent qu'un équilibre entre l'état SUMOylé et désSUMOylé des protéines régit étroitement la fonction des protéines et qu'une dérégulation de cette balance conduit à des pathologies et/ou à la létalité. Cependant, ces dernières études ne précisent pas si le développement du cerveau est affecté chez les souris déficientes pour SENP1 ou SENP2. La forme mutée de SENP2 déficiente pour son activité protéase (SENP2 Δ SUMO) dans les cellules progénitrices neurales provoque la mort de ces souris à l'âge de trois semaines (Fu *et al.*, 2014). Bien que les embryons de ces souris SENP2 Δ SUMO se soient développés normalement, les animaux présentent une neurodégénération importante après la naissance, entraînant par la suite une paralysie qui les empêche d'aller se nourrir (Fu *et al.*, 2014).

L'absence de l'expression du gène SUMO1 chez la souris s'avère létale suggérant l'importance de la protéine SUMO lors du développement embryonnaire (Wang *et al.*, 2011). Cependant, deux autres études rapportent que l'absence d'expression de la protéine SUMO1 n'est pas létale puisque les paralogues SUMO2 et 3 sont capables de compenser cette absence durant le développement embryonnaire chez la souris (Evdokimov *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Des anomalies de poids, d'adipogenèse, de fonctions cardiaques et de réponses inflammatoires ont par ailleurs été identifiées chez ces souris SUMO1 KO révélant une compensation partielle

des fonctions de SUMO1 par SUMO2/3 et laissent penser que ces 2 paralogues exercent des fonctions cellulaires différentes. Enfin, le rôle de SUMO2/3 dans l'embryogenèse a été étudié grâce à la génération de souris SUMO2 KO et SUMO3 KO. Les souris SUMO3 KO sont viables contrairement aux embryons SUMO2 KO qui montrent de sévères retards de croissance et dont le développement s'arrête à 10,5 jours embryonnaires. Ces défauts développementaux sont en partie dus à une réduction de la prolifération cellulaire et à une augmentation de la mort cellulaire chez les embryons SUMO2 KO (Wang *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces résultats montre que l'homéostasie de la SUMOylation est essentielle durant l'embryogénèse et le développement cérébral.

Formation des synapses

L'activité neuronale participe à la formation et au remodelage des synapses formées lors du développement cérébral. Ces étapes sont cruciales pour la formation et l'établissement des circuits neuronaux et implique une régulation fine qui fait intervenir des modifications post-traductionnelles, et notamment la SUMOylation.

CASK et MEF2A

L'établissement d'un circuit neuronal fonctionnel repose sur la formation et l'élimination des synapses. La formation des synapses requiert une activation coordonnée de différents facteurs de transcription dont certains sont régulés par SUMO (Hannoun *et al.*, 2010). La SUMO1-ylation de deux protéines, CASK et MEF2A joue un rôle clé dans la synaptogenèse. La protéine CASK (Ca²⁺/Calmodulin-dependent serine protein kinase) est une protéine de la famille des membrane-associated guanylate kinase (MAGUK). CASK interagit avec de nombreuses protéines d'adhésion telle que SynCAM, qui est notamment impliquée dans la formation des synapses et la plasticité (Hsueh, 2006). CASK joue un rôle important dans la formation des épines dendritiques grâce à son interaction avec le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de la protéine 4.1 (Biederer and Sudhof, 2001). L'invalidation de CASK dans les neurones hippocampiques entraîne une diminution de la taille et du nombre d'épines dendritiques. L'expression d'une forme mutée de CASK empêchant son interaction avec la protéine 4.1 ne restaure pas le phénotype des épines dendritiques. De manière intéressante, la SUMOylation de CASK réduit fortement son interaction avec la protéine 4.1, ce qui en retour, modifie la localisation et/ou la fonction de protéines membranaires postsynaptiques telles que SynCAM. La surexpression d'une forme mimant la SUMOylation de CASK entraîne une diminution de la densité des épines dendritiques ainsi qu'une réduction de leur volume (Chao *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent un équilibre entre SUMOylation et désSUMOylation de CASK pour réguler ses interactions avec les molécules d'adhésion et la modulation du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques ce qui est nécessaire pour le processus de synaptogenèse.

Durant le développement du cervelet, les neurones postsynaptiques développent des protrusions dendritiques sur lesquelles les axones des fibres moussues vont former des terminaisons présynaptiques. Ce processus est régulé par la SUMO1-ylation du facteur de transcription MEF2A sur son résidu K403 (Shalizi *et al.*, 2006). MEF2A régule l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la répression de la différenciation postsynaptique telles que Arc et SynGAP, ou des protéines impliquées dans la redistribution des vésicules et la libération des neurotransmetteurs dans la terminaison présynaptique (Yamada *et al.*, 2013). La SUMOylation inhibe l'activité de MEF2A pour promouvoir la différenciation des protrusions dendritiques alors que l'augmentation de l'activité synaptique entraîne la désSUMOylation et l'acétylation du résidu K403 inhibant ainsi la formation des synapses (Shalizi *et al.*, 2006).

De manière intéressante, la SUMO1-ylation de ces deux substrats a des effets opposés sur la synaptogenèse. La SUMOylation de CASK inhibe alors que la SUMOylation de MEF2A promeut la formation des synapses. Ces rôles contrastés de la modification des protéines par SUMO aboutissent à des effets biologiques et physiologiques difficiles à définir, suggérant que les conséquences fonctionnelles de la SUMOylation sont spécifiques du substrat plutôt que généralisées à des voies, des cellules ou des tissus.

FMRP (Fragile X- Mental Retardation Protein)

La formation, la maturation et l'élimination des synapses ou encore la plasticité synaptique nécessitent une synthèse locale de protéines. Cette synthèse protéique locale requiert le transport d'ARNm le long des dendrites ou de l'axone jusqu'aux synapses. Des protéines spécifiques appelées RBP (mRNA Binding Protein) assurent le transport de ces ARNm. C'est notamment le cas de FMRP, qui transporte les ARNm dans des granules de transport et dont la traduction est réprimée jusqu'aux terminaisons synaptiques (Dictenberg *et al.*, 2008). L'activité synaptique dépendante des mGlu5R déclenche la dissociation des ARNm des granules contenant FMRP permettant leur traduction locale (Khayachi *et al.*, 2018). La perte d'expression ou de fonction de FMRP conduit à la plus courante des causes monogéniques connues d'autisme et de déficience intellectuelle, le syndrome du X fragile (SXF ; (Maurin *et al.*, 2014). Au niveau neuronal, l'absence de FMRP conduit à une hyperabondance pathologique d'épines immatures chez les souris *Fmr1^{-/-}* (Mientjes *et al.*, 2006). Ces défauts de structure synaptique se traduisent par des altérations au niveau de la transmission et de la plasticité synaptique ainsi que des anomalies de comportements sociaux et cognitifs. Plus récemment, nous avons montré au laboratoire que FMRP est un substrat de la SUMOylation *in vivo* chez le rat et la souris (Khayachi *et al.*, 2018). La SUMOylation de FMRP peut se faire sur 3 lysines (K88 ; K130 ; K614). En particulier, nous avons montré que l'activation de mGlu5R (< 5 min) déclenche la dissociation de FMRP de transport des granules d'ARNm, ce qui entraîne la libération et la traduction locale des ARNm cibles permettant l'élimination et la maturation des épines dendritiques (Fig. 13). De plus, l'expression de la forme non-SUMOylable de FMRP

(FMRP K88,130R) entrave la dissociation des granules suite à l'activation des mGlu5R et ne permet pas l'élimination et la maturation des épines dendritiques (Annexe 1 ; Fig. 13 ; (Khayachi *et al.*, 2018). Récemment, des approches de protéomique spatiotemporelle ont permis d'identifier la composition et l'organisation des granules de stress ainsi que les mécanismes régulant la dissociation des granules. En particulier, ces travaux confirment qu'une altération de la SUMOylation de FMRP (K88 et K130) entrave la dissociation des granules (Marmor-Kollet *et al.*, 2020). En conséquence, l'expression de cette forme non SUMOylable FMRP K88,130R dans les neurones de souris a un effet dominant négatif et induit un phénotype similaire à celui rapporté pour les patients SXF, caractérisés par une augmentation de la densité synaptique ainsi qu'une immaturité des épines dendritique (Fig. 13 ; Khayachi *et al.*, 2018).

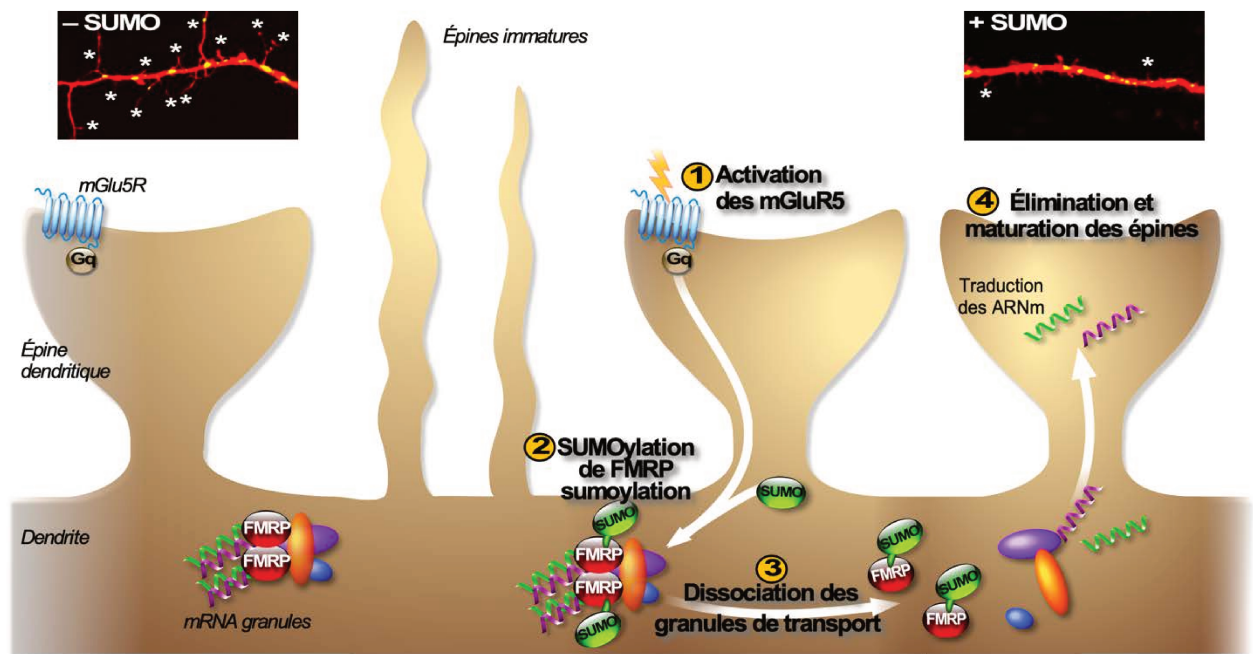


Figure 14. Rôles de la SUMOylation de FMRP dans la fonction neuronale.

La SUMOylation de FMRP après activation des mGlu5R favorise la dissociation des granules de transport des ARNm. Ceci entraîne la libération et la traduction local des ARNm et régule l'élimination et la maturation des épines dendritiques. L'expression d'une forme non SUMOylable de FMRP dans les neurones Fmr1-KO conduit à une taille anormale des granules de transport due à des anomalies de dissociation des granules. On remarque une densité et une morphologie des épines dendritiques anormales. Adapté de Khayachi *et al.*, 2018.

Des mutations dites « faux-sens » ont également été identifiées chez des patients atteints du syndrome de l'X Fragile y compris une mutation près du site de SUMOylation identifié K130. Pour étudier les mécanismes sous-jacents au syndrome de l'X-Fragile chez ces patients, le laboratoire a généré un modèle de souris Knock-In (KI) exprimant la protéine FMRP-R138Q (Prieto *et al.*, 2021). L'hippocampe des souris KI présente une densité synaptique accrue associée à des défauts ultrastructuraux de la synapse et une augmentation de l'expression de rAMPA à la surface synaptique. De plus, les souris KI présentent une diminution de la LTP dans l'hippocampe et des déficits socio-cognitifs. Cependant, le lien entre une dérégulation de la SUMOylation due à la mutation et les anomalies observées chez les souris FMRP-R138Q est toujours à l'étude au laboratoire pour mieux

comprendre les mécanismes qui sous-tendent le Syndrome de l'X-Fragile chez les patients porteurs de cette mutation (**Annexe 3** ; Prieto *et al.*, 2021).

2.2.2 SUMOylation et excitabilité neuronale

Les propriétés synaptiques et le réseau neuronal sont profondément influencés par des modulations de l'excitabilité neuronale. L'activité de nombreuses protéines membranaires comme des récepteurs inhibiteurs ou excitateurs et des canaux ioniques dépendant du voltage va permettre le maintien du potentiel de membrane et la régulation de l'excitabilité neuronale. Étant donné le nombre et la diversité de canaux ioniques modifiés par SUMO, il semble que la SUMOylation, par un changement de conformation du canal, par le blocage du pore ou en favorisant/inhibant ses interactions protéiques, représente un mécanisme fondamental de régulation de la fonction des canaux ioniques (Schorova and Martin, 2016; Benson *et al.*, 2017). Un exemple récent de SUMOylation dépendante de l'activité dans lequel elle peut rapidement ajuster la densité de courant ionique pour contrôler l'équilibre de l'excitabilité neuronale en modifiant l'expression de surface et les propriétés biophysiques des canaux Kv4 (Parker *et al.*, 2019). Ceci confirme le rôle de la SUMOylation comme un modérateur important de l'excitabilité neuronale.

Parmi ces canaux, on retrouve K2P1, un canal de la famille des canaux potassiques, premier canal identifié comme étant SUMOylé (Rajan *et al.*, 2005) et dont la SUMOylation a été controversée (Felicangeli *et al.*, 2007), de nombreux canaux potassiques et sodiques dépendants du voltage ainsi que des canaux cationiques non sélectifs tels que TRPM4 et TRPV1 (Wang *et al.*, 2018).

2.2.3 SUMOylation et transmission synaptique

L'activité neuronale régule la quantité de neurotransmetteurs libérée dans la fente synaptique. Cette libération implique une régulation spatiotemporelle des interactions protéine-protéine à la pré-synapse notamment lors de la fusion des vésicules avec la membrane plasmique.

La première démonstration d'un rôle de la SUMOylation au niveau de la synapse a été apportée par immunodétection de plusieurs substrats et de l'enzyme de conjugaison Ubc9 dans la fraction synaptique de neurones hippocampiques de rat (Martin *et al.*, 2007a). Ce travail a identifié et caractérisé pour la première fois un substrat synaptique SUMOylé, la sous-unité GluK2 des rKA, ouvrant ainsi de nouvelles pistes pour l'étude du processus de SUMOylation à la synapse. La sous-unité GluK2 interagit directement avec l'enzyme de conjugaison Ubc9 et est SUMOylée sur la lysine C-terminale K886 (Martin *et al.*, 2007a). La stimulation des GluK2 induit leur modification par SUMO1 à la surface des neurones et entraîne rapidement leur internalisation. Ceci a pour effet de moduler la transmission synaptique en diminuant le nombre de rKA à la surface des neurones de l'hippocampe (Martin *et al.*, 2007a). De manière intéressante, il existe un crosstalk

entre phosphorylation et SUMOylation pour l'internalisation de GluK2. En effet, la phosphorylation de GluK2 par la PKC suite à l'activation des rKA est un prérequis pour sa SUMOylation et par conséquent pour son endocytose (Chamberlain *et al.*, 2012).

Au cours des 15 dernières années, l'identification et la caractérisation fonctionnelle du rôle de la SUMOylation de plusieurs protéines pré- et postsynaptiques ont été rapportées (Tableau 3).

Il a également été montré que la SUMOylation peut réguler la libération des neurotransmetteurs (Feligioni *et al.*, 2009), le transport d'ARNm et de protéines axonales ainsi que les fonctions postsynaptiques (Schorova and Martin, 2016; Henley *et al.*, 2021) (Tableau 3). Il est donc d'intérêt d'identifier les substrats SUMOylés de la synapse afin de comprendre le rôle de la SUMOylation dans la régulation des fonctions synaptiques et de fait, dans la physiologie neuronale.

Au niveau de la pré-synapse, la SUMOylation apparaît essentielle pour la formation, le maintien et le cycle endocytose/exocytose des vésicules de neurotransmetteurs. Parmi les cibles présynaptiques de la SUMOylation, on retrouve notamment la Synapsine1a qui est essentielle pour le maintien du pool de réserve vésiculaire où encore, la Syntaxine 1a, RIM1 α et la Synaptotagmine 1 qui ont un rôle prépondérant dans le cycle exocytose/endocytose des vésicules synaptiques (Fig. 4). Plus récemment, une étude a mis en évidence la modification des transporteurs de la dopamine (DAT) par SUMO1 (Cartier *et al.*, 2019). DAT permet la recapture de la dopamine libérée au niveau de la pré-synapse pour mettre fin à la neurotransmission dopaminergique. Son expression à la surface est critique pour sa fonction qui est, elle, influencée par la cocaïne, l'amphétamine. Le dysfonctionnement de cette régulation est impliqué dans différents désordres neurologiques tels que les troubles du spectre autistique, le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité (TDHA) et la maladie de Parkinson. La modification de DAT par SUMO1 augmente les niveaux de DAT à la membrane plasmique (Cartier *et al.*, 2019). La surexpression de SUMO1 ou Ubc9 augmente l'expression de surface de DAT ainsi que sa stabilité en réduisant son ubiquitination. Plusieurs lysines sont prédites comme sites potentiels de SUMOylation, cependant le site précis de cette SUMOylation ainsi que la conjugaison ou la liaison non covalente de SUMO1 à DAT *in vivo* restent encore à démontrer.

Substrats	Isoforme SUMO	Site SUMOylation	Enzyme de désSUMOylation impliquée	Rôle de la SUMOylation	Références
<i>Présynaptique</i>					
Synapsin 1A	SUMO1	K687	SENP1 ?	Favorise l'ancrage des vésicules synaptiques aux éléments présynaptiques ; Requis pour le maintien d'un pool de vésicules présynaptiques et leur exocytose	(Tang <i>et al.</i> , 2015)
Syntaxin1A	SUMO1	K252, K253, K256	SENP1	Régule l'endocytose des vésicules présynaptiques ; SUMOylation favorise l'endocytose des vésicules	(Craig <i>et al.</i> , 2015)
RIMa	SUMO	K502	Inconnu	Requis pour l'exocytose présynaptique ; Facilite le regroupement des canaux calciques Cav2.1	(Girach <i>et al.</i> , 2013)
Synaptotagmin-1	SUMO1	Inconnu	Inconnu	Inconnu	(Matsuzaki <i>et al.</i> , 2015)
mGluR7	SUMO1/3	K889	SENP1	Augmente la stabilité du récepteur à la surface	(Wilkinson <i>et al.</i> , 2008; Wilkinson and Henley, 2011; Choi <i>et al.</i> , 2016)
mGluR8b	SUMO1	K882	Inconnu	Inconnu	(Tang <i>et al.</i> , 2005; Dutting <i>et al.</i> , 2011)
DAT	SUMO1	Inconnu	Inconnu	Favorise la stabilité et l'expression à surface de DAT	(Cartier <i>et al.</i> , 2019)
CRMP2	SUMO1-3	K374	Inconnu	Régule l'expression membranaire de NaV1.7	(Dustrude <i>et al.</i> , 2013; Ju <i>et al.</i> , 2013)
<i>Postsynaptique</i>					
M1 mAChR	SUMO1	K327	Inconnu	Favorise l'affinité de liaison aux ligands et la transduction du signal	(Xu <i>et al.</i> , 2019)
GLUK2	SUMO1	K886	SENP1 ?	Permet l'internalisation des KAR induit par la liaison de l'agoniste	(Martin <i>et al.</i> , 2007a)
Arc	SUMO1-3	K110, K268	SENP1 ?	Requit pour la plasticité homéostatique ; Favorise l'interaction avec la Drebrin A lors de la LTP	(Craig and Henley, 2012; Nair <i>et al.</i> , 2017)

Géphyrine	SUMO1-2	K148, k724	Inconnu	Antagonise la formation de clusters de GABAA à la postsynapse	(Ghosh <i>et al.</i> , 2016)
NOS	SUMO1	K725, K739	Inconnu	Requit pour l'induction de la LTP et l'expression de ARC et du BDNF	(Du <i>et al.</i> , 2020)
PKC			Inconnu	Sa SUMOylation réduit la phosphorylation de GluK2 et ses interactions protéiques ; DésSUMOylation de PKC et régulation l'endocytose des rKA	(Sun <i>et al.</i> , 2014) (Li <i>et al.</i> , 2017)

Traduction locale

CPEB3	SUMO2/3	Inconnu	Inconnu	Fusion SUMO2-CPEB3 prévient l'agrégation de CPEB3 et réprime la traduction locale	(Drisaldi <i>et al.</i> , 2015)
-------	---------	---------	---------	---	---------------------------------

Petites GTPases

Rac1	SUMO1	K183, K184, K186, K188	SENP1 et 3 proposés	Favorise l'activité de Rac1 et sa signalisation	(Castillo-Lluya <i>et al.</i> , 2010; Yang <i>et al.</i> , 2019)
Ras	SUMO3	K42	SENP1, SENP2	Requit pour l'activation complète de la voie de signalisation	(Choi <i>et al.</i> , 2018)
Rab17	SUMO1-3	K68	SENP1 ?	Favorise l'interaction avec Syntaxin-2 et réduit l'amarrage des vésicules apicales	(Striz <i>et al.</i> , 2018)

Mitochondrie

Drp1	SUMO1, SUMO2			Contrôle la fusion/fission des mitochondries. SUMO1-ylation favorise le recrutement des mitochondries ; SUMO2-ylation favorise sa localisation cytosolique	(Harder <i>et al.</i> , 2004; Guo <i>et al.</i> , 2013; Prudent <i>et al.</i> , 2015)
FADD				Facilite la liaison à Drp1. Permet le recrutement de Drp1 à la mitochondrie pendant le stress cellulaire	(Choi <i>et al.</i> , 2017)

Tableau 3. Substrats SUMOylés synaptiques ou associés à la synapse.

Les sites de modification et les isoformes SUMO sont listés. Les enzymes de SUMOylation et désSUMOylation qui ont une activité sur les protéines cibles sont indiquées lorsqu'elles sont connues. Le point d'interrogation (?) indique qu'une forme tronquée ou le domaine catalytique des SENPs a été utilisé pour désSUMOyler les protéines mais ne reflète pas forcément la spécificité des SENP *in vivo*.

2.2.4 SUMOylation, plasticité synaptique, apprentissage et mémorisation

La plasticité synaptique est caractérisée par la capacité des neurones à induire des modifications morphologiques et fonctionnelles sur une longue période de temps et ce processus constitue le modèle cellulaire de l'apprentissage et de la mémorisation. Les rAMPAs sont à l'origine de la transmission excitatrice rapide dans le SNC et leur trafic est à la base des modifications d'efficacité synaptique observées lors de la LTP, la LTD et la plasticité homéostatique. Bien qu'il n'y ait pas de données montrant que les rAMPAs soient eux-mêmes SUMOylés, la SUMOylation apparaît impliquée dans les événements de plasticité synaptique via la régulation de l'expression et/ou du trafic des rAMPAs.

Plasticité homéostatique

La SUMOylation est impliquée dans l'ajustement synaptique ou « scaling » résultant en une augmentation de l'expression des rAMPAs à la surface après une suppression prolongée de l'activité neuronale qui caractérise la plasticité homéostatique. Un traitement de 24h à la TTX entraîne une augmentation de l'expression des sous-unités GluA1 et GluA2 à la surface corrélée à une diminution de l'expression de SENP1 et une augmentation concomitante de la SUMO1-ylation. La surexpression du domaine catalytique de SENP1 dans des cultures primaires de neurones bloque l'augmentation de GluA1 à la surface après un traitement prolongé à la TTX (Craig *et al.*, 2012). Pour définir les substrats SUMOylés responsables de ces ajustements synaptiques, les auteurs ont examiné l'expression du produit du gène précoce immédiat associés au cytosquelette *Arc* qui est rapidement activée par l'activité neuronale (Carmichael and Henley, 2018). Grâce à son rôle pivot dans la régulation du trafic des récepteurs AMPA (Shepherd and Huganir, 2007) ainsi que dans la formation de la mémoire (Zhang *et al.*, 2019b), la protéine ARC est largement considérée comme un marqueur central des changements plastiques du cerveau. De plus, ARC est assujéti à de nombreuses modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'ubiquitination et la SUMOylation (Carmichael and Henley, 2018). La surexpression de ARC conduit à une diminution de l'expression de GluA1 à la surface après induction de la plasticité homéostatique, cependant la surexpression d'une forme non-SUMOylable de ARC n'entraîne pas de changement d'expression de GluA1 à la surface, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle la SUMOylation de ARC joue un rôle dans la régulation des rAMPAs lors de la plasticité homéostatique (Craig and Henley, 2012).

LTP et LTD

La SUMOylation est impliquée dans le trafic des rAMPAs contenant la sous-unité GluA1 lors de la LTP. Jaafari et ses collègues ont induit de façon chimique la LTP (Chem-LTP) dans des cultures neuronales d'hippocampe de rat pour étudier le rôle de la SUMOylation sur l'expression des rAMPAs à la surface. La LTP est caractérisée par une augmentation des rAMPAs à la surface. Par ailleurs, la Chem-LTP entraîne une augmentation des ARNm de Ubc9

et SUMO1 au niveau du soma et des dendrites (Jaafari *et al.*, 2013). La surexpression du domaine catalytique de SENP1 prévient à la fois l'augmentation des mRNAs de SUMO1 et l'expression de surface des rAMPAs après induction de la LTP (Jaafari *et al.*, 2013). Ces résultats sont en faveur d'un rôle actif de la SUMOylation dans le contrôle de l'expression de surface des rAMPAs pendant la LTP. Le mécanisme précis mis en œuvre n'est cependant toujours pas élucidé à ce jour. Une autre étude montre, qu'en combinant l'utilisation d'une forme perméable TAT-Ubc9 et d'un protocole d'induction de la LTP sur des tranches d'hippocampe du CA1, la LTP est significativement réduite (Lee *et al.*, 2014). Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation du domaine catalytique de SENP1 et montrent que l'inclusion de la forme active de SENP1, mais pas son mutant du domaine catalytique, bloque l'induction de la LTP dans les neurones pyramidaux du CA1. Les auteurs ont aussi montré que l'infusion de la forme dominante négative de TAT-Ubc9 *in vivo* dans l'hippocampe dorsal altère les processus d'apprentissage et de mémorisation (Lee *et al.*, 2014).

En plus de son rôle dans la plasticité homéostatique, la SUMOylation de ARC a été proposée comme un modulateur important des interactions protéiques et de l'induction et du maintien de la LTP *in vivo*. L'augmentation de la SUMOylation de ARC n'a pas lieu si la LTP n'est pas maintenue (Nair *et al.*, 2017). La forme SUMOylée de ARC interagit avec la Drebrin A, une protéine liée à l'actine filamenteuse F, qui intervient dans la régulation de la dynamique du cytosquelette dans l'épine dendritique. Nair et ses collègues évoquent donc la possibilité que les protéines ARC nouvellement synthétisées sont SUMOylées pour réguler le cytosquelette d'actine lors de la LTP. En dépit des évidences montrant le rôle de la SUMOylation dans le trafic des rAMPAs et dans la plasticité synaptique, la liste de protéines modifiées par SUMO contrôlant le trafic et/ou l'expression des rAMPAs à la surface reste évasive.

Apprentissage et mémorisation

De nombreuses mutations du gène codant pour la protéine MECP2 ont été identifiées chez des patientes atteintes du syndrome de Rett. Cette maladie génétique ne touche que les femmes et est caractérisée par une déficience intellectuelle sévère. MECP2 est une protéine ubiquitaire qui se lie à l'ADN et agit comme un répresseur transcriptionnel. MECP2 joue un rôle clé lors du développement cérébral (Guerrini and Parrini, 2012). La SUMOylation de MECP2 sur la lysine K223 régule son interaction avec les histones désacétylases (HDACs). De manière intéressante, la forme non SUMOylable de MECP2 est incapable d'interagir avec les HDACs entraînant une expression génique anormale et une densité synaptique altérée (Cheng *et al.*, 2014). D'autres résidus lysine (K353 et K412) ont été montrés comme site de SUMOylation de MECP2 (Tai *et al.*, 2016). La forme non SUMOylable K412R de MECP2 a une capacité de liaison à l'ADN réduite alors que la forme MECP2 fusionnée à SUMO1 augmente significativement sa capacité de liaison à l'ADN (Tai *et al.*, 2016). Les auteurs montrent que l'expression de la forme sauvage de MECP2 dans les neurones hippocampiques du CA1 restaurent à la fois les

déficits de l'interaction sociale et les altérations de la LTP observés chez les souris conditionnellement invalidées pour MECP2. De manière intéressante, l'expression de la forme non-SUMOylable de MECP2 dans ces animaux ne permet pas la restauration du phénotype sauvage (Tai *et al.*, 2016). De plus, des mutations associées au syndrome de Rett (R106W, R133C, P152A, T158M, R306C, P37R) diminuent la SUMOylation de MECP2 in vitro (Tai *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent un rôle crucial de la SUMOylation de MECP2 dans les interactions sociales ainsi que la plasticité synaptique et suggère que la SUMOylation anarchique de MECP2 participe directement à l'étiologie de la maladie.

La génération de souris transgéniques invalidant ou surexprimant SUMO1 uniquement dans les neurones ou dans des régions spécifiques du cerveau tel que le cerveau antérieur regroupant notamment le cortex et l'hippocampe, a permis d'identifier le rôle global de la SUMOylation sur les fonctions cérébrales. Matsuzaki et ses collègues ont observé une SUMOylation augmentée de la synaptotagmine-1 dans ces souris, associée à une réduction de la transmission synaptique basale dépendant de l'âge. Ils ont également mis en évidence des altérations au niveau des fonctions présynaptiques associées à une diminution de la densité synaptique dans les neurones SUMO1^{tg+} (Matsuzaki *et al.*, 2015). Ces changements morphofonctionnels observés dans les cerveaux des souris SUMO1^{tg+} sont associées à des anomalies de l'apprentissage et de la mémorisation alors que les autres comportements restent intacts. Récemment, la génération d'un modèle conditionnel SUMO2-cKO a permis de mettre en évidence le rôle clé de SUMO2 dans les processus cognitifs (Yu *et al.*, 2020). Bien qu'aucune différence morphologique n'ait été observée au niveau de l'hippocampe, il a été montré que les souris SUMO2-cKO présentent des défauts dans les processus de mémorisation dépendant de l'hippocampe tels que les mémoires spatiale, épisodique et contextuelle ainsi que la mémorisation liée à la peur. Ces résultats sont expliqués par la diminution de la transmission synaptique basale et la réduction de la LTP induite par haute fréquence chez les animaux SUMO2-cKO (Yu *et al.*, 2020).

La génération d'une souris invalidée pour SENP2 dans le cerveau antérieur (SENP2-cKO) a permis de démontrer que SENP2 joue un rôle important dans les fonctions cérébrales (Huang *et al.*, 2020). Les souris SENP2-cKO montrent une hyperactivité et une diminution des comportements anxiogènes. Elles présentent aussi des altérations de mémorisation spatiale, d'apprentissage et de mémorisation associative ainsi que d'un comportement de nidation altéré ce qui est considéré comme un phénotype typique des maladies psychiatriques (Huang *et al.*, 2020). Ces résultats ainsi que d'autres études indiquent que la modification de protéines neuronales par SUMO contribue au bon fonctionnement physiologique du cerveau. Ceci de fait implique que, lorsque la balance SUMOylation/désSUMOylation est altérée, elle entraîne des défauts dans la SUMOylation des protéines cérébrales et en conséquences, des déficiences intellectuelles et/ou de la neurodégénérescence (Chen *et al.*, 2021).

2.3 SUMOylation et pathologies

2.3.1 Cancers

Parmi toutes les maladies associant la SUMOylation à ce jour, le cancer est celle qui a été la plus étudiée. Compte tenu du rôle de la SUMOylation dans le maintien de la fonction nucléaire, il n'est pas surprenant que des données substantielles révèlent une association étroite entre SUMOylation et prolifération des cellules cancéreuses, tumorigenèse et métastases (Eifler and Vertegaal, 2015). Par exemple, les niveaux d'Ubc9 ainsi que les niveaux globaux de SUMOylation sont considérablement augmentés dans les échantillons de tumeurs cérébrales humaines et dans les glioblastomes multiformes (GBM) qui représentent les tumeurs cérébrales primaires malignes les plus mortelles (Yang *et al.*, 2013). Comme les GBM sont connues pour leur résistance élevée aux radiothérapies et aux chimiothérapies classiques, l'hypothèse d'une l'inhibition globale de la SUMOylation cellulaire pourrait permettre d'augmenter la sensibilité des glioblastomes à la radiothérapie ou à la chimiothérapie (Boulanger *et al.*, 2019). Le Dr Bossis et ses collègues ont démontré que l'inhibition pharmacologique de la voie SUMO par l'acide anacardique permet de réduire la chimiorésistance dans certaines lignées humaines de leucémie (Bossis *et al.*, 2014). Plus récemment, leurs travaux ont permis l'identification de biomarqueurs de l'activité des enzymes de l'ubiquitination et de la SUMOylation pour prédire la réponse des leucémies myéloïdes aiguës à la chimiothérapie standard (Gatel *et al.*, 2020). De ce fait, cibler la SUMOylation avec des inhibiteurs pharmacologiques récemment découverts (pour revue Boulanger *et al.*, 2019), seuls ou en combinaison avec les thérapies actuelles, pourrait donc constituer une puissante stratégie d'avenir efficace pour bloquer la prolifération cellulaire et améliorer le traitement de certains cancers.

2.3.2 Ischémie cérébrale

Le laboratoire du Pr Paschen a établi les premières preuves d'un lien entre SUMOylation et ischémie cérébrale (Yang *et al.*, 2008b). Chez la souris et l'homme, l'ischémie cérébrale entraîne une augmentation significative des niveaux de protéines SUMOylées dans la zone entourant l'infarct cérébral (Yang *et al.*, 2008b; Yang *et al.*, 2008a; Bernstock *et al.*, 2017). Dans un modèle d'accident vasculaire cérébral ischémique par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO), l'activation de la conjugaison de SUMO2/3 est plus prononcée dans les neurones situés à la limite du tissu irrigué par l'artère cérébrale moyenne (MCA), caractérisée par la translocation des protéines SUMOylées vers le noyau. Étonnamment, même une courte période d'occlusion de la MCA, sans dommage, suffit à entraîner la SUMOylation massive des protéines neuronales. Ces données suggèrent que l'activation post-ischémique de la conjugaison de SUMO2/3 est une réponse protectrice au stress dans les neurones. Cette notion de protection est corroborée par d'autres études *in vitro* et *in vivo* (Loftus *et al.*, 2009; Datwyler *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Cimarosti *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019a). Dans des conditions normales, l'inhibition de la conjugaison de SUMO2/3 par l'expression de microARN SUMO2/3 dans des neurones corticaux

ne produit pas de dommages cellulaires. Cependant, après une privation en glucose et oxygène (OGD), la mort cellulaire est alors significativement augmentée (Datwyler *et al.*, 2011). Chez les souris transgéniques surexprimant Ubc9, qui présentent donc des niveaux plus élevés de protéines conjuguées SUMO1 et SUMO2/3, on observe une amélioration des fonctions cérébrales après un accident vasculaire cérébral (Lee *et al.*, 2011). A l'inverse, les souris SENP1 cKO, où les niveaux de protéines SUMOylées sont diminués, présentent une augmentation significative du volume de l'infarctus dans le cortex cérébral et les troubles moteurs associés sont plus importants que pour les souris contrôles sauvages (Zhang *et al.*, 2016). Enfin, les souris invalidées pour SUMO1-3 (SUMO-KD) spécifiquement dans les neurones, présentent des fonctions neurologiques post-ischémiques réduites (Zhang *et al.*, 2017). Ces données démontrent le rôle neuroprotecteur prépondérant de la SUMOylation après une ischémie cérébrale. La transplantation de cellules souches neurales (CSN) dans la partie lésée du cerveau ischémié a des effets bénéfiques sur les accidents vasculaires cérébraux à la fois par le remplacement structurel des cellules neurales endogènes, et par des effets immunomodulateurs et trophiques. Cependant les besoins métaboliques de cette greffe cellulaire ne sont que partiellement satisfaits en raison de la mauvaise perfusion du tissu cérébral post-ischémique. Des CSN de souris ont été utilisées pour explorer la possibilité d'un lien de cause à effet entre la SUMOylation et la résistance à l'ischémie (Bernstock *et al.*, 2019). Les CSN surexprimant Ubc9 montre une résistance à la privation/restauration en oxygène et glucose (OGD/ROG) ainsi qu'une différenciation neuronale accrue in vitro. Lorsque les CSN sont transplantées dans la partie lésée du cerveau des souris ayant subies une MCAO, une différenciation neuronale accrue et une meilleure survie ont été rapportées (Bernstock *et al.*, 2019). Ce travail a mis en évidence un rôle essentiel de la SUMOylation dans la biologie des CSN. Cibler la SUMOylation semble représenter une nouvelle approche intéressante pour accroître l'efficacité de la transplantation de cellules souches exogènes utilisée en neurologie régénérative.

2.3.3 Douleurs chroniques

La douleur chronique est définie par une douleur qui dure dans le temps ou se produit de manière récurrente pendant plus de 3 mois, affectant de manière significative la santé physique et psychologique du patient (Treede *et al.*, 2019). La douleur chronique peut résulter de nombreux syndromes douloureux. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent la douleur chronique sont complexes et encore mal compris. Malgré une importante recherche dans ce domaine, il n'existe pas de thérapies efficaces, sans effet secondaires, pour la plupart des douleurs chroniques. Très récemment, des anomalies du système de SUMOylation ont été associées à différents types de douleurs chroniques, incluant notamment les douleurs neuropathiques et les douleurs inflammatoires (Cheng *et al.*, 2021).

Dans les douleurs neuropathiques, une sensibilisation présynaptique se produit au niveau de la moelle épinière. On retrouve au niveau des terminaisons présynaptiques des neurones sensoriels des ganglions dorsaux (DRG) un

gain de fonction des canaux calciques et sodiques dépendants du voltage tels que le canal sodique Nav1.7. La localisation de ces canaux est régulée par les membres de la famille des protéines médiatrices de la réponse à la collapsine (CRMP). Dans les douleurs neuropathiques, la SUMOylation de CRMP2 est augmentée et apparaît comme un des principaux facteurs de médiation de la douleur chronique chez le rat (Moutal *et al.*, 2019). En effet, la SUMOylation de CRMP2 sur son résidu K374 participe à la régulation du trafic du canal Nav1.7, affectant ainsi sa localisation et son activité (Francois-Moutal *et al.*, 2018; Moutal *et al.*, 2018). L'absence de SUMOylation de CRMP2 suite à la mutation de son site de SUMOylation (CRMP2 K374A) entraîne une diminution de la fonction du canal Nav1.7 et corrige l'allodynie chez les souris KI CRMP2-K374A (Moutal *et al.*, 2020). Par conséquent, la prévention de la SUMOylation de CRMP2 pourrait être une cible thérapeutique efficace pour prévenir le développement de l'allodynie chronique après une lésion douloureuse neuropathique.

La SUMOylation de TRPV1, un canal cationique perméable aux ions Ca^{2+} et Na^+ , augmente la sensibilité du canal au stimuli thermique. Chez des souris invalidées spécifiquement pour l'enzyme de désSUMOylation SENP1 dans les neurones DRG, la SUMOylation exacerbée de TRPV1 entraîne une hyperalgésie thermique inflammatoire via une hyper-sensibilisation du canal TRPV1 (Wang *et al.*, 2018). Au même titre que TRPV1, la PKC ϵ est impliquée dans l'hyper-sensibilité inflammatoire. La SUMOylation de la PKC ϵ va permettre la régulation de la phosphorylation du canal TRPV1 modulant ainsi sa sensibilité. Les souris exprimant une forme non SUMOylable de la PKC ϵ développe une hyperalgésie thermique inflammatoire réduite. Par conséquent, la SUMOylation de PKC ϵ potentialise l'hyperalgésie thermique inflammatoire en stabilisation son interaction avec TRPV1 (Zhao *et al.*, 2020).

Ainsi, des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de traduire les résultats précliniques dans un cadre clinique dans le but de développer de nouvelles thérapies. Le développement d'inhibiteurs de l'enzyme SUMOylation pourrait représenter un défi intéressant qui pourrait permettre d'agir sur les niveaux de SUMOylation de protéines spécifiques afin de réduire les douleurs neuropathiques et inflammatoires.

2.3.4 Synaptopathies

La synapse humaine est composée de milliers de différentes protéines en plusieurs copies et des mutations dans les gènes codant pour ces protéines conduisent à de nombreuses maladies cérébrales (Grant, 2012). La structure de la synapse et l'efficacité de la transmission synaptique ainsi que les fonctions neuronales sont corrélées à la composition de la synapse. Des altérations de morphologie, de densité ou encore de la fonction synaptique sont caractéristiques de ce que l'on appelle les synaptopathies. Ces synaptopathies représentent un poids socio-économique important pour notre société. Il est donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents afin d'élaborer des stratégies de diagnostic et de prévention dans le but de développer des thérapies efficaces contre ces maladies.

De nombreuses études ont rapporté un rôle de la SUMOylation dans des synaptopathies telles que des maladies du neurodéveloppement, la schizophrénie ou des maladies neurodégénératives, comme les maladies de Parkinson, d'Alzheimer et de Huntington (Chen *et al.*, 2021) Fig. 15).

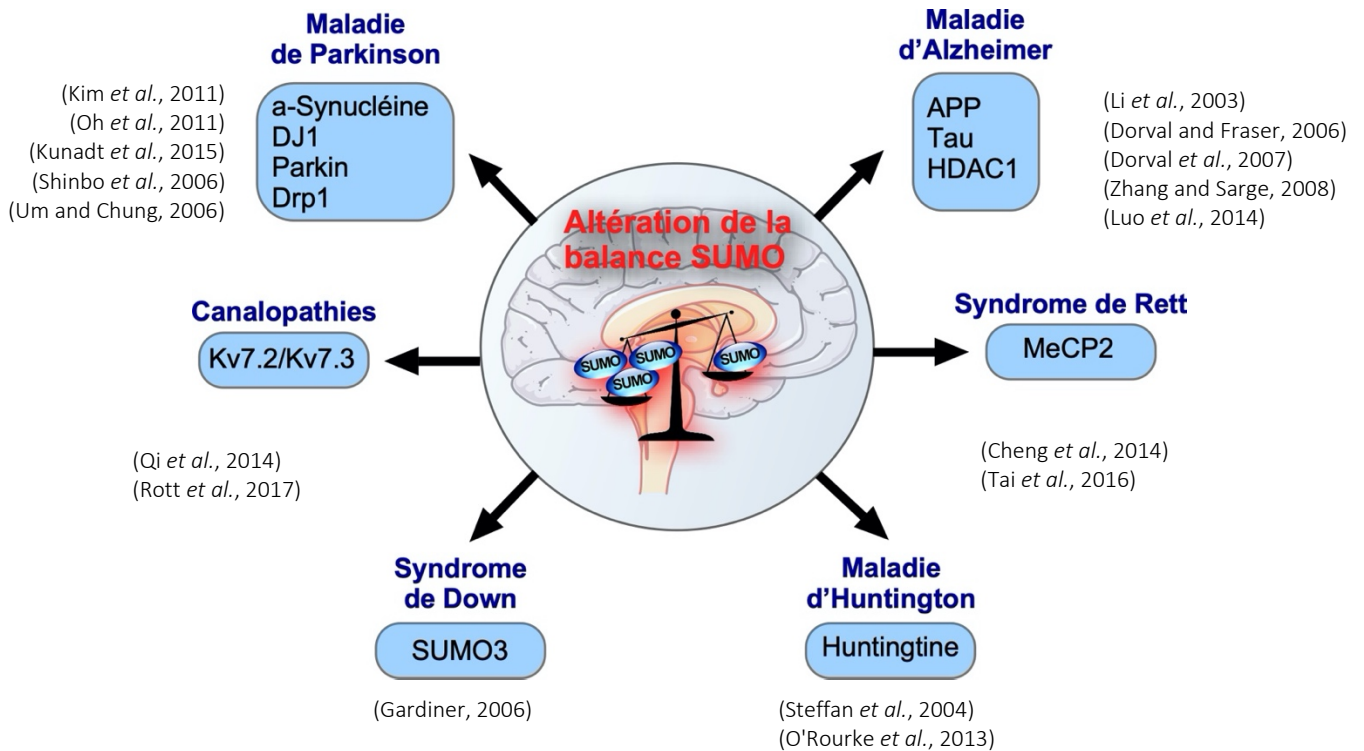


Figure 15. Protéines cibles de la SUMOylation et pathologies associées.

3 Vers un SUMOylome synaptique ...

La SUMOylation des protéines nucléaires a été largement caractérisée mais de nombreuses protéines sont aussi modifiées par SUMO dans les compartiments extranucléaires (Henley *et al.*, 2018). Malgré les évidences croissantes de l'importance de la SUMOylation dans la transmission et la plasticité synaptique, et l'identification constante de nouveaux substrats cibles de la SUMOylation en dehors du noyau, la SUMOylation des protéines de la synapse a été questionnée par deux groupes (Tirard *et al.*, 2012; Daniel *et al.*, 2017; Hendriks *et al.*, 2018). La distribution, les profils de développement et la régulation de la machinerie de SUMOylation n'ont pas encore été totalement caractérisés. De nombreuses revues et commentaires discutant de la SUMOylation de protéines extranucléaires dans les neurones ont récemment été publiés (Schorova and Martin, 2016; Wilkinson *et al.*, 2017; Henley *et al.*, 2018; Henley *et al.*, 2021) néanmoins c'est un domaine en pleine évolution grâce au progrès technique et de nouvelles protéines jouant un rôle dans les fonctions synaptiques ont récemment été identifiées et/ou validées comme cibles de la SUMOylation. **Dans ce dernier paragraphe, je me suis focalisée sur les stratégies**

d'identification des protéines SUMOylées de la littérature ainsi que la « controverse » de la présence de protéines SUMOylées à la synapse.

3.1 Liaisons covalentes et non covalentes de SUMO aux protéines cibles

Dans la plupart des cas, la lysine cible de la SUMOylation est comprise dans une séquence consensus courte $\Psi Kx D/E$ de la protéine modifiée (Ψ , acide aminé hydrophobe ; K, lysine modifiée ; x, résidu quelconque et D/E, aspartate ou glutamate ; (Melchior, 2000; Rodriguez *et al.*, 2001). Il est à noter qu'un motif de SUMOylation inverse $[E/D]xK\Psi$ a été rapporté dans la littérature. Des motifs étendus de la séquence consensus comme le consensus inversé, le PDSM (phosphorylation-dependent SUMOylation motif), le NSDM (negatively charged amino acid-dependent SUMOylation motif), le switch SUMO-acétyl et le HCSM (hydrophobic cluster SUMOylation motif) ont également été identifiés (pour une revue, voir (Beauclair *et al.*, 2015). Les éléments de part et d'autre du motif central, tels que les résidus acides, phosphorylables ou de proline, ont un impact sur la conjugaison de SUMO (Gareau *et al.*, 2012). Cependant, des lysines comprises dans un site consensus de sumoylation ont été rapportées comme non SUMOylées dans la littérature, suggérant que les interactions situées à l'extérieur de cette séquence jouent aussi un rôle dans la spécificité de la SUMOylation et la seule présence de lysines dans un site consensus ne garantit pas la SUMOylation d'une protéine (Flotho and Melchior, 2013). Il faut également noter que la détermination de la modification des protéines par SUMO a été réalisée en condition non-stimulée ainsi des précautions doivent être prises pour s'assurer que la non-modification d'une protéine donnée soit également bien réelle dans des conditions de stimulation car seul un faible pourcentage de protéines SUMOylées existent en condition de repos (Hay, 2005; Nayak and Muller, 2014).

De plus, 25 % des sites SUMOylés validés expérimentalement ne correspondent à aucun des motifs consensus cités précédemment. La SUMOylation peut générer de nouveaux sites d'interaction protéique et ainsi contribuer à l'association d'autres effecteurs. De nombreuses protéines contiennent également des motifs spécifiques d'interaction avec SUMO appelés domaines SIM (SUMO-Interacting Motif). Ils sont généralement constitués d'un noyau hydrophobe (Kerscher, 2007) et vont permettre à plusieurs protéines d'interagir avec les entités SUMO d'autres protéines, et ce, de manière non-covalente. C'est le cas d'environ 50% des substrats SUMOylés identifiés par l'équipe du Dr Vertegaal (Hendriks *et al.*, 2014).

3.2 Protéomique de la SUMOylation

L'un des moyens les plus efficaces pour étudier le rôle d'une MPT sur le protéome entier reste la protéomique systémique. Au cours des 20 dernières années, des progrès importants dans le domaine de la spectrométrie de masse et des approches bioinformatiques ont été réalisés permettant ainsi l'analyse à grande échelle des MPTs. La protéomique a ainsi permis l'étude des protéines modifiées par acétylation, phosphorylation, méthylation et ubiquitylation, révélant ainsi des milliers de substrats et leurs sites de modification. Du fait de la faible proportion

de protéines modifiées dans certains compartiments, son faible pourcentage de substrat total modifié à un moment donné et son état très transitoire en raison de l'activité des déSUMOylases (Esteras *et al.*, 2017), l'identification de la SUMOylation des protéines endogènes reste un vrai challenge. Afin de contourner ces difficultés, des approches alternatives ont été appliquées pour identifier les substrats SUMOylés. Celles-ci comprennent la purification par affinité des interacteurs d'Ubc9, la purification par affinité avec des peptides synthétiques à motifs d'interaction SUMO (SIM) et des techniques biochimiques et protéomiques améliorées pour identifier les protéines cibles et les sites de SUMOylation. Toutefois, il convient de noter que même avec ces approches techniques, l'identification de sites fonctionnellement pertinents sur des protéines SUMOylées validées reste encore un défi. Dans cette partie, j'ai décrit les méthodes actuellement utilisées pour l'étude de la SUMOylation des protéines et de la détection des sites de modification dans des systèmes exogènes et endogènes.

Méthode d'identification de la SUMOylation

Du fait de la faible proportion de SUMOylation dans les cellules et de sa rapide dynamique et des activités SUMO protéase importante, l'identification des protéines SUMOylées est un challenge. Pour faciliter les études de SUMOylation en protéomique, SUMO est communément fusionnée à son extrémité N-terminale à une étiquette et est exprimé de manière exogène dans des lignées cellulaires en cultures ou dans des modèles d'animaux. Les étiquettes communément utilisées sont His6 (Vertegaal *et al.*, 2006; Impens *et al.*, 2014; Lamoliatte *et al.*, 2014; Tammsalu *et al.*, 2015), protA-TEV-CBP (Golebiowski *et al.*, 2009; Tatham *et al.*, 2011), FLAG (Schimmel *et al.*, 2014), His6-FLAG (Schou *et al.*, 2014), His10 (Hendriks *et al.*, 2014; Hendriks *et al.*, 2015b; Xiao *et al.*, 2015) et Strep-HA (Bursomanno *et al.*, 2015b; Bursomanno *et al.*, 2015a). La surexpression de SUMO en combinaison avec son étiquette permet une purification efficace et a permis l'identification de plus de 1000 protéines SUMOylée (Hendriks *et al.*, 2014). Cette méthode SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) est utilisé pour extraire des informations quantitatives sur les changements de niveaux de SUMOylation en réponse aux différentes conditions expérimentales. Plus récemment, la quantification sans marquage (label-free quantification) a été utilisé pour étudier la dynamique de SUMOylation (Hendriks *et al.*, 2014; Hendriks *et al.*, 2015a; Hendriks *et al.*, 2015b). D'autres approches ont permis l'identification de protéines SUMOylées endogènes à l'aide de l'utilisation d'anticorps spécifiques de SUMO ou de pièges à motifs SIM (Fig. 16A).

La comparaison des différentes techniques de purification de protéines SUMOylées montre une claire distinction entre approche endogène ou exogène. Les protéines SUMOylées endogènes peuvent être purifiées par immunoprécipitation en utilisant un anticorps qui reconnaît spécifiquement SUMO1 ou SUMO2/3 (Becker *et al.*, 2013). Le rendement de cette approche est relativement faible et utilise des détergents doux. Cette méthode nécessite donc une grande quantité d'anticorps et de matériel biologique tout en devant faire face à un fort bruit de fond dû à l'abondance de protéines liées de manières non spécifiques. Les chaînes poly-SUMOylées endogènes

ont été identifiées à l'aide de pièges à motifs SIM. Cependant, cette méthode ne permet pas la détection de protéines mono-SUMOylées de façon efficace et souffre d'une forte interférence due à des interactions non spécifiques avec les SIM ainsi qu'aux inconvénients liés aux techniques d'immunoprécipitation.

La protéine fusionnée étiquette-SUMO peut être purifiée beaucoup plus efficacement grâce à des méthodes spécialisées et des approches de purification commerciales. Différentes protéines de fusion facilitent la purification des protéines SUMOylées en utilisation des colonnes d'affinités ou encore des anticorps dirigés contre les étiquettes utilisées qui restent fonctionnelles même en condition très stricte nécessaire pour l'inactivation efficace des SUMO protéases. Les fortes interactions avec la matrice/colonne en forte abondance et une procédure de lavage rigoureuse permettent une purification à haut rendement des protéines SUMOylées sans biais significatif. Cependant, il y a encore des limitations dues aux tampons utilisés pendant l'étape d'immunoprécipitation résultant en une co-purification de protéines non-spécifiques. Suivant le système choisi, il faut se demander si l'expression exogène de la protéine SUMOylée est la meilleure approche.

Identification des sites de SUMOylation

La plupart des études protéomiques sur la SUMOylation ont permis d'identifier des protéines modifiées par SUMO ainsi que la variation dynamique de la SUMOylation suivant un stress cellulaire mais les résidus lysines cibles de cette modification ne sont pas décrits. Cependant, la détection du site de SUMOylation d'une protéine s'avère cruciale pour créer un mutant non SUMOylable et étudier la fonction spécifique de la SUMOylation des protéines cibles.

Les sites de SUMOylation ont été difficiles à identifier par spectrométrie de masse. Alors que des milliers de protéines cibles étaient connues, uniquement 150 résidus Lysine modifiées ont initialement été identifiées (Matic *et al.*, 2010; Lamoliatte *et al.*, 2014). Cela contraste avec le nombre de sites connus pour d'autres MPTs. Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs causes : 1) L'état SUMOylé des protéines cellulaires est peu élevé à l'état basal et, de ce fait, les cibles à identifier sont peu abondantes. 2) La SUMOylation est une modification dynamique qui fait intervenir des SUMO protéases qui restent actives dans la plupart des conditions standard de lyse cellulaire. 3) Bien que des anticorps spécifiques de SUMO existent, ils sont nécessaires en très grande quantité et donc pas toujours rentables. 4) L'analyse en spectrométrie de masse des MPTs s'effectue sur les peptides générés après digestion à la trypsine. Dans le cas de SUMO2/3, le peptide C-terminal digéré correspond à la partie de paralogue SUMO restée attachée au peptide cible après clivage de toutes les lysines et arginines par la trypsine. Ce peptide reliquat comprend 32 acides aminés et empêche son analyse efficace par la spectrométrie de masse actuelle. L'utilisation d'une double digestion permet de raccourcir le peptide branché contenant SUMO mais à pour désavantage de raccourcir aussi le peptide cible compliquant son identification.

De nombreuses solutions pour identifier les sites de SUMOylation ont été développées mais certaines d'entre elles peinent à identifier plus d'une centaine de sites. Pour pallier les longs peptides SUMO2 digérés, la stratégie la plus courante est l'utilisation d'un mutant de la protéine SUMO. Plusieurs mutants ont été réalisés pour raccourcir le peptide généré après la digestion par la trypsine : SUMO1-Q92R, SUMO1-T95R, SUMO2-Q87R, SUMO2-T91R. Ces mutations n'altèrent pas le comportement de la protéine SUMO dans les cellules. L'utilisation des mutant SUMO1-T95R et SUMO3-T91R a permis d'identifier respectivement 295 et 167 sites de SUMOylation (Impens *et al.*, 2014).

Une approche complémentaire consiste à remplacer la trypsine par une autre enzyme de digestion, l'endopeptidase Lys-C, qui clive uniquement la partie C-terminale des résidus lysine, et à muter tous les résidus Lysine en Arginine en plus des mutations décrites précédemment. Ces mutations des lysines vont permettre de protéger les mutants SUMO de l'activité peptidase de Lys-C alors que toutes les autres protéines seront facilement digérées. Ces approches sont insuffisantes pour identifier un grand nombre de sites de SUMOylation et la présence seule d'une mutation dans la partie C-terminale de SUMO n'est pas suffisante en soi puisqu'il est nécessaire d'effectuer un enrichissement des peptides modifiés par SUMO avant détection en spectrométrie de masse pour réduire la complexité de l'échantillon.

Plusieurs méthodes sont maintenant disponibles pour identifier les sites de SUMOylation et les protéines modifiées par SUMO. Grâce à l'amélioration rapide de la méthodologie et de la spectrométrie de masse, un grand nombre de sites SUMO a été rapporté dans la littérature. L'utilisation des différents mutants SUMO2-T90K et SUMO2-T90R combinée à une digestion à la Lys-C et une immunoprécipitation ciblant avec des anticorps ciblant le motif GG a permis d'identifier 1002 sites SUMO2 (Fig 16C-E). Les Dr Hendricks et Vertegaal ont optimisé la méthode consistant à muter toutes les lysines et ont identifié 4361 sites de SUMOylation (Hendriks *et al.*, 2014). Ces améliorations incluent la génération d'une lignée stable de cellules comprenant un tag Histidine étendu His10, une purification de SUMO avant la digestion à la Lys-C et une filtration des SUMO non conjugués avant la purification des peptides modifiées par His10-SUMO2 (Fig. 14B). Cette méthode fonctionne de la même manière que celle décrite précédemment pour le mutant SUMO2 à l'exception que la digestion est réalisée à l'aide de la trypsine et que l'identification doit être combiné à l'approche SILAC (Stable isotope labeling by amino acids) pour discriminer la SUMOylation de l'Ubiquitylation. L'utilisation d'un double mutant SUMO2-Q87R/Q88N combinée à une immunoprécipitation ciblant la séquence C-terminale de SUMO NQTGG a permis la mise en évidence 954 sites SUMO2 (Fig. 14E ; Lamoliatte *et al.*, 2014). Une méthode plus récente fréquemment utilisée, Protease-Reliant Identification of SUMO Modification (PRISM), repose sur l'utilisation des SUMO protéases pour identifier les résidus lysine SUMOylés. Pour cela, les protéines SUMOylées sont enrichies puis tous les résidus lysine sont bloqués biochimiquement. Une SUMO protéase est ensuite utilisée pour déconjuguer SUMO laissant le résidu lysine précédemment SUMOylé libre d'accès (Fig. 14F). Une digestion à la trypsine de l'échantillon va permettre d'obtenir des peptides qui correspondent aux sites de SUMOylation s'ils se terminent ou sont précédés par une

lysine. Cette méthode d'identification des sites est la seule qui ne requiert pas de mutation de la protéine SUMO et a donné lieu à l'identification de 751 sites SUMO2 non mutés bien que l'expression exogène de la protéine His10-SUMO2 sauvage ait été nécessaire.

En utilisant MaxQuant, les Dr Hendriks et Vertegaal ont obtenu une vue d'ensemble des sites de SUMOylation à partir des données brutes de sept grandes études des sites de SUMO (Hendriks and Vertegaal, 2016). Au total, ils montrent 7710 sites de SUMOylation dont 5032 sites de SUMOylation (environ 65%) ont été trouvés dans des données publiées et dans leurs données de spectrométrie de masse. Pour résumer, 1781 sites SUMO dans au moins deux études et 208 sites ont été rapportés dans 5 études. Dans l'ensemble, la comparaison des études au niveau protéiques et au niveau des sites de SUMOylation est différente et les auteurs soulignent que l'analyse des sites de SUMOylation offre un plus grand potentiel pour l'identification des protéines modifiées par SUMO du fait de la faible saturation du spectromètre de masse lors de la lecture des échantillons.

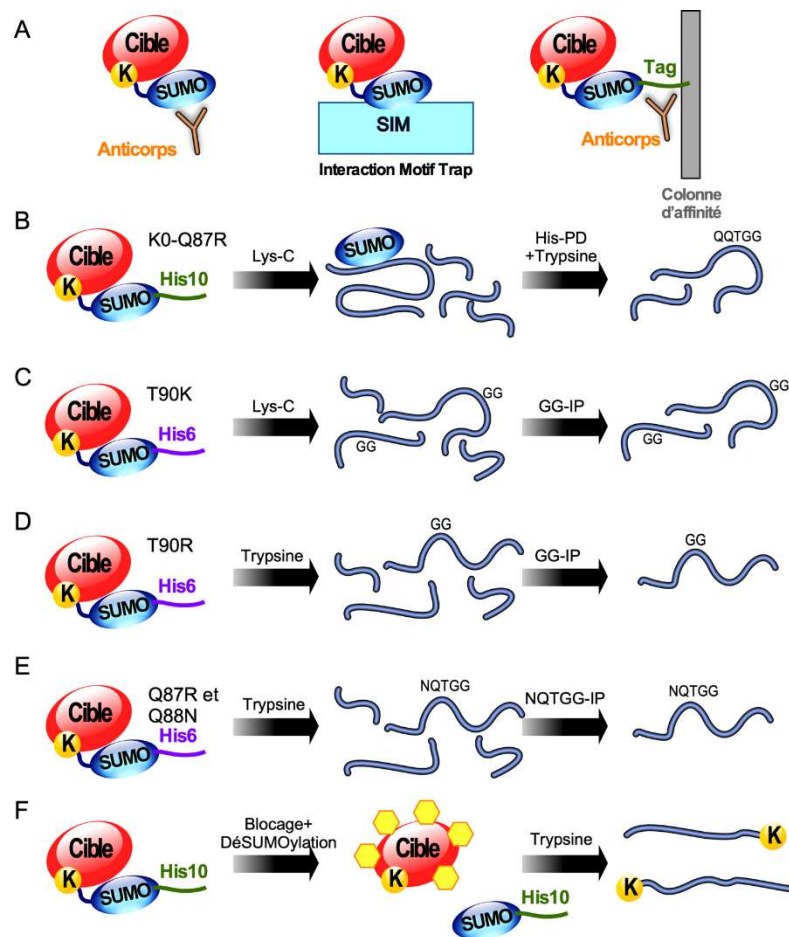


Figure 16. Méthodes de protéomique pour l'étude de la SUMOylation

(A) Les différentes méthodes d'identification de la SUMOylation utilisés dans la littérature (B-F). Les différentes approches pour l'identification des sites dans la littérature (D'après (Hendriks and Vertegaal, 2016).

Bien que l'approche par expression de SUMO muté ou fusionné à une étiquette soit efficace pour cartographier les sites de SUMOylation, elle présente encore de nombreuses limites. Son incapacité à faire le distinguo entre SUMOylation endogène et résidus des substrats modifiés artificiellement par les paralogues SUMO exogènes reste un inconvénient majeur. En effet, la surexpression même faible de SUMO ou la présence de séquences mutées entraîne une fixation non naturelle de SUMO sur les lysines cibles des protéines. Enfin, l'expression exogène d'une version mutée ou sauvage de SUMO exclut l'analyse des sites de modifications endogènes ou l'analyse à partir de tissus ou d'échantillons cliniques.

Identification des protéines endogènes modifiées par SUMO

L'identification de la SUMOylation endogène requiert donc d'autres stratégies. La surexpression de SUMO non muté dans les cellules de mammifères suivie d'un protocole d'enrichissement et de digestion enzymatique a permis d'identifier les sites de SUMOylation. Les protéines modifiées par SUMO sont enrichies par IP en utilisant 2 anticorps monoclonaux bien caractérisés anti-SUMO1 et anti-SUMO2/3. Pour réduire les contaminations, un peptide minimal « epitope-spanning » est utilisée pour éluer sélectivement les antigènes dans des conditions d'élution efficace. La trypsine est toujours utilisée pour digérer les partenaires de liaison après l'étape de purification. Plus de 1000 protéines ont été identifiées dans cet éluât dont notamment des protéines liées à SUMO de manière non spécifiques (Becker *et al.*, 2013). Grâce à des critères de sélection stricte pour l'analyse des données de spectrométrie de masse, 232 candidats endogènes cibles de la SUMOylation ont été confirmé avec une grande fiabilité. Cependant, un point négatif majeur reste toujours le fait que le peptide digéré fait plus de 3 kDa. Par la suite, une approche avec un enrichissement en deux étapes et une double digestion a permis d'améliorer plus efficacement l'enrichissement en peptides digérés. Afin de générer des peptides plus petits, les peptides digérés et enrichis sont soumis à une deuxième digestion à l'aide de l'enzyme Asp-N après quoi les peptides sont fractionnés sur un appareil StageTip. Cette méthode a permis d'obtenir la quantité la plus importante de sites accepteurs SUMO2/3 endogènes soit 14869 sites identifiés dans des cellules humaines présentant un stress thermique et une inhibition protéasomique correspondant à 3870 protéines SUMOylées (Hendriks *et al.*, 2018).

Actuellement, il n'existe aucune base de données qui compile l'ensemble des protéines modifiées par SUMO de manière exhaustive. Il est parfois difficile d'interpréter les listes de protéines cibles et de sites SUMO et de savoir comment les données ont été obtenues et filtrées. Les Dr Hendriks et Vertegaal ont compilé 22 études protéomiques réalisées sur des cellules humaines et rapportant les protéines cibles de SUMO1 et de SUMO2/3 (Hendriks and Vertegaal, 2016). Ils ont traité les données de SUMO1 et de SUMO2/3 conjointement estimant que les différences techniques entre les études étaient plus importantes que les différences de conjugaison entre SUMO1 et SUMO2/3. Ils en ont tiré une liste de 3728 protéines, ce qui équivaut à environ 18% du protéome

humain. Sans surprise, la liste comprend des protéines cibles connues de la SUMOylation telle que RANGAP1, TRIM28 ou encore TOP2 α et sont pour la majorité des protéines nucléaires. Cependant, très peu de protéines synaptiques ont été rapportées dans ces listes et l'accès d'une liste exhaustive des protéines SUMOylées à-de la synapse reste à réaliser.

3.3 SUMOylation synaptique : controverses ?

L'existence de la SUMOylation à la synapse a été questionnée par le laboratoire du Dr Nils Brose. Une divergence sur l'existence de la SUMOylation à la synapse est apparue suite à l'étude par spectrométrie de masse des substrats de SUMO en utilisant un modèle de souris knock-in (KI) His-HA-SUMO1 qui permet l'expression de l'isoforme SUMO1 fusionnée à deux étiquettes : His et HA. Les auteurs n'ont pas détecté de substrats synaptiques modifiés par SUMO1 et n'ont pas pu localiser His-HA-SUMO1 à la synapse (Tirard *et al.*, 2012). Ces résultats s'expliquent notamment par la diminution des niveaux de conjugaison de SUMO1 que les auteurs de ce travail estiment à environ 20-30% dans le cerveau des animaux KI par rapport aux animaux WT. Cette diminution de SUMO1-ylation s'accompagne d'une augmentation de SUMO2/3ylation indiquant un effet compensatoire. Ces résultats suggèrent que le double étiquetage de SUMO1 diminue sa capacité à être conjuguée aux protéines cibles altérant ainsi le processus de SUMOylation. Ce modèle de souris KI exprimant His-HA-SUMO1 ne semble pas être un modèle approprié pour l'étude de la SUMOylation cérébrale et/ou synaptique. Le niveau global de SUMOylation dans un cerveau adulte est de plus très faible (Loriot *et al.*, 2012) et la SUMOylation synaptique se produit à des niveaux encore plus faibles comparés à la SUMOylation nucléaire par exemple. La diminution de 20 à 30% de la SUMO1-ylation globale dans le cerveau des souris KI His-HA-SUMO1 observée peut rendre les niveaux de SUMOylation synaptique trop bas pour être détectés par les méthodes employées (WB, ICC,...). Malgré la controverse de l'utilisation de ce modèle de souris KI His-HA-SUMO1 (Tirard *et al.*, 2012), le même laboratoire a plaidé contre la modification par SUMO1 de nombreux substrats synaptiques déjà identifiés SUMO1-ylés en omettant l'évaluation de ces substrats chez les souris WT. Le laboratoire en a conclu à l'inexistence fonctionnelle de la modification par SUMO1 à la synapse. Un commentaire de la communauté scientifique travaillant sur la SUMOylation neuronale (y compris mon laboratoire) a été publié pour inciter à réagir et pour rapporter pas à pas les données inexacts de cette étude. Ainsi, le laboratoire du Dr Nils Brose n'a pas comparé la SUMO1-ylation entre souris WT et KI et n'examine pas non plus la compensation par SUMO2/3. Aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée pour évaluer le rôle de la SUMO1-ylation dans les fonctions synaptiques et neuronales. Les anticorps utilisés pour détecter la forme SUMOylée de GluK2 sont incapable de reconnaître la forme SUMOylée car l'épitope reconnu par l'anticorps utilisé est apparemment masqué par la liaison de la protéine à SUMO. Enfin, ils montrent un marquage nucléaire très faible dans les neurones KI et WT, suggérant que le marquage synaptique est probablement très en dessous du seuil de détection par microscopie (Wilkinson *et al.*, 2017).

Plus récemment, une étude utilisant des approches de protéomique pour caractériser les sites spécifiques de SUMO2/3 in vivo dans huit différents organes de souris a montré des SUMOylomes bien différents d'un organe à l'autre (Hendriks *et al.*, 2018). De manière intéressante, le nombre de protéines retrouvées SUMOylées dans le cerveau était faible et ces protéines appartenaient principalement au compartiment nucléaire supportant ainsi les études du laboratoire du Dr Nils Brose indiquant que la SUMOylation synaptique serait souvent identifiée à tort (Daniel *et al.*, 2017).

OBJECTIFS

OBJECTIFS

La synapse est une structure hautement spécialisée qui est le lieu de la transmission synaptique. Les neurones sont capables d'adapter l'efficacité de leur transmission en changeant leur force synaptique sur de longues périodes. Ces processus reposent sur des interactions protéiques complexes qui ont besoin d'être régulées dans le temps et dans l'espace par des modifications post-traductionnelles. Parmi ces modifications, la SUMOylation est celle que j'ai étudiée lors de ma thèse. L'étude de la SUMOylation au niveau du système nerveux suscite un intérêt grandissant. Originellement étudié pour son rôle dans la régulation des fonctions nucléaires, la SUMOylation apparaît comme un régulateur clé des fonctions extranucléaires, en particulier au niveau de la synapse. Des altérations de la SUMOylation ont été mises en évidence dans de multiples pathologies neurologiques et notamment des synaptopathies, soulignant l'importance d'étudier la SUMOylation dans un contexte synaptique. Néanmoins, le répertoire des protéines SUMOylées à la synapse reste très limité. La compréhension des mécanismes de régulation spatiotemporelle ainsi que des conséquences fonctionnelles de la machinerie de SUMOylation est primordiale pour permettre de mieux comprendre le rôle de cette modification en conditions physiologiques mais aussi dans l'étiologie de certaines pathologies neurologiques. L'ensemble de ces études pourrait un jour conduire au développement de nouveaux traitements thérapeutiques de pathologies cérébrales en ciblant la SUMOylation.

Si la SUMOylation des cibles nucléaires joue sans aucun doute des rôles majeurs, il a également été démontré qu'un grand nombre de cibles de SUMOylation extranucléaires validées fonctionnellement jouent un rôle direct dans la régulation de la fonction synaptique et mitochondriale. Un effort de recherche concerté a permis d'identifier certains des rôles cruciaux de la SUMOylation dans l'excitabilité neuronale, la transmission et la plasticité synaptique ainsi que pour la survie neuronale. De plus, des altérations de la SUMOylation sont associées à de multiples neuropathologies. Malgré ces progrès, de nombreuses questions restent sans réponses.

Mon projet de thèse est séparé en 2 axes :

- 1- **Étude des mécanismes de régulation de la SUMOylation synaptique**
- 2- **Identification et caractérisation d'un SUMOylome synaptique chez le rat**

Axe 1- Régulation de la balance SUMOylation/ déSUMOylation à la synapse

ANNEXE 4

Article: Pronot M, Poupon G, Pizzamiglio L, Schorova L Prieto M, Folci A, Lebel Q, Gwizdek C, Brau F and Martin S.

Bidirectional regulation of synaptic deSUMOylation by Group I metabotropic glutamate receptors

Hypothèse de travail

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle essentielle pour les cellules eucaryotes. Dans le système nerveux central, la SUMOylation extranucléaire est apparue comme un régulateur crucial des fonctions de nombreuses protéines neuronales, impliquées dans la différenciation et la survie neuronale ou encore, dans la transmission et la plasticité synaptique (pour revues : Henley *et al.*, 2014 ; Schorova and Martin, 2016). Des altérations dans l'équilibre SUMOylation/désSUMOylation des protéines sont également retrouvées dans plusieurs désordres neurologiques (Fig. 12). Par conséquent, avant de pouvoir proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour ces maladies, il est indispensable de comprendre les mécanismes de régulation menant à la fois à la SUMOylation et la désSUMOylation des protéines neuronales. Certaines données de mon laboratoire de thèse ont mis en évidence un mécanisme de régulation de la seule enzyme de conjugaison Ubc9 à la terminaison postsynaptique (Loriol *et al.*, 2014). En utilisant des approches d'imagerie dynamique et de biochimie, ils ont démontré qu'Ubc9 est retenue transitoirement dans les épines dendritiques en réponse à l'activation des récepteurs mGlu5R et de sa cascade de signalisation. Ceci se produit suite à la reconnaissance des protéines phosphorylées par la PKC. Les niveaux de SUMOylation synaptique sont augmentés après 10 min d'activation des mGlu5R. Lors de ma première année de thèse, j'ai rejoint un projet visant à élucider les mécanismes de régulation de la désSUMOylase SENP1 à la synapse. Nous avons montré que la diffusion de SENP1 était indépendante de l'activation des rNMDAs mais dépendante de l'activation des mGlu5R tout comme Ubc9. Une activation prolongée (>25min) des mGlu5R entraîne une accumulation de SENP1 à la postsynapse. Cette accumulation à la postsynapse a pour conséquence une diminution de la SUMOylation à la synapse pour restaurer son niveau initial (voir **Annexe 2** ; Schorova *et al.*, 2019).

Ces travaux menés par le laboratoire montrent que les enzymes Ubc9 et SENP1 sont toutes deux recrutées à la synapse de manière dépendante de l'activation des mGlu5R, mais leur accumulation se produit sur des échelles de temps très différentes (de l'ordre de la seconde pour Ubc9 contre la minute pour SENP1). **Ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes de régulation coexistent pour différenciellement contrôler la redistribution spatiotemporelle de ces enzymes à la synapse lors de l'activation neuronale.**

Faire avancer les connaissances sur la régulation de la balance SUMO/désSUMOylation à la synapse s'ajouteront aux connaissances fondamentales de physiologie cellulaire pour comprendre les implications de cette PTM dans l'étiologie des maladies cérébrales où l'équilibre entre SUMOylation et désSUMOylation est altéré. En effet, la perturbation de la balance SUMOylation/désSUMOylation est associée de façon récurrente à des désordres neurologiques (Schorova and Martin, 2016, Henley 2020).

Dans le but de comprendre les mécanismes mis en place pour réguler l'homéostasie synaptique de la SUMOylation, nous devons compléter les résultats du laboratoire sur la régulation synaptique de l'enzyme de SUMOylation Ubc9 par l'étude de la régulation du processus de désSUMOylation. Une partie de mon projet de thèse a eu pour but d'identifier les mécanismes moléculaires participant à la régulation de la diffusion de l'enzyme de désSUMOylation SENP1 à la synapse de neurones hippocampiques de rat. **Pour étudier ces mécanismes, j'ai utilisé différentes approches de biochimie synaptique et d'imagerie dynamique pour répondre aux questions suivantes :**

- Y a-t-il d'autres récepteurs glutamatergiques impliqués dans la régulation de la diffusion synaptique de SENP1 ?
- Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans la diffusion synaptique de SENP1 ?
- Quels sont les effets de ces régulations sur les niveaux de SENP1 synaptiques ?

Matériels et méthodes

Animaux

Les rates Wistar gestantes proviennent exclusivement d'une source commerciale (Janvier Labs, Saint Berthevin, France). Tous les animaux ont été manipulés et traités en accord avec les recommandations du conseil européen pour le bien-être des animaux utilisés à des fins expérimentales dans notre animalerie. Les animaux ont eu libre accès à l'eau et à la nourriture. Les rates ont été nourries ad libitum et maintenues dans une atmosphère contrôlée avec un cycle veille/sommeil de 12h/12h. Le protocole pour préparer les cultures primaires de neurones à partir d'embryons de rats à E18 est utilisé en routine au laboratoire et a été approuvé localement par le Comité Institutionnel d'Ethique Pour l'Animal de Laboratoire No 28 et nationalement APAFIS (Référence Projet APAFIS#18647-2019011110552947v3).

Culture cellulaire

Les neurones sont préparés à partir des cerveaux prélevés sur les embryons de rat (E17). Après 3 rinçages HBSS, les tissus (hippocampe ou cortex) sont dissociés dans la trypsine (1/10 dans du HBSS). Après 9 min d'incubation à 37°C, le milieu est aspiré puis le culot est lavé 3 fois au HBSS et 1 fois avec le milieu « Plating » [Neurobasal (Gibco) contenant du B27 2% (Gibco), Pénicilline/Streptomycine 0,05 U (Ozyme), GlutaMAX 2 mM (Gibco), Sérum de cheval (HS) 5% pour l'hippocampe, Sérum de veau foetal 5% pour le cortex]. Les cellules sont resuspendues dans 5 mL de milieu « Plating ». Le nombre de cellules vivantes est déterminé par comptage sur une lame de Malassez. Les cellules sontensemencées à raison de 90 000 cellules par diamètre de 35 mm ou 600 000 cellules par diamètre de 60 mm sur des boîtes ou des lamelles de verre (VWR) préalablement saturées en poly-L-lysine toute la nuit à température ambiante (0.1 mg/mL, Sigma). Les milieux de culture sont remplacés après 24h par du milieu Feeding [Neurobasal, B27 2% et Streptomycine/Pénicilline 0.05U]. Les cultures sont conservées à 37°C sous 5% CO₂ jusqu'à utilisation au stade mature de 18 à 21 jours in vitro (JIV).

Constructions plasmidiques

La construction SENP1 humain fusionné à la protéine GFP dans le plasmide pEGFP-C2 provient du docteur Wang Min (Li *et al.*, 2008)

Transduction utilisant des particules virales recombinantes (virus Sindbis)

Les virus Sindbis sont des virus à ARN appartenant à la famille des alphavirus. Le système d'expression Sindbis permet une expression rapide (en quelques heures) et efficace des transgènes qu'ils contiennent (Washbourne et McAllister, 2002). Les virus Sindbis peuvent intégrer un insert d'environ 10kb dans leur génome ce qui est

un avantage pour l'expression de protéines de grande taille. L'efficacité de transduction par les virus Sindbis est importante ce qui peut les rendre cytotoxiques en détournant la synthèse protéique des cellules hôtes.

Au cours de la réplication, les virus Sindbis produisent deux types d'ARNm, l'ARN génomique codant pour les protéines de réplication et l'ARN sous-génomique plus petit codant pour les protéines structurales nécessaires à l'assemblage des particules virales. Le gène d'intérêt est inséré dans le vecteur pSinRep5 sous le contrôle du promoteur sous-génomique Sindbis. Cette nouvelle construction est alors utilisée pour produire des transcrits d'ARN (ARN recombinant) in vitro. Ces transcrits d'ARN coiffés et polyadénylés dans le cytoplasme cellulaire seront traduits produisant ainsi les enzymes permettant la synthèse des molécules d'ARN génomique et sous-génomique dans le cytoplasme. L'ADN sous-génomique étant remplacé par le gène d'intérêt dans notre système, les protéines structurales doivent être aussi apportées pour encapsuler l'ARN recombinant et produire les pseudovirions. Ces protéines sont codées sur un plasmide auxiliaire (pDH-BB) et son ARN doit être co-transfecté avec l'ARN recombinant de pSinRep5. L'ARN sous-génomique devient le plus abondant et recrute rapidement la plupart des mécanismes de traduction de l'hôte pour son utilisation, permettant une traduction élevée de la protéine d'intérêt. Les ARNc ont été obtenus par rétrotranscription in vitro à partir du plasmide pSinRep5 linéarisé contenant la séquence d'ADN codant pour la forme sauvage de GFP-SEN1 et de pDH-BB en utilisant le Kit de transcription mMessage mMachine SP6 (Ambion) et l'inhibiteur de RNase SUPERase-In (Ambion). Les ARNc ont ensuite été électroporés dans des cellules BHK (Baby Hamster kidney fibroblasts). Les pseudovirions présents dans le milieu de culture (α MEM, 5% FBS, 2 mM glutamine, 50 U / ml pénicilline/streptomycine) sont collectés 48h après électroporation et concentrés par ultracentrifugation (30 000 rpm pendant 1h30min à 4°C) avec le rotor SW41Ti. Les particules Sindbis atténuées non répliquatives (SINrep nsP2S726) sont remises en suspension dans du milieu neurobasal puis conservées à 80°C après titration jusqu'à utilisation.

Traitements pharmacologiques

L'utilisation de substances pharmacologiques ciblant des récepteurs membranaires et des voies de signalisation est une approche largement utilisée pour étudier des mécanismes de régulation cellulaire. Pour étudier la régulation de la désumoylation à la synapse, nous avons dans un premier temps utilisé des agonistes et antagonistes spécifiques ciblant les récepteurs mGlu1R/5 dans du tampon de Earle (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 50 mM HEPES, Tris pour tamponner à pH 7.4) ou dans du fluide artificiel cérébrospinal (ACSF) pour les tranches de cerveau (119mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 11 mM glucose, 10 mM HEPES, Tris pour tamponner à pH 7.4). Pour disséquer avec plus de précision les acteurs moléculaires impliqués dans la diffusion de SEN1 à la synapse, nous avons utilisé des activateurs ou des inhibiteurs d'enzymes spécifiques de la PKC,

la PKA ou la CaMKII. Ces acteurs moléculaires ont été choisis pour leur implication comme seconds messagers suite à l'activation des récepteurs couplés aux protéines-G mGlu1R/5. De plus, nous avons utilisés des agents pharmacologiques pour déstabiliser des molécules ou structures pouvant être impliquées dans la redistribution de SENP1 à la synapse comme par exemple, les microtubules.

Tous les agents pharmacologiques ont été validés pour une utilisation sur les cultures primaires de neurones.

Agents pharmacologiques	Action	Compagnie/ Référence	Concentration utilisée
Tetrodotoxin (TTX)	Inhibiteur des canaux sodiques. Diminution de l'hyperexcitabilité des cultures neuronales	Abcam Ab120055	0,5 à 1µM
(S)-3,5-dihydroxyphenyl-glycine (DHPG)	Agoniste sélectif des récepteurs mGlu1R et mGlu5R	Hellobio HB0045	50µM (culture) 100µM (tissus)
JNJ 16259685	Antagoniste non compétitif des récepteurs mGlu1R	Tocris 2333	0,1µM
Chelerythrine	Inhibiteur sélectif de la Protein Kinase C (PKC)	Sigma C2932	5µM
KN93	Inhibiteur de la Ca ²⁺ /calmoduline dependent protein Kinase II	Tocris 1278/1	1µM
H89	Inhibiteur de la Protéine Kinase A	Tocris 2910/1	1µM
Nocodazole	Inhibition de la polymérisation de la tubuline. Provoque la dépolymérisation des microtubules.	Sigma SML1665	33µM
Taxol	Inhibition de la dépolymérisation des microtubules.		0,1µM

Tableau 4. Agents pharmacologiques utilisés

Immunocytochimie

Les neurones (18-21 JIV) traités ou non à 37°C pendant 15 min par nos différents agents pharmacologiques (Tableau 1) ont été fixés dans du méthanol froid pendant 20 min. Après plusieurs lavages au PBS 1X, les neurones sont ensuite saturés en PBS 1X contenant 0,1% BSA, 0,1% Triton X100 et 10% Horse Sérum (HS)

pendant 1h à TA, puis marqués à l'aide des anticorps primaires anti-MAP2, anti-PSD95 et anti-SENP1 pendant ON à 4°C dans du PBS 1X contenant 0,1% BSA et 0,1% Triton X100. Les neurones sont ensuite lavés 3 fois en PBS 1X puis incubés avec les anticorps secondaires conjugués à l'Alexa 488, 594 ou 647 dans du PBS 1X contenant 0,1% BSA et 0,1% Triton X100 pendant 45 min à TA. Après plusieurs lavages en PBS 1X, les lamelles sont montées sur lame avec du Mowiol (Sigma). Les lames sont stockées à -20°C jusqu'à observation en microscopie confocale.

Préparation des tranches de cerveaux de rat et purification des Synaptosomes

Des rats âgés de 13 jours ont été sacrifiés et les cerveaux ont été prélevés. Les tranches de cerveaux de 300 µm d'épaisseur ont été préparées à l'aide d'un vibratome dans une solution à 4°C et oxygénée d'ACSF (125 mM NaCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 25 mM Glucose, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 2,5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃). Les tranches ont ensuite été placées dans un incubateur à 32°C, puis traitées avec les agents pharmacologiques indiqués.

Les tranches ont été homogénéisées à l'aide d'un potter en verre et en Téflon dans 2mL de milieu Tris-Sucrose froid (10 mM Tris-HCl pH7,5, 0,32 M Sucrose) en présence d'inhibiteur de protéases et de 10 mM N-ethylmaleimide (NEM). L'homogénat est centrifugé à 1000 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est déposé sur un gradient croissant de 2% à 20% de Percoll dans le milieu Tris-Sucrose. Après ultracentrifugation à 15 000 rpm pendant 10 min à 4°C, la fraction synaptosomale comprise à l'interface entre 10% et 20% de Percoll est récupérée à l'aide d'une pipette en verre érodée. La fraction est ensuite lavée dans une solution HEPES (5 mM HEPES, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose) en présence d'inhibiteurs de protéases (Roche) et de 10 mM NEM, pour éliminer le sucrose. La fraction synaptosomale est centrifugée à 10 000g pendant 15 min. Le culot enrichi en synaptosomes est resuspendu dans du tampon de lyse (150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7,4, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS) en présence d'inhibiteurs de protéases (Roche) et de 10 mM NEM. La concentration protéique de chaque échantillon est mesurée par la méthode de Bradford avant analyse par Immunoblot.

Immunoblot

Le gel utilisé pour l'analyse des protéines est composé de deux parties : la partie inférieure contient le gel de séparation [acrylamide/bisacrylamide à 8 ou 10% en fonction du poids moléculaire des protéines à séparer en présence de Tris 375 mM pH 8.8, SDS 0.1% et des catalyseurs APS et TEMED]. La partie supérieure correspond au gel de concentration [acrylamide/bisacrylamide 4%, Tris 125 mM pH 6.8, SDS 0.1% et des catalyseurs APS et TEMED]. La migration des échantillons est réalisée en condition dénaturante dans un tampon Tris-Glycine 1X contenant 0,1% SDS.

Après migration, les protéines sont électrotransférées à 4°C sur une membrane de nitrocellulose dans du tampon de transfert (Tris-glycine 1X ; SDS 0,1% ; 20% Ethanol) pendant 1h30-2h à 400 mA. La membrane est rincée à l'eau puis saturée pendant 1h avec du TBST-Lait 5% (Tris 200 mM, NaCl 137 mM, Tween 1%, Lait 5%). La membrane est alors incubée avec un anticorps primaire (Tableau 1) dans du TBST- Lait 5% pendant 1 nuit à 4°C sous agitation. Après lavages dans du TBST à TA, la membrane est incubée dans du TBST-Lait 5% avec les anticorps secondaires adaptés couplés à la HRP. Après 1h à TA, la membrane est lavée dans du TBST sous agitation. Les protéines d'intérêts sont ensuite visualisées par chimioluminescence (Immobilon, Millipore) sur un imageur de type Fusion (Vilbert Lourmat, Allemagne). Les données ont ensuite été quantifiées grâce aux fonctions d'analyse de blot du logiciel ImageJ.

Anticorps

Anticorps	Espèces	Compagnie	Concentration utilisée
Anti-SEN1	Lapin	Sigma-Prestige (HPA011765)	ICC : 1/200 WB : 1/250
Anti-PSD95	Souris	Neuromab (75-028)	ICC : 1/500 WB : 1/10 000
Anti-GAPDH	Lapin	Sigma (G9545)	1/10 000
Anti-SUMO1	Souris	Laboratoire	Surnageant de culture
Anti-SUMO2	Souris	Laboratoire	Surnageant de culture
Anti-Homer1	Lapin	Synaptic System (160 003)	1/1 000
Anti-Synapsin 1a/b	Souris	Santa Cruz (sc-376623)	1/1 000
Anti-NOPP140	Souris	Santa Cruz (sc-374033)	1/700
Anti-Coillin	Lapin	Santa Cruz (sc-32860)	1/500
Anti- GM130	Lapin	BD (610823)	1/500
Anti- ERK1/2	Lapin	Cell Signaling (4695S)	1/1000
Anti-Phospho ERK1/2	Lapin	Cell Signaling (4370S)	1/2000
Anti-MAP2	Cochon d'inde	Synaptic Systems (188004)	ICC : 1/1000

Tableau 5. Anticorps utilisés lors de l'étude de la régulation de SEN1 à la synapse.

Imagerie dynamique

La vidéo microscopie par disque tournant (Spinning disk microscopy) est une technique qui permet d'évaluer le comportement dynamique cellulaire en temps réel en diminuant la phototoxicité. Les données en deux dimensions sont collectées de manière répétée à des intervalles de temps distincts et sont assemblées pour donner une vidéo en temps réel. L'acquisition des images a été réalisée sur un microscope à disque tournant (Perkin Elmer) avec un objectif 60X (1.4 NA). La fluorescence est mesurée au cours du temps en utilisant le logiciel Volocity 6.3. Les variations d'intensité de la fluorescence au niveau des épines dendritiques et au niveau des dendrites ont été analysées avec le logiciel Fiji.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9. Les données calculées sont exprimées sous la forme moyenne \pm s.e.m. Un test ANOVA (Ordinary One-way) avec un test post hoc de Tukey (Fig. 18C, 19C, 20C, 22C, 23C, 24C, 25C-E) et un test de comparaison multiple Kruskal-Wallis (Fig. 26B) ont été réalisés pour comparer les médianes d'ensemble multiple de données. Un test T non apparié (Fig. 21B) et Ratio t-test (Fig.28B) ont été réalisés pour comparer les médianes de deux ensembles de données. La normalité pour tous les groupes a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

Résultats

La dynamique de régulation de la redistribution protéique à la synapse pendant la maturation neuronale ou la dépolarisation par KCl a été observé pour les enzymes Ubc9 et SENP1 mais aussi pour d'autres membres de la machinerie de SUMOylation (Loriol et al, 2012 ; Loriol et al, 2013). Ces résultats suggèrent un rôle du processus de SUMOylation dans les fonctions synaptiques ce qui a été largement documenté dans plusieurs études (pour des revues récentes, voir Schorova and Martin, 2016 ; Henley 2020). Comme décrit précédemment, la redistribution d'Ubc9 synaptique en réponse à l'activité neuronale est régulée via la cascade de signalisation mGlu5R/PLC/PKC (Loriol et al, 2014). La SUMOylation est un processus reposant sur un équilibre dynamique, c'est-à-dire que SUMOylation et désSUMOylation ont lieu de manière coordonnée dans le temps et dans l'espace. Il est donc important de comprendre les mécanismes moléculaires qui conduisent à la redistribution des enzymes de désSUMOylation présente à la synapse. Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à l'une d'entre elles, SENP1, désSUMOylase présente à la synapse.

1- La redistribution synaptique de SENP1 est régulée par l'activation des récepteurs mGlu5R et a des effets sur les niveaux de SUMOylation à la postsynapse.

A mon arrivée au laboratoire, j'ai collaboré avec Lenka Schorova, alors étudiante en 3^{ème} année de thèse, dans le but de montrer l'implication des récepteurs mGlu5R dans la régulation synaptique de la diffusion de SENP1 synaptique (Schorova *et al.*, 2019, **Annexe 2**).

Afin d'étudier la dynamique de trafic de l'enzyme de désSUMOylation SENP1, nous avons réalisé des transductions de neurones hippocampiques de rat permettant l'expression de SENP1 fusionnée à la GFP et effectué des expériences de FRAP synaptique pour suivre en temps réel la dynamique de diffusion de SENP1 à la synapse. Dans ces expériences de FRAP, le photoblanchiment de la fluorescence au niveau de l'épine dendritique permet de visualiser le retour de la fluorescence et ainsi, de déterminer les propriétés de diffusion de GFP-SENP1 entre la dendrite et la synapse. Ceci permet de caractériser des propriétés de diffusion comme la fraction mobile (F_m) de l'enzyme, son temps de demi-recouvrement ($t_{1/2}$) et de calculer son coefficient de diffusion qui reflète la vitesse de l'évènement. Nous avons montré que les récepteurs métabotropiques du groupe I, mGlu1R/5, étaient impliqués dans la redistribution de SENP1 à la synapse. Pour cela, nous avons utilisé un agoniste de ces récepteurs et mesurer l'effet de cette activation sur les paramètres de diffusion synaptique de GFP-SENP1. Nous avons montré qu'une stimulation prolongée (>25min) des mGlu1R/5 entraîne une diminution de la fraction mobile de SENP1 et du coefficient de diffusion et une augmentation significative du temps de demi-recouvrement (Schorova *et al.*, 2019 ; **Annexe 2**). Ces résultats indiquent que l'activation

des récepteurs mGlu1/5 est essentielle pour réguler la diffusion et la rétention de SENP1 dans les épines dendritiques.

Nous avons par ailleurs validé biochimiquement ces résultats en étudiant les niveaux de protéine SENP1 endogène à la synapse par immunocytochimie ou par fractionnement subcellulaire pour isoler la postsynapse et nous avons ainsi montré que l'activation des mGlu1R/5 régule les niveaux de SENP1 endogène à la postsynapse (Schorova *et al.*, 2019 ; **Annexe 2**).

Afin d'identifier les récepteurs métabotropiques du groupe I impliqués dans la régulation de la diffusion de SENP1 à la synapse, nous avons utilisé un antagoniste spécifique de mGlu5R, le MPEP, et montré dans des expériences de FRAP synaptique que la diminution de la diffusion synaptique de GFP-SENP1 en présence de l'agoniste DHPG est abolie quand les neurones sont préincubés avec le MPEP (Schorova *et al.*, 2019 ; Annexe 2). Cela révèle l'implication spécifique de l'activation de mGlu5R dans la régulation de la diffusion de SENP1 à la synapse.

Une activation brève des récepteurs mGlu5R piège transitoirement Ubc9 à la postsynapse, ce qui entraîne une augmentation rapide de la SUMOylation synaptique globale et des changements dans l'excitabilité neuronale. L'activation prolongée (>25min) des mGlu5R entraîne une accumulation postsynaptique de SENP1 et a pour conséquence de diminuer la SUMOylation synaptique et ainsi que de restaurer la SUMOylation synaptique vers son état initial. L'ensemble de ces résultats indique une régulation homéostatique dirigée par mGlu5R de la

SUMOylation synaptique (Fig. 17).

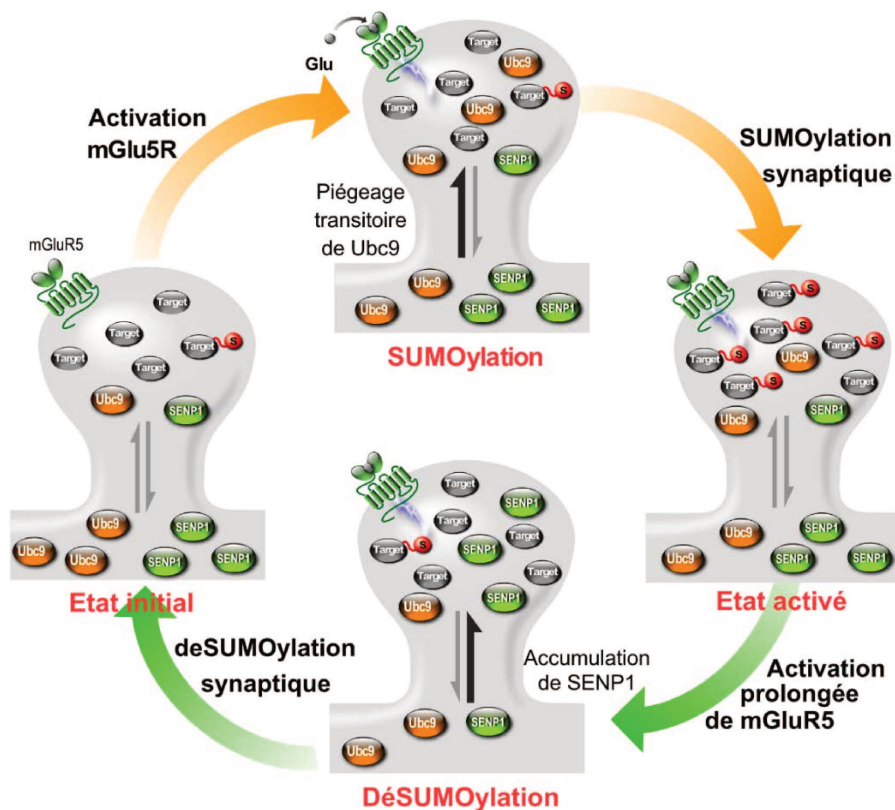


Figure 17. Schéma de la régulation synaptique des enzymes de la voie de SUMOylation par les mGlu5R D'après Schorova *et al.*, 2019.

2- Les récepteurs mGlu1R participe à la régulation de l'accumulation de SENP1 à la postsynapse.

Les récepteurs métabotropiques du groupe I comprennent les récepteurs mGlu1 et mGlu5. Dans les précédents travaux du laboratoire, nous nous sommes exclusivement focalisés sur le rôle des récepteurs mGlu5 dans la régulation du processus de SUMOylation. Cependant, rien n'est connu sur la contribution des récepteurs mGlu1 dans la régulation de la balance SUMO/désSUMOylation. Mon projet de thèse a eu pour but d'étudier l'implication de mGlu1R dans l'homéostasie de la SUMOylation synaptique.

J'ai tout d'abord cherché à visualiser la redistribution de SENP1 à la synapse en utilisant une technique d'imagerie dynamique en temps réel. J'ai utilisé le DHPG comme précédemment pour activer les mGlu1R/5, et réalisé des enregistrements de vidéomicroscopie en temps réel sur des neurones primaires d'hippocampe de rat exprimant GFP-SENP1 en culture (Fig. 18). Comme attendu, une activation prolongée des récepteurs mGlu1/5 entraîne une augmentation de la fluorescence de GFP-SENP1 à la postsynapse au cours du temps avec un plateau atteint après 35 min de traitement (augmentation significative d'environ 10% par rapport au niveau de fluorescence initial avec une diminution concomittante de la fluorescence dans la dendrite (Fig. 18B-C). L'accumulation de la fluorescence de GFP-SENP1 dans les épines dendritiques est en partie réversible (Fig. 18B-C). Pour vérifier que la redistribution de GFP-SENP1 dans les épines est due à la stimulation synaptique, les neurones ont été enregistrés pendant 75 min en absence de stimulation, sans effet notable sur les niveaux synaptiques GFP-SENP1 synaptiques (Fig. 18D-E).

De manière intéressante, les récepteurs mGlu1 et mGlu5 sont constitutivement actifs (Hu *et al.*, 2010). Pour évaluer le rôle de l'activité constitutive de mGlu1R dans la redistribution de SENP1, j'ai utilisé l'antagoniste sélectif des mGlu1R, le JNJ 16259685 (JNJ). Ce composé est un antagoniste non-compétitif des mGlu1R qui inhibe la mobilisation du Ca^{2+} induit par le glutamate (Lavreysen et al, 2004). L'application de JNJ seule affecte significativement la redistribution de SENP1 à la synapse puisque la dynamique de GFP-SENP1 est similaire à celle obtenue en condition stimulé par DHPG (Fig. 18B-C et Fig. 19B-C). L'accumulation de GFP-SENP1 dans les épines dendritiques après le traitement JNJ est peu réversible, probablement à cause de la forte affinité du JNJ pour les mGlu1R ($K_i = 0.34$ nM) ou par l'induction de changements structuraux lors du traitement prolongé des neurones au JNJ (Fig. 19). Ces résultats suggèrent que l'activité constitutive de mGlu1R participe au maintien d'un niveau basal de SENP1 à la synapse.

Pour déterminer si l'activation des mGlu1R participe à la redistribution synaptique de SENP1 dépendant de l'activité, les neurones ont été préincubés avec le JNJ pendant 10min puis les mGluRs de groupe I ont été activés à l'aide du DHPG (Fig. 20A). La pré-incubation des neurones avec le JNJ préalablement à la stimulation des mGlu1R/5 par le DHPG entraîne une accumulation accrue et plus rapide de GFP-SENP1 à la synapse.

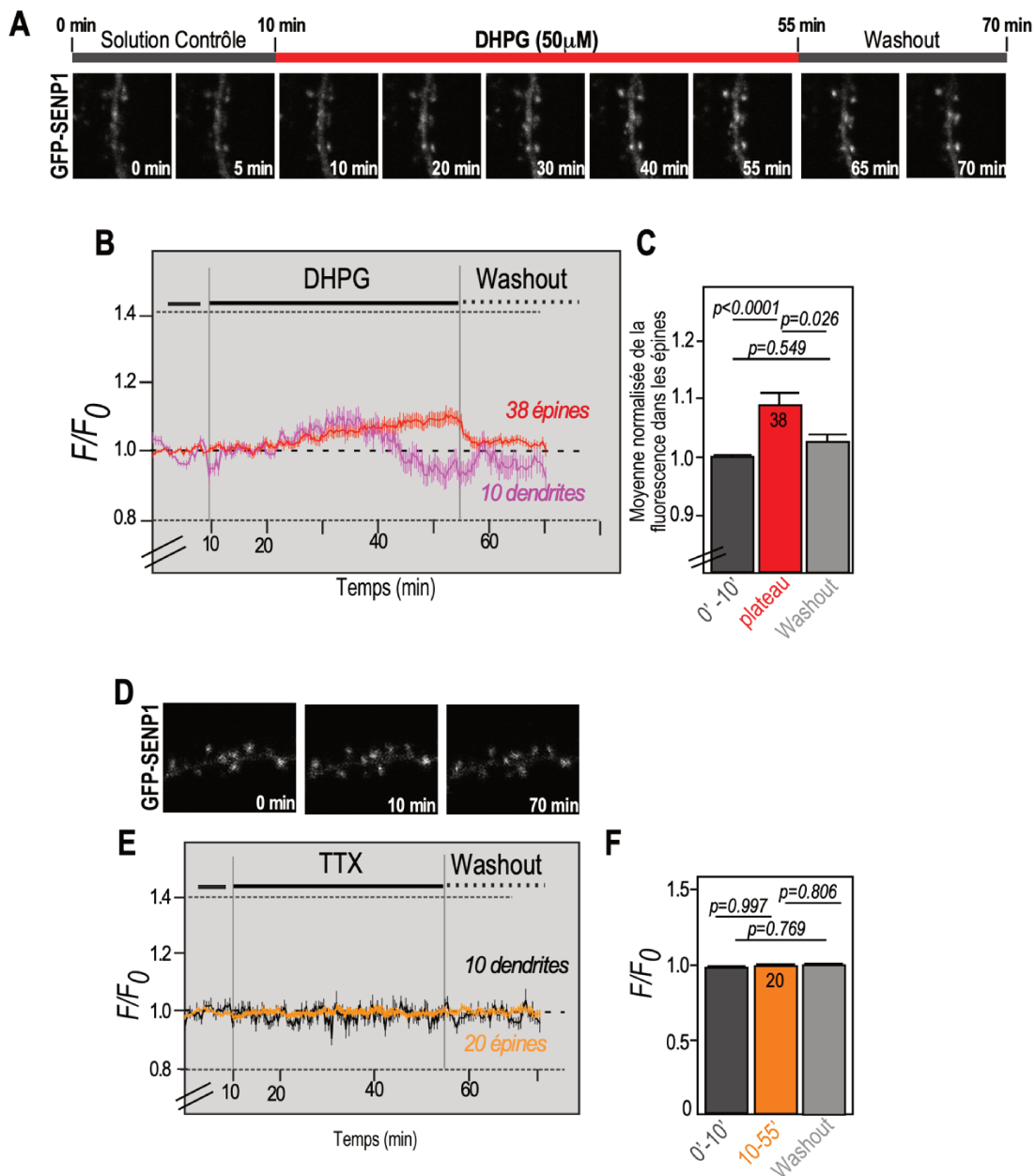


Figure 18. La redistribution de GFP-SEN1 dans les épines dendritiques est dépendante de l'activation des mGlu1R/5.

Les neurones sont incubés à 37°C dans un tampon Earle contenant 0,5 μM de TTX pour réduire l'activité spontanée pendant 5 min avant de commencer l'enregistrement. Les neurones sont ensuite imagés pendant 10 min dans une solution contrôlée (solution de Earle + 0,5 μM de TTX) puis en présence de 50 μM de DHPG pendant 45 min. Les neurones sont ensuite rincés avec la solution contrôlée. Images confocales représentatives de l'enregistrement en temps réel d'un neurone hippocampique de rat exprimant GFP-SEN1 en présence de DHPG (A) ou en condition basale (D) (segment de dendrites secondaires avec des épines montrées ici). Courbes des variations de l'intensité de GFP SEN1 dans les épines en fonction du temps en présence de DHPG (B; n=38 épines, n= 10 dendrites ; N= 2 cultures) ou en condition basale (D; n=20 épines, n= 10 dendrites ; N= 2 cultures). C Représentation graphique de la moyenne normalisée (\pm SEM) de la fluorescence de GFP-SEN1 dans 38 épines avant le traitement au DHPG (0-10 min : $1,002 \pm 0,0028$), au pic de fluorescence pendant le traitement avec le DHPG (45-55 min : $1,091 \pm 0,020$) et lors du lavage avec la solution contrôlée (55-75 min : $1,028 \pm 0,0104$). F Représentation graphique de la moyenne normalisée (\pm SEM) de la fluorescence de GFP-SEN1 dans 20 épines pendant les 10 premières minutes (0-10 min : $0,999 \pm 0,0005$), le reste du traitement (10-55 min : $0,999 \pm 0,006$) et le washout ($1,004 \pm 0,008$). Test statistique: Ordinary parametric One-way ANOVA avec un test post hoc de Tukey. Les p-values sont indiquées sur le graphique.

On peut mesurer une accumulation d'environ 30% de GFP- SENP1 dans les épines après un traitement prolongé (35-45min) avec une diminution concomitante de la fluorescence dans les dendrites (Fig. 20B). Au bout de 45min en présence de DHPG, le plateau ne semble toujours pas être atteint. L'ensemble de ces données indique que mGlu1R participe activement à la régulation de la dynamique de SENP1 à la synapse. Ces résultats suggèrent que les récepteurs mGluRs du groupe I régulent l'accumulation synaptique de SENP1 de manière opposée.

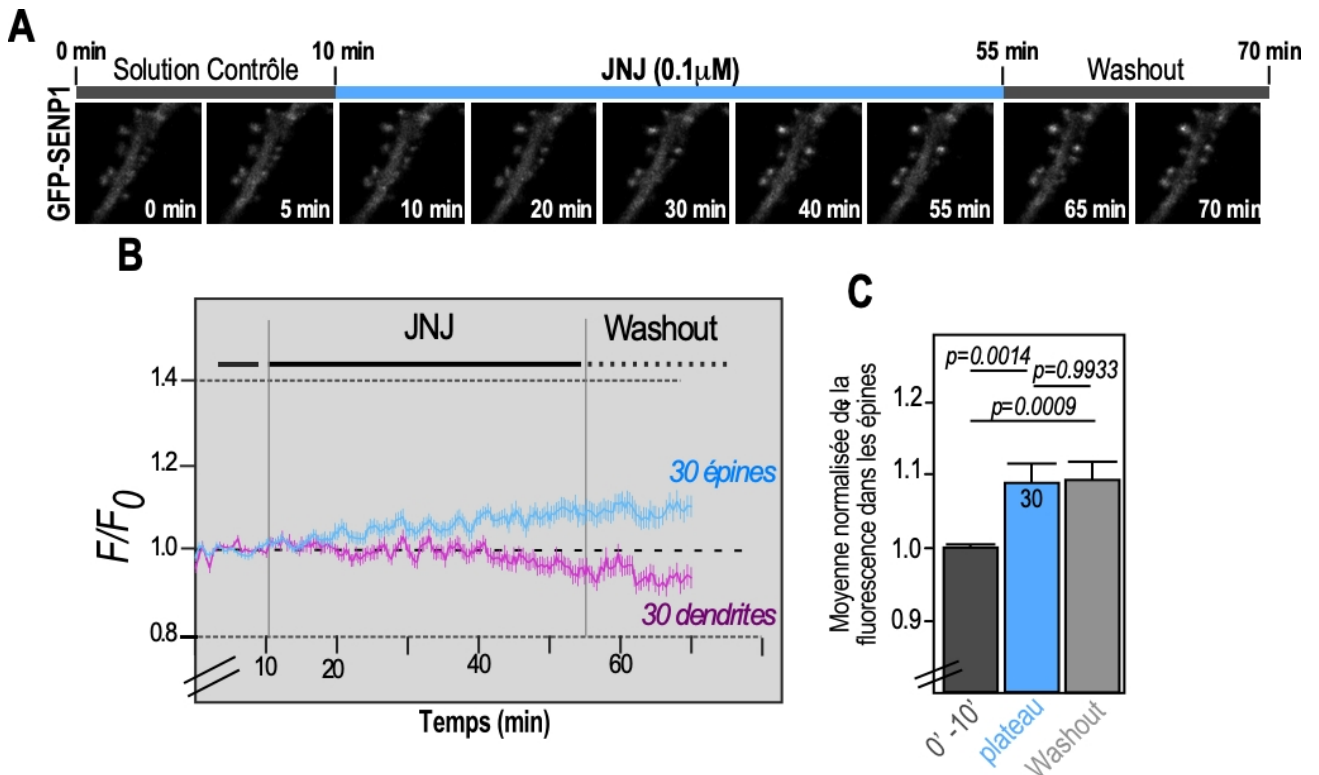


Figure 19. L'activité constitutive de mGlu1R régule la redistribution de GFP-SENP1 dans les épines dendritiques. Les expériences d'imagerie en temps réel ont été réalisées en présence de JNJ (0,1 μ M) dans la solution contrôlée (solution de Earle + 0,5 μ M de TTX). **A** Images confocales représentatives de l'enregistrement en temps réel d'un neurone hippocampique de rat exprimant GFP-SENP1 (segment de dendrites secondaires avec des épines montrées ici). **B** Courbes des variations de l'intensité de GFP SENP1 dans les épines en fonction du temps (n=28 épines, n= 30 dendrites ; N= 2 cultures). **C** Représentation graphique de la moyenne normalisée de la fluorescence de GFP-SENP1 dans 13 épines avant le traitement au DHPG (0-10 min : 1,000 \pm 5^e-6), au pic de fluorescence pendant le traitement avec le JNJ (45-55 min : 1,109 \pm 0,030) et lors du lavage avec la solution contrôlée (55-75 min : 1,128 \pm 0,036). Test statistique: Ordinary parametric Oneway ANOVA avec un test post hoc de Tukey. Les p-values sont indiquées sur le graphique.

Pour étudier les voies de signalisation en aval des mGluRs et les effets de la combinaison des différents antagonistes de mGlu1R ou de mGlu5R et du DHPG sur la régulation la phosphorylation de ERK1/2, j'ai traité les cultures de neurones corticaux à 17 JIV avec les différentes drogues (Fig. 21). Comme attendu, l'activation des mGlu1R/5 par le DHPG entraîne une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 qui est bloquée par l'inhibiteur, PD98059, la phosphorylation de ERK1/2 par l'activation des récepteurs mGluRs (Fig. 21 ; DHPG : 1,78 \pm 0,29 ; PD98059+DHPG : 1,11 \pm 0,14).

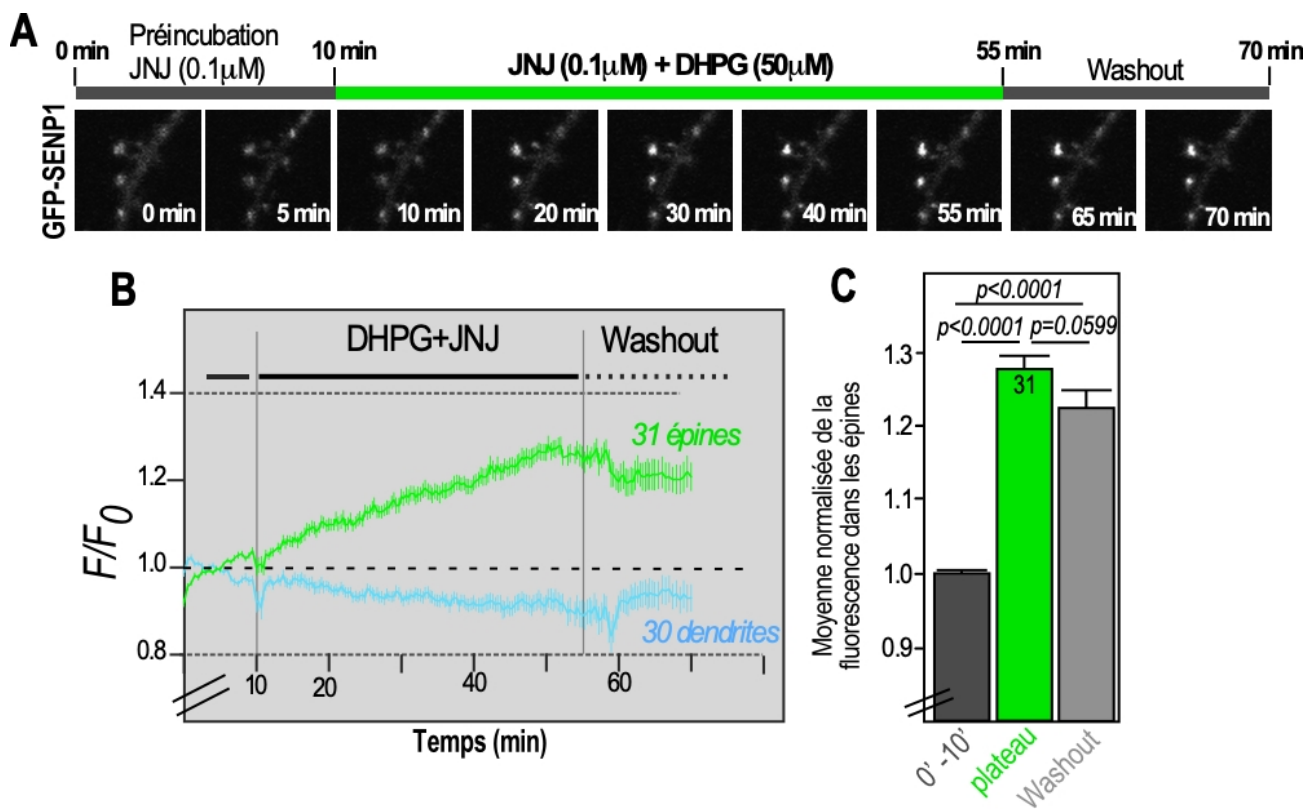


Figure 20. L'activation des récepteurs *mGlu1R* régule la redistribution de *GFP-SEN1* dans les synapses.

Les expériences d'imagerie en temps réel ont été réalisées en présence de JNJ ($0,1 \mu\text{M}$) pendant 10 min puis en présence de DHPG ($50 \mu\text{M}$) pendant 45 min suivi d'un lavage dans la solution contrôlée. **A.** Imagerie confocales représentatives de l'enregistrement en temps réel d'un neurone hippocampique de rat exprimant *GFP-SEN1* (segment de dendrites secondaires avec des épines montrées ici). **B.** Courbe représentative des variations de l'intensité de *GFP-SEN1* dans les épines en fonction du temps ($n=35$ épines, $n=30$ dendrites ; $N=3$ cultures). **C.** Représentation graphique de la moyenne normalisée de la fluorescence de *GFP-SEN1* dans 20 épines avant le traitement au DHPG ($0-10$ min : $1,000 \pm 0,0003$), au pic de fluorescence pendant le traitement ($45-55$ min : $1,184 \pm 0,021$) et lors du lavage avec la solution contrôlée ($55-75$ min : $1,181 \pm 0,022$). Test statistique: Ordinary One-way ANOVA avec un test post hoc de Tukey. Les *p*-values sont indiquées sur le graphique.

Alors que l'inhibition de l'activation de *mGlu5R* n'entraîne pas d'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2, on peut voir que l'inhibition de l'activation de *mGlu1R* par le JNJ entraîne une augmentation plus importante de la phosphorylation de ERK1/2 (Fig. 21 ; Contrôle : 1 ; DHPG : $1,78 \pm 0,29$; JNJ+DHPG : $2,04 \pm 0,40$; MPEP+DHPG : $0,88 \pm 0,20$).

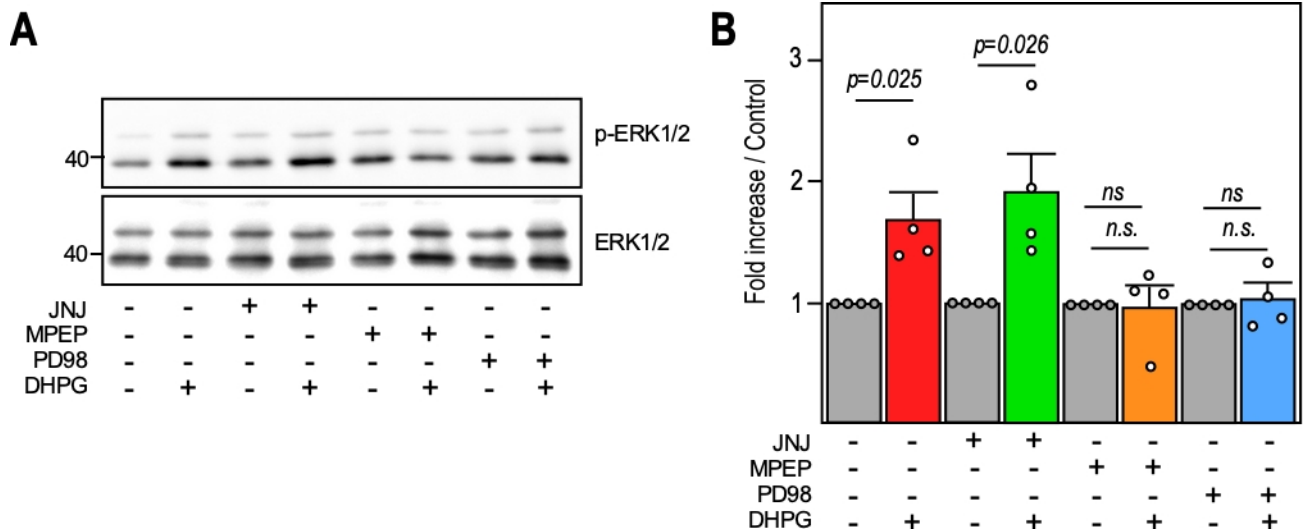


Figure 21. Effets des différents agonistes sur la phosphorylation de ERK1/2.

A Immunoblot anti-phospho ERK et anti-ERK total et **B** Quantification de lysats de neurones corticaux JIV17 traité par les antagonistes des récepteurs mGlu1R JNJ (0,1 μ M), mGlu5R MPEP (33 μ M) ou de ERK, PD98059 (1 μ M) pendant 10 min en présence ou absence de DHPG (100 μ M) pendant 10 min. Immunomarquage de p-ERK et ERK. N=4 pour chaque condition. Test statistique : Test- t non apparié.

3- L'activation de kinases PKC et CaMKII, mais pas de la PKA, sont des prérequis pour l'accumulation de SENP1 à la synapse.

La stimulation des récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe I conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation. Ces récepteurs sont couplés aux protéines $G\alpha_q$ qui activent la phospholipase C conduisant à la formation de DAG et IP3. Ceci permet l'activation d'une myriade de kinases comme la PKC et la CaMKII et la PKA. De manière intéressante, mon laboratoire a précédemment démontré que l'enzyme de conjugaison Ubc9, est régulée par la stimulation des mGlu5R via l'activation de la cascade PLC/PKC, ce qui conduit à la rétention transitoire d'Ubc9 au niveau de la postsynapse (Loriol *et al.*, 2014).

Pour disséquer la cascade de signalisation impliquée dans l'adressage de SENP1 à la synapse, nous avons réalisé des expériences d'imagerie en temps réel en utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces différentes voies. Une activation prolongée des mGlu1R/5 par le DHPG (45 min) est nécessaire pour visualiser une accumulation de SENP1 à la postsynapse et ainsi étudier les effets des acteurs de la voie de signalisation sur l'adressage synaptique de SENP1. Cependant, les acteurs ciblés sont impliqués dans différentes voies de signalisation neuronales et une exposition longue (pré-incubation de 10 min et activation par DHPG pendant 45 min soit au total 55 min) à un inhibiteur peut conduire à des effets délétères sur la survie neuronale. Pour pallier ces effets délétères potentiels, nous avons inhibé mGlu1R par le JNJ en activant concomitamment mGlu1R/5 par le DHPG. Ceci entraîne une accumulation synaptique de SENP1 d'environ 20% après 25 min alors qu'un traitement au DHPG seul conduit à une augmentation de la fluorescence GFP-SENP1 de moins de 5% (Fig. 18). La combinaison

JNJ/DHPG permet donc de réduire le temps d'exposition aux inhibiteurs à 35 min au lieu de 55 min initialement, permettant ainsi de mesurer les effets des inhibiteurs sur la redistribution de SENP1 à la synapse.

La PKC a déjà été montré comme étant impliquée dans la régulation de la diffusion de l'enzyme de SUMOylation Ubc9. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'en plus d'être la cible de SENP1 (Sun *et al.*, 2014), la PKC pourrait à son tour réguler l'accumulation de SENP1 à la synapse. Pour déterminer si cette accumulation de SENP1 synaptique est affectée par l'inhibition de la PKC, j'ai enregistré des neurones exprimant GFP-SENP1 lors de l'activation des récepteurs mGlu5R en présence de l'inhibiteur spécifique de la PKC (Fig. 22A). L'inhibition de la PKC par la chelerythrine avant l'activation des récepteurs mGlu1/5 bloque l'accumulation synaptique de SENP1 (Fig. 22B-C, F/F0 [15-25min] ; Contrôle JNJ+Chel : $1,028 \pm 0,0184$; JNJ+DHPG $1,152 \pm 0,011$; Chel+JNJ+DHPG : $1,001 \pm 0,016$). Ces résultats indiquent que l'activation de la PKC est requise pour l'accumulation synaptique de SENP1 en réponse à la stimulation de mGlu5R.

La CaMKII est une enzyme essentielle de la synapse et essentielle pour la transmission et la plasticité synaptique (Zalcman *et al.*, 2018). Pour déterminer si l'inhibition de la CaMKII affecte l'accumulation synaptique de SENP1, j'ai réalisé de l'imagerie en temps réel comme précédemment en utilisant le composé KN93, un inhibiteur spécifique de la CaMKII (Fig. 23A). La préincubation avec l'inhibiteur préalablement à l'activation des récepteurs mGlu5 bloque l'accumulation synaptique de SENP1 (Fig. 23B-C, F/F0 [15-25min] ; JNJ +KN93= $0,9892 \pm 0,0123$, KN93+JNJ+DHPG = $1,016 \pm 0,011$, JNJ+DHPG = $1,152 \pm 0,011$). Ces données démontrent l'implication centrale de l'activation de la CaMKII dans l'adressage synaptique de SENP1 en condition de stimulation des mGluRs.

La PKA est une enzyme impliquée dans de nombreux processus physiologiques (Castro *et al.*, 2016). Pour déterminer si l'inhibition de PKA affecte l'accumulation synaptique de SENP1, j'ai mesuré la relocalisation synaptique de GFP-SENP1 comme précédemment en présence de H89, un inhibiteur de PKA (Fig. 24). La pré incubation avec l'inhibiteur suivie de l'activation des récepteurs mGlu5 n'a aucun effet sur l'accumulation synaptique de SENP1 par rapport à la condition JNJ +DHPG (Fig. 24C-D, F/F0 [15-25 min] ; JNJ + H89 = $0,9706 \pm 0,023$, H89+JNJ+DHPG = $1,068 \pm 0,014$, JNJ+DHPG = $1,07 \pm 0,016$). Ces données démontrent que l'activation de la PKA n'est pas un prérequis pour l'adressage synaptique de SENP1.

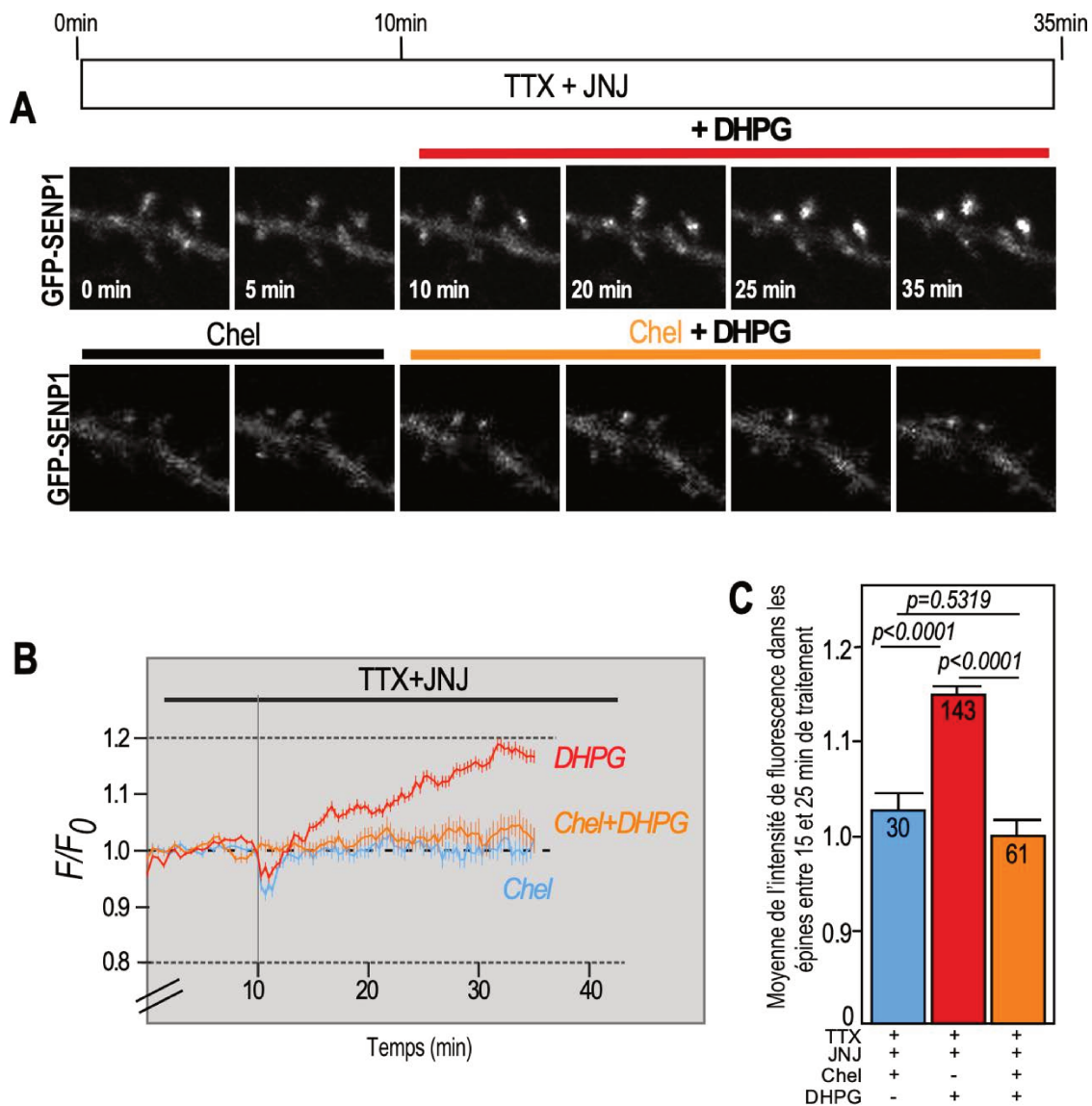


Figure 22. L'activation de la PKC est requise pour la relocalisation de GFP-SEN1 à la postsynapse.

A Les expériences d'imagerie en temps réel ont été réalisées avec une préincubation de 10 min avec JNJ (0,1 μ M) en présence ou non de l'inhibiteur de la PKC, la chelerythrine (33 μ M) suivi de l'ajout de DHPG (50 μ M) dans le milieu. Images confocales représentatives de l'enregistrement en temps réel d'un neurone hippocampique de rat exprimant GFP-SEN1 (segment de dendrites secondaires avec des épines montrées ici). **B** Courbes des variations moyennes normalisées de l'intensité de fluorescence de GFP SEN1 dans les épines en fonction du temps (JNJ+Chel : 30 épines ; JNJ+ DHPG : 143 épines ; Chel+JNJ+DHPG : 61 épines ; N= 3 cultures). **C** Représentation graphique de la moyenne normalisée de la fluorescence de GFP-SEN1 après 25 min de traitement avec le DHPG (F/F_0 35-45 min ; JNJ+Chel : $1,028 \pm 0,0184$, JNJ+DHPG : $1,152 \pm 0,011$, Chel+JNJ+DHPG : $1,001 \pm 0,016$). Test statistique : Ordinary One way ANOVA. Les p-values sont indiquées sur le graphique.

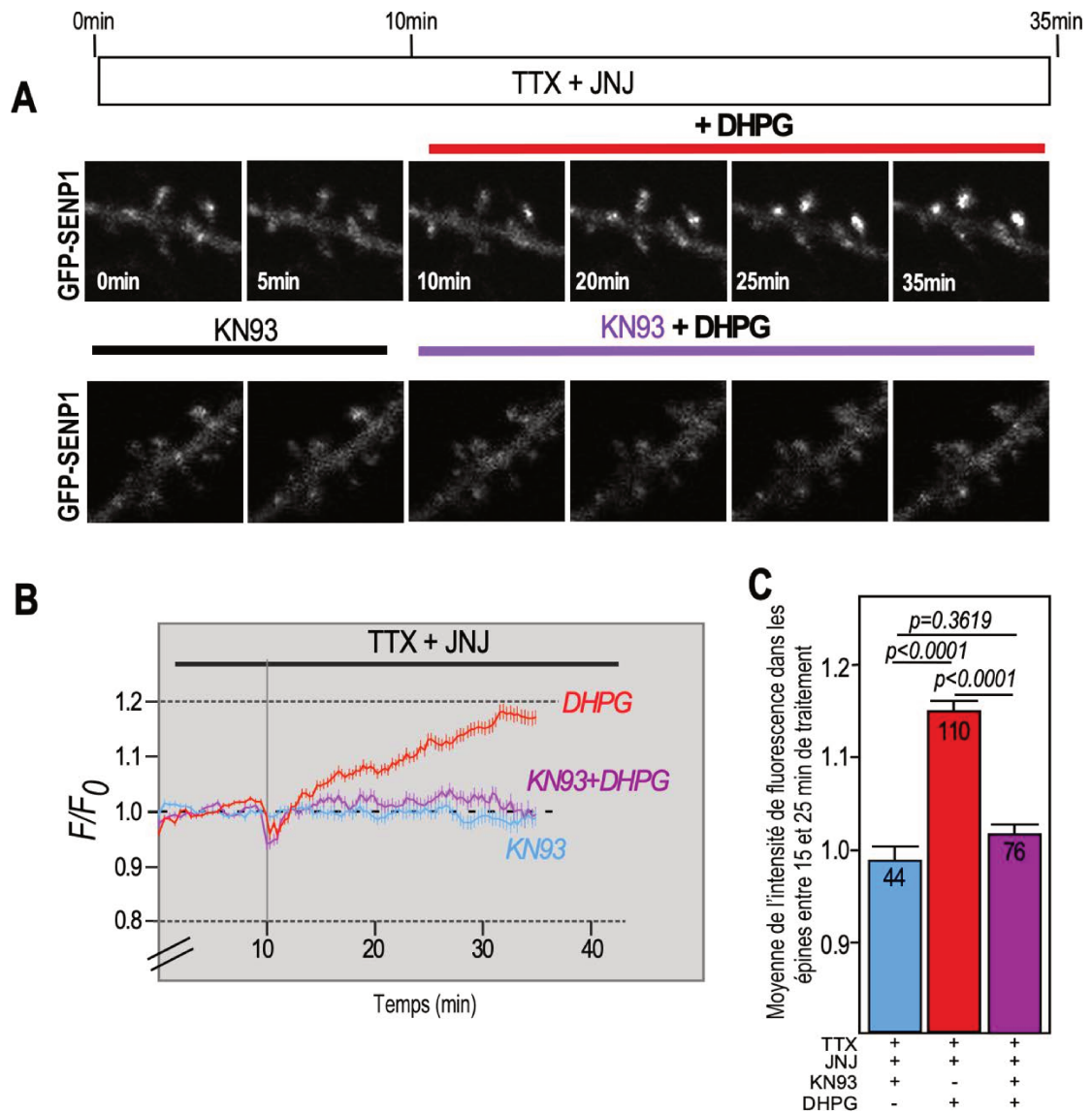


Figure 23. L'activation de la CaMKII est requise pour la diffusion de GFP-SEN1 à la postsynapse.

A Les expériences d'imagerie en temps réel ont été réalisées avec une préincubation de 10 min avec JNJ (0,1 μ M) en présence ou en absence de l'inhibiteur CaMKII, le KN93 (1 μ M) suivi de l'ajout de DHPG (50 μ M) dans le milieu. Images confocales représentatives de l'enregistrement en temps réel d'un neurone hippocampique de rat exprimant la GFP-SEN1 (segment de dendrites secondaires avec des épines montrées ici). **B** Courbes des variations moyenne normalisée de l'intensité de fluorescence de GFP-SEN1 dans les épines en fonction du temps (JNJ+KN93 : 44 épines ; JNJ+ DHPG : 110 épines ; KN93+JNJ+DHPG : 76 épines ; N= 3 cultures). **C** Représentation graphique de la moyenne normalisée de la fluorescence de GFP-SEN1 après 15min de traitement avec le DHPG (F/F0 25-35 min ; JNJ +KN93 : 0,9892 \pm 0,0123, JNJ+DHPG : 1,152 \pm 0,0112, KN93+JNJ+DHPG : 1,016 \pm 0,011). Test statistique : Ordinary One way ANOVA. Les p-values sont indiquées sur le graphique.

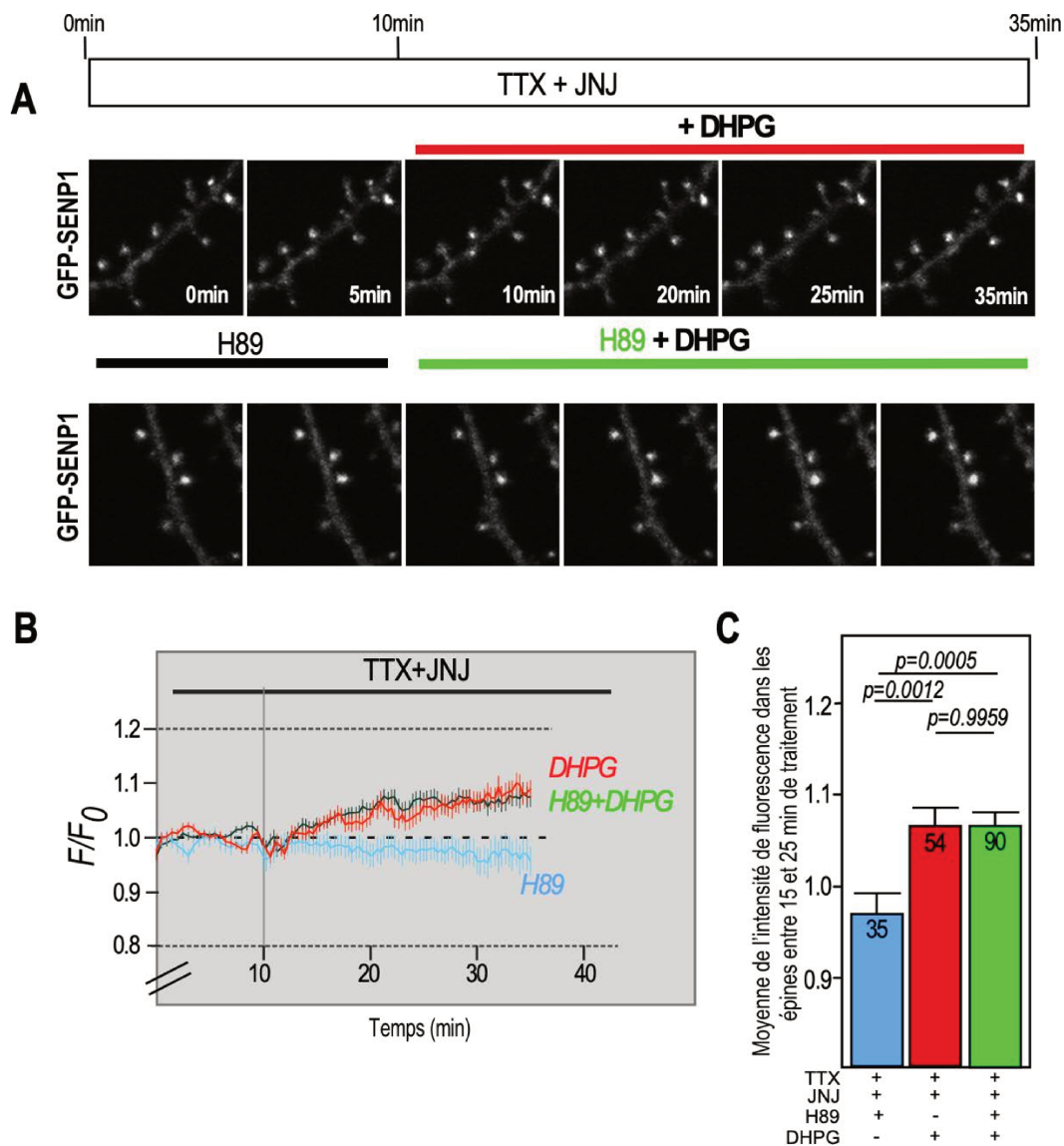


Figure 24. L'activation de PKA n'est pas requise pour la redistribution de GFP-SEN1 dans la synapse.

A Les expériences d'imagerie en temps réel ont été réalisées avec une préincubation de 10 min avec JNJ (0,1 μ M) en présence ou non de l'inhibiteur de la CaMKII, H89 (10 μ M) suivi de l'ajout de DHPG (50 μ M) dans le milieu. Images confocales représentatives de l'enregistrement en temps réel d'un neurone hippocampique de rat exprimant GFP-SEN1 (segment de dendrites secondaires avec des épines montrées ici). **B** Courbe représentative des variations moyenne normalisée de l'intensité de fluorescence de GFP SEN1 dans les épines en fonction du temps. (JNJ+H89 : 35 épines ; JNJ+ DHPG : 54 épines ; H89+JNJ+DHPG : 90 épines ; N= 2 cultures). **C** Représentation graphique de la moyenne normalisée de la fluorescence de GFP-SEN1 après 15min de traitement avec le DHPG (F/F₀ 25-35 min ; JNJ+H89 : 0,9706 \pm 0,023 , JNJ+DHPG: 1,07 \pm 0,016, H89+JNJ+DHPG : 1,068 \pm 0,014) . Test statistique : Ordinary One way ANOVA. Les p-values sont indiquées sur le graphique.

4- L'accumulation synaptique de SENP1 est dépendante des microtubules.

L'accumulation de SENP1 à la postsynapse est le résultat du trafic et de la diffusion des protéines présentes le long de dendrite même si la traduction locale de SENP1 pourrait également avoir lieu directement à la

postsynapse. La diffusion de SENP1 entre l'épine dendritique et la dendrite est régulée sur une échelle de temps de l'ordre de la dizaine de secondes (Schorova *et al.*, 2019). Compte-tenu de sa taille (70kDa), l'adressage de SENP1 dans l'épine dendritique fait probablement intervenir des liaisons transitoires à des moteurs moléculaires. Je me suis donc intéressée à la possibilité que l'adressage de SENP1 à la postsynapse implique les microtubules. Les microtubules ne pénètrent que rarement dans les épines dendritiques et s'arrêtent généralement à la base du cou des épines. De plus, les récepteurs mGlu1 sont étroitement liés à la formation des microtubules car leur activation inhibe la capacité des Microtubule-Associated Proteins (MAPs) à promouvoir la polymérisation de la tubuline (Huang and Hampson, 2000). Comme la redistribution de SENP1 vers l'épine dendritique est notamment régulée par l'activité des mGlu1R, nous voulions examiner le rôle des microtubules dans l'adressage de l'enzyme à la synapse.

Nous avons réalisé des expériences d'imagerie en temps réel sur des neurones hippocampiques de rat exprimant GFP-SENP1 pendant un traitement de 40 min avec du Nocodazole (33 μ M), un puissant agent pharmacologique qui déstabilise les microtubules en interférant avec leur polymérisation, ou en présence de Taxol (0,5 μ M), qui a pour effet de favoriser la polymérisation des microtubules en interférant avec leur dépolymérisation (Baas and Ahmad, 2013; [Fig. 25A](#)). Les effets observés en présence de Nocodazole seul sont similaires à ceux observés lors du traitement JNJ+DHPG ([Fig. 25B](#)). De manière intéressante, les effets sont similaires en présence de Taxol et en présence de Nocodazole ([Fig 25B-C](#)). Conjointement, ces données montrent que la poly/dépolymérisation des microtubules est impliquée dans le trafic synapto-dendritique de GFP-SENP1.

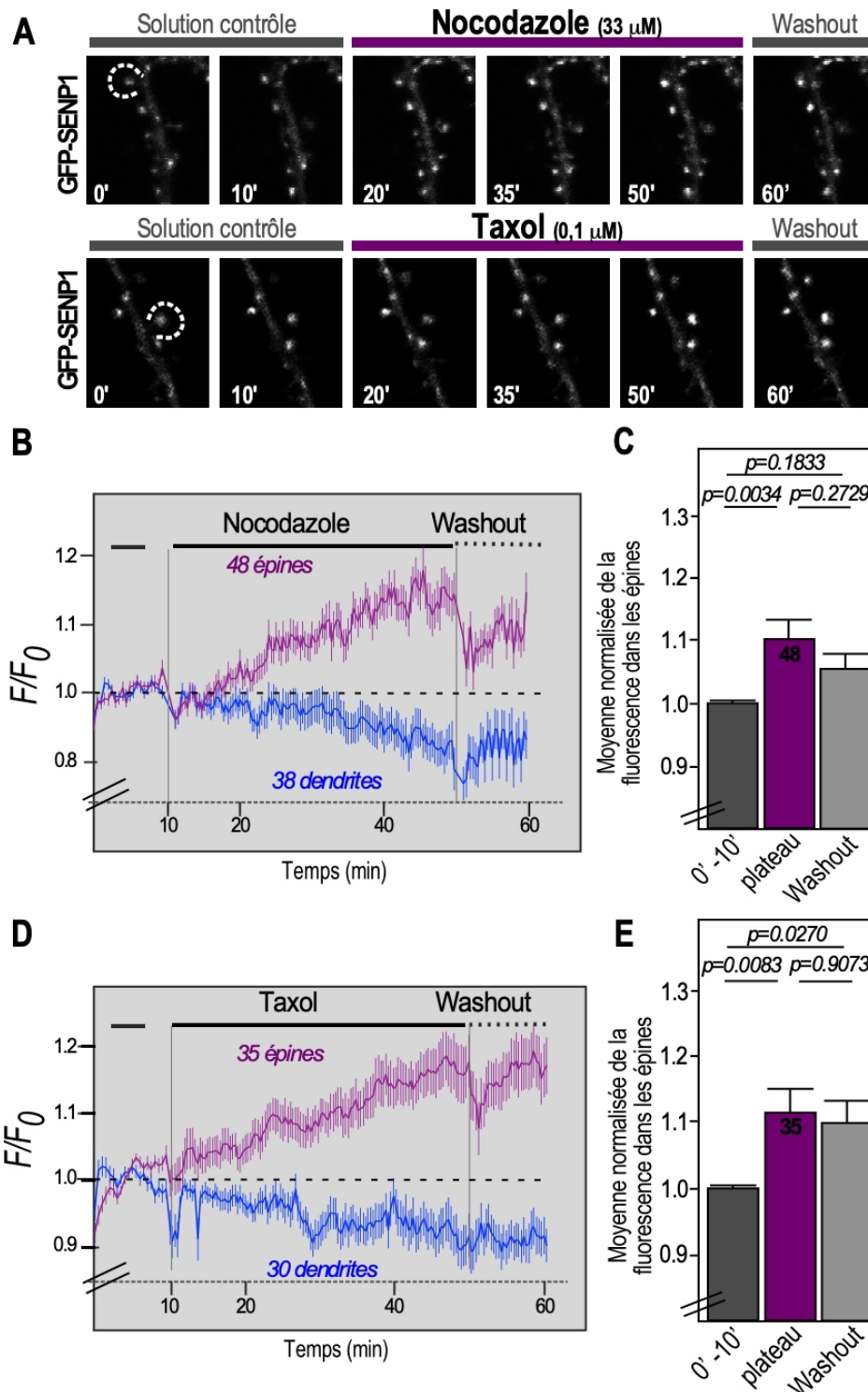


Figure 25. La dynamique des microtubules est impliquée dans la diffusion de GFP-SEN1 à la synapse.

A Images représentatives d'un neurone exprimant GFP-SEN1 pendant une expérience d'imagerie en temps réel réalisée en présence de Nocodazole (panneau du haut) ou taxol (panneau du bas). B, D Courbe représentative des variations moyenne normalisée de l'intensité de fluorescence de GFP SEN1 dans les épines en fonction du temps. (B : Nocodazole ; n= 48 épines et 38 dendrites ; D : Taxol ; n= 35 épines et 30 dendrites). C, E. Représentation graphique de la moyenne normalisée de la fluorescence de GFP-SEN1 en condition contrôle, au plateau et lors du washout (C Nocodazole : plateau: $1,104 \pm 0,029$, washout : $1,056 \pm 0,024$ / E Taxol : plateau: $1,115 \pm 0,033$, washout : $1,099 \pm 0,032$). Test statistique : Ordinary One way ANOVA. Les p-values sont indiquées sur le graphique.

5- Les mGluRs du groupe I régule la relocalisation de SENP1 endogène à la synapse.

Pour confirmer le rôle prépondérant des mGluRs dans la régulation homéostatique de SENP1 à la postsynapse, nous avons mesuré la colocalisation du signal de SENP1 endogène avec le signal du marqueur postsynaptique PSD95 en condition basal, en présence de DHPG et en présence de JNJ + DHPG (Fig.26). De manière consistante avec les données précédemment publiées par le laboratoire (Schorova *et al.*, 2019 ; Annexe 2), un traitement prolongé au DHPG conduit à une augmentation de la colocalisation de SENP1 avec PSD95 (Fig. 26 ; Coefficient de Pearson : Contrôle = $0,385 \pm 0,012$; DHPG = $0,412 \pm 0,010$). L'inhibition des récepteurs mGlu1R avant l'activation des récepteurs mGluRs du groupe I par le DHPG entraîne une forte colocalisation de SENP1 avec la postsynapse en accord avec les données de microscopie en temps réel (Fig. 26 ; JNJ + DHPG = $0,460 \pm 0,010$). Ces résultats confirment que l'activation seule de mGlu5R permet la rétention et l'accumulation de SENP1 endogène à la synapse.

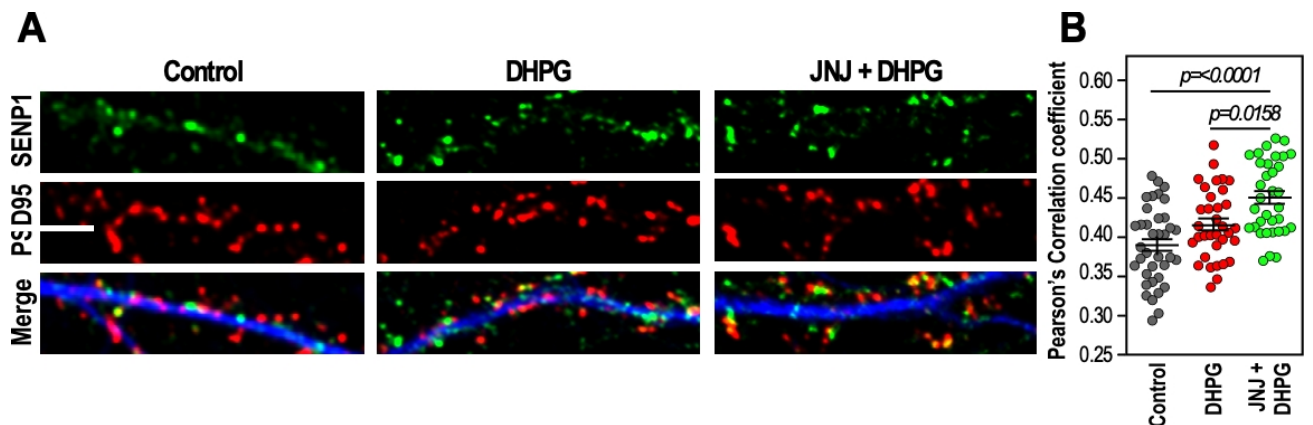


Figure 26. L'accumulation de SENP1 endogène est régulée par l'activation des mGluRs du groupe 1.

A Immunomarquage sur des neurones fixés d'hippocampe de rat (20JIV) en condition contrôle et en présence de DHPG et/ou JNJ pendant 40min. Echelle : 10 μ m. **B** Représentation quantitative du coefficient de corrélation de Pearson de l'intensité de SENP1 dans la zone PSD95 positive, $n=8$ dendrites/condition/culture ; $N=2$ cultures. Statistiques : Test de comparaison multiple Kruskal-Wallis.

Pour compléter ces résultats et apprécier la proportion de SENP1 endogène à la synapse dans un **système plus intégré**, j'ai réalisé une préparation de synaptosomes à partir de tranches de cerveaux de rat âgés de 14 jours traités ou non avec les agents pharmacologiques précédemment cités. J'ai tout d'abord mis au point la préparation de synaptosomes à partir d'une quantité faible de tissus cérébral (environ 200 mg par condition ; Fig. 24). La qualité du fractionnement subcellulaire a été vérifiée par immunoblot avec des anticorps anti-PSD95 et anti-Homer1 (protéines postsynaptiques) ainsi que l'anticorps anti-Synapsin 1a/b (protéine présynaptique). On remarque une faible quantité de marqueur dans l'homogénat et le cytoplasme et un enrichissement important dans la fraction synaptosomale (Fig. 27B). Nous avons ensuite vérifié la pureté de la fraction synaptique par la présence de marqueurs d'autres compartiments cellulaires (Fig. 27B). L'utilisation d'anticorps anti-NOPP140 et anti-Coillin (protéines nucléaires) et anti-GM130 (protéine de l'appareil de Golgi) nous montre que la fraction synaptosomale est dépourvue de protéines nucléaires et de protéines provenant de l'appareil de Golgi.

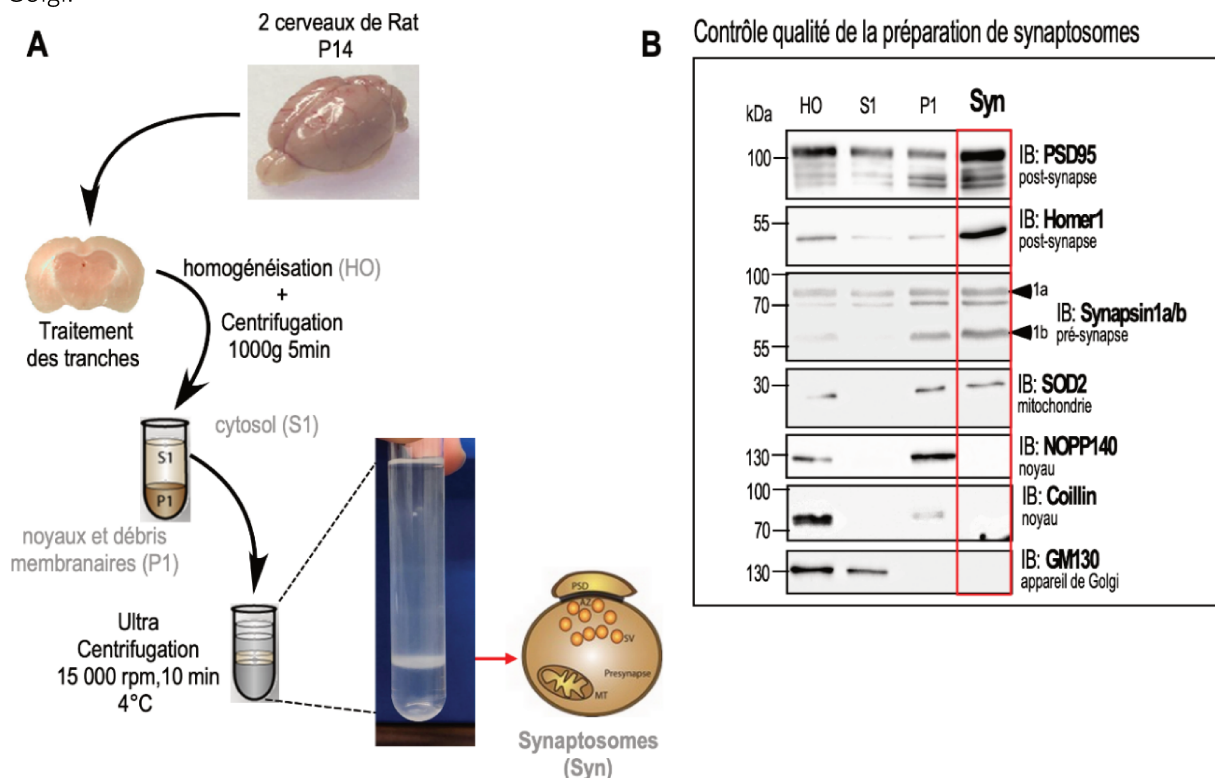


Figure 27. Préparation des synaptosomes à partir de tranches de cerveaux de rat.

A Schéma récapitulatif du protocole de purification de synaptosomes. **B** Analyse de la qualité du fractionnement par immunoblot en utilisant les différentes fractions des étapes indiquées en A. L'immunodétection a été réalisée pour PSD-95 et Homer1 (marqueur postsynaptique) et la Synapsine 1a / b (marqueur présynaptique). NOPP140 (marqueur nucléaire), Coillin (marqueur nucléaire) et GM130 (marqueur de l'appareil de Golgi). 10 µg de protéines ont été chargées par puits.

J'ai ensuite analysé par immunoblot les niveaux de SENP1 dans ces synaptosomes après traitement au JNJ et/ou DHPG (Fig. 28A). Compte-tenu du rôle de l'inhibition des mGlu1R dans la formation des microtubules et de son impact sur le niveau de tubuline libre (Huang et Hampson, 2000), j'ai normalisé les immunoblots en

utilisant la coloration de la membrane au rouge ponceau. L'activation des récepteurs mGlu1 et mGlu5 entraîne une augmentation des niveaux synaptiques de SENP1 et l'inhibition des mGlu1R préalablement à l'activation des récepteurs mGluRs de type I entraîne une augmentation significative des niveaux de SENP1 à la synapse (Fig. 28B; DHPG : $1,609 \pm 0,123$; JNJ+DHPG : $1,867 \pm 0,219$). Ces résultats sont en accord avec les expériences effectuées sur les cultures primaires qui révèlent une accumulation de SENP1 postsynaptique plus importante après inhibition des mGlu1R. De plus, l'inhibition prolongée de l'activité des mGlu1R seule (40min) entraîne, elle aussi, une augmentation de SENP1 postsynaptique plus importante (Fig. 26 ; JNJ : $1,331 \pm 0,212$). Ces données confirment le rôle central de l'activation des mGlu5R dans la régulation du contenu synaptique en enzyme SENP1.

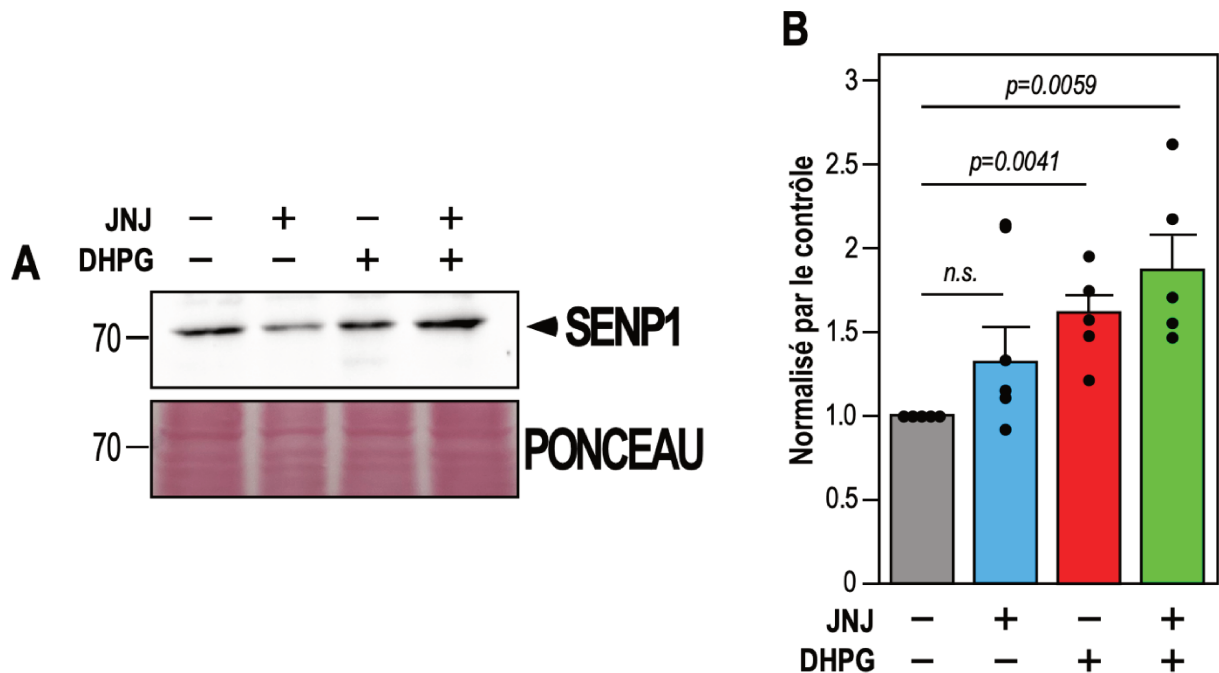


Figure 28. L'inhibition de l'activation de mGlu1R augmente les niveaux synaptiques de SENP1 chez le rat.

A Immunoblot représentative anti-SENP1 des fractions synaptosomales isolées à partir de tranches de cerveaux de rat traitées avec du TTX, du JNJ et du JNJ+DHPG. 25ug de protéines ont été chargées par puits. Le ponceau a été utilisé comme contrôle de charge. **B** Représentation quantitative des niveaux de SENP1 dans la fraction synaptosomale normalisés par la condition Contrôle : 1 ; JNJ : $1,331 \pm 0,212$; DHPG : $1,609 \pm 0,123$; JNJ+DHPG : $1,867 \pm 0,219$. N= 5 expériences. Statistiques : Ratio paired t-test

Discussion

La SUMOylation est essentielle pour la modulation des fonctions neuronales comme la libération des neurotransmetteurs et la plasticité synaptique. Un équilibre finement régulé entre SUMOylation et désSUMOylation est critique pour l'homéostasie cellulaire et le bon fonctionnement cérébral. Des travaux précédents ont montré que la diffusion des enzymes de SUMOylation et de désSUMOylation est régulée par l'activation de mGlu5R. Nous avons rapporté que l'enzyme de SUMOylation Ubc9 est recrutée dans les épines dendritiques par l'activation des récepteurs mGlu5R. Bien que la distribution synaptique d'Ubc9 et SENP1 soient toutes deux régulées par l'activation des mGlu5R, leur régulation survient séquentiellement. Dans un premier temps, l'activation des mGlu5R piège transitoirement l'enzyme de SUMOylation Ubc9 à la postsynapse permettant une augmentation rapide de la SUMOylation des protéines synaptiques impactant l'excitabilité neuronale (Loriol *et al.*, 2014). Il s'en suit alors d'une accumulation de SENP1 à la postsynapse conduisant au rétablissement des niveaux de SUMOylation synaptique initiaux. Afin de mieux comprendre les mécanismes régissant l'homéostasie synaptique de la SUMOylation, j'ai combiné techniques avancées d'imagerie en temps réel, pharmacologie et biochimie synaptique pour préciser les mécanismes moléculaires qui conduisent à la redistribution à la postsynapse de la désSUMOylase SENP1. Nous avons mis en évidence une régulation bidirectionnelle de l'adressage de SENP1 à la postsynapse par les récepteurs mGlu du groupe I (Pronot *et al.*, en préparation, **Annexe 4**). De plus, nous avons montré que cet adressage était dépendant de l'activation de la PKC, de la CaMKII ainsi que de la dynamique des microtubules. La conséquence directe de cet adressage de SENP1 à la synapse est une régulation des niveaux de protéines synaptiques SUMOylées. Les données générées pendant ma thèse ont démontré qu'un autre mécanisme faisant intervenir les mGlu1R, régit la vitesse d'accumulation de SENP1 à la postsynapse régulant ainsi la désSUMOylation synaptique pour maintenir l'homéostasie de la SUMOylation.

Régulation bidirectionnelle de la désSUMOylation par les récepteurs mGlu du groupe I

Les récepteurs métabotropiques du groupe I comprennent les récepteurs mGlu1 et mGlu5. Ces récepteurs présentent des homologies de séquence, de voies de signalisation communes et sont co-exprimées dans les mêmes populations neuronales, cependant des rôles spécifiques pour chacun des récepteurs ont été mis en évidence (Mannaioni *et al.*, 2001; Poisik *et al.*, 2003; Volk, Daly and Huber, 2006). Nous démontrons ici un rôle bien défini de chacune des isoformes dans la régulation de la désSUMOylation synaptique. Nous avons précédemment démontré que l'accumulation de SENP1 requiert une activation prolongée des mGlu5R conduisant à une diminution de la SUMOylation à la synapse sur le long terme (Schorova *et al.*, 2019 ; **Annexe**

2). Mes données révèlent que l'activation des mGlu1R contrebalance les effets de l'activation de mGlu5R sur la redistribution de SENP1 à la synapse. Alors que l'activation des mGlu5R entraîne l'accumulation de SENP1 à la postsynapse (Schorova *et al.*, 2019), l'activation des mGlu1R joue plutôt un rôle de « frein » sur la redistribution synaptique de SENP1.

Ce rôle de « frein » sur l'adressage de SENP1 à la postsynapse a été mis en évidence par l'utilisation d'un antagoniste spécifique de mGlu1R. De manière intéressante, l'application seule de l'antagoniste sans activation neuronale affecte significativement l'adressage de SENP1. Ces observations pourraient s'expliquer par l'activité constitutive des récepteurs mGlu1. Cette activité constitutive semble provenir de sa région transmembranaire qui oscille entre des états actifs et inactifs (Parmentier *et al.*, 2002; Pin *et al.*, 2003). Le JNJ 16259685 est un antagoniste non-compétitif des mGlu1R qui modifie le couplage entre la partie extracellulaire et le domaine transmembranaire, inhibant de fait la production d'IP3 et la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire. Des travaux basés sur l'utilisation d'antagoniste spécifique des mGlu1R et mGlu5R ont montré une diminution des niveaux des formes phosphorylées de ERK1 et 2 après incubation de cultures de neurones corticaux sans activation préalable du réseau neuronal (Hu *et al.*, 2010). Ces résultats confirment l'activité constitutive de ces récepteurs dans les neurones. Cependant, aucune donnée sur les effets de l'utilisation d'un seul antagoniste sur les niveaux de phospho-ERK n'est disponible dans la littérature. De manière intéressante, j'ai pu montrer que l'activation des mGlu1R et mGlu5R régule de manière bidirectionnelle la signalisation des MAP kinases ERK ce qui suggèrent un rôle différent pour les deux récepteurs dans la régulation de la signalisation intracellulaire et pas uniquement du processus de SUMOylation per se.

L'ensemble de mes données révèlent donc une régulation bidirectionnelle de la redistribution de l'enzyme de désSUMOylation SENP1 à la synapse par les mGluRs du groupe I. Le but de cette régulation pourrait être de permettre à la SUMOylation d'augmenter significativement préalablement à l'action des désSUMOylases qui vont entraîner un retour vers un état basal de la SUMOylation à la synapse. Ce mécanisme de régulation permet de réguler finement la SUMOylation synaptique à la fois dans le temps et dans l'espace permettant ainsi un maintien à l'équilibre de la balance SUMO/désSUMOylation à la synapse en réponse à l'activation neuronale.

Les effets de l'activation des mGlu1R sur Ubc9 n'ont jamais été étudié, nous ne pouvons pas certifier que cette régulation bidirectionnelle par les récepteurs mGlu de groupe I est spécifique de SENP1. De plus, d'autres enzymes de désSUMOylation, notamment SENP6, sont présentes à la synapse (Loriol *et al.*, 2013; Colnaghi *et al.*, 2020) et la régulation dépendante de l'activité neuronale de ses différentes enzymes de désSUMOylation reste à élucider.

Implication des kinases PKA, PKC et CaMKII dans l'accumulation de SENP1 à la synapse

L'imagerie dynamique combinée à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des acteurs de la voie de signalisation en aval des récepteurs mGlu du groupe I m'ont permis de montrer que deux kinases, PKC et CaMKII participent à la régulation de l'accumulation de SENP1 dans les épines dendritiques en réponse à l'activité neuronale. J'ai aussi observé que l'activation de la PKA n'a pas d'effet sur la redistribution mGluR-dépendante de l'enzyme.

À bien des égards, la phosphorylation est idéale pour modifier l'efficacité synaptique car le processus est rapidement réversible tout en pouvant initier des changements durables. Dans la littérature, on retrouve souvent la PKC et la CaMKII impliquées dans les mêmes processus suggérant ainsi la possibilité que ces deux kinases agissent en tandem ou de façon parallèle. Par exemple, l'activation de la PKC ou de la CaMKII est nécessaire pour induire une potentialisation synaptique similaire à la LTP (Malinow, Schulman and Tsien, 1989). Leurs effets cumulatifs montrent que chaque kinase affecte l'activité des autres et fonctionne dans un réseau hautement intégré et parfaitement adapté pour effectuer des changements subtils. Par exemple, la PKC favorise le trafic des rNMDA à la surface et induit la plasticité synaptique en déclenchant indirectement l'autophosphorylation de la CaMKII et en augmentant par la suite son association avec les rNMDAs (Yan *et al.*, 2011). Bien que les kinases aient souvent des cibles différentes, il a été montré que la PKC et la CaMKII peuvent phosphoryler les mêmes protéines telles que les récepteurs de type kainate et AMPA modulant ainsi leurs propriétés électrophysiologiques dans les neurones (Diering and Huganir, 2018). Il semble donc y avoir une interaction entre les deux voies activées par la PKC et la CaMKII. Les effets que nous observons pour la redistribution de SENP1 à la postsynapse pourraient être dus à cette interconnexion entre les deux activités kinases expliquant ainsi que l'activation de la PKC ou de la CaMKII soit requise pour l'accumulation postsynaptique de SENP1.

J'ai démontré dans cette première partie de mon projet de thèse que l'activation de la PKC régule l'accumulation synaptique de SENP1 en réponse à l'activation des récepteurs mGlu5. Les travaux sur la régulation de la diffusion de l'enzyme de SUMOylation Ubc9 ont révélé que la phosphorylation des protéines synaptiques est un prérequis pour la SUMOylation à la synapse. En effet, la phosphorylation des protéines synaptiques par la PKC est essentielle pour le piégeage transitoire d'Ubc9 à la synapse et en conséquence, pour l'augmentation de la SUMOylation synaptique. Nous montrons ici qu'en absence d'activation de la PKC, l'enzyme de désSUMOylation SENP1 ne peut s'accumuler à la postsynapse. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce sont les substrats SUMOylés qui retardent la sortie de SENP1 lors de son activité isopeptidase provoquant ainsi une accumulation de l'enzyme dans le temps à la synapse et qu'en absence de phosphorylation par la PKC après activation neuronale, les protéines synaptiques ne sont pas SUMOylées et donc n'ont pas besoin de l'accumulation de SENP1 pour la désSUMOylation. En plus de la régulation de la diffusion des enzymes de la

machinerie de SUMOylation, la PKC est elle-même cible de la SUMOylation et il a été montré que sa désSUMOylation permet la régulation de l'endocytose des récepteurs à la glycine lors de l'activation des rKA (Sun *et al.*, 2014). Plus récemment, il a été montré que la SUMOylation de la PKC inhibe la liaison de Gluk2 à $14-3-3\tau$ en réduisant la phosphorylation de Gluk2 (Li *et al.*, 2017). Ces données suggèrent que la SUMOylation de la PKC est un modulateur important de la fonction et de la localisation des protéines synaptiques en régulant l'activité kinase de PKC révélant une interaction étroite entre processus de SUMOylation synaptique et phosphorylation de la PKC.

Nous avons de plus montré que l'activation de la CaMKII permet l'accumulation synaptique de SENP1 en réponse à l'activation neuronale. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la SUMOylation des protéines synaptiques requiert que le maximum de protéines soient phosphorylées en amont et requiert en plus de la phosphorylation des protéines synaptiques par la PKC, celle de la CaMKII comme signal pour la SUMOylation des protéines de la synapse. De plus, l'effet de l'activation de la CaMKII sur la localisation et l'activité d'Ubc9 n'a pas été étudié et reste à démontrer.

L'inhibiteur utilisé ici, le KN93, n'est pas spécifique d'une isoforme de CaMKII en particulier et peut jouer sur plusieurs voies de signalisation. Pour étudier spécifiquement le rôle d'une isoforme spécifique de la CaMKII sur la régulation de la redistribution de SENP1 à la synapse, l'utilisation d'une forme mutée de l'une des isoformes dont l'activité catalytique est abolie serait le plus appropriée. Cependant, cet outil n'était pas à disposition au laboratoire et la surexpression de GFP-SENP1 par le système viral Sinbdis rend impossible la double transduction d'un même neurone. Bien que la SUMOylation directe de la CaMKII n'ait pas été démontrée, l'interaction entre la kinase et des homologues de la machinerie de SUMOylation chez la Drosophile a été montré par un crible à double hydride (Long and Griffith, 2000). La modulation de SUMO1 pourrait potentiellement modifier la localisation subcellulaire de la CaMKII mais les conséquences fonctionnelles de cette interaction restent à élucider.

Existe-il une phosphorylation directe de SENP1 par la PKA, la PKC ou la CaMKII ?

L'activation neuronale entraîne la phosphorylation d'une multitude de protéines synaptiques (Woolfrey and Dell'Acqua, 2015). Basée sur des valeurs prédictives, certaines désSUMOylases ont été suggérées comme substrats potentiels de la phosphorylation (Dephoure *et al.*, 2008). Nous pouvons donc nous demander si la phosphorylation directe de SENP1 pourrait moduler l'activité de la désSUMOylase et/ou l'accumulation de SENP1 dans la fine régulation de la balance SUMOylation/désSUMOylation synaptique. Tout d'abord, pour montrer que SENP1 est un substrat de la phosphorylation, nous pourrions réaliser des études de phosphorylation *in vitro* pour reconnaître la forme phosphorylée de SENP1 grâce à un retard sur gel provoqué en présence du réactif Phostag™ (NARD Institute). Deux kinases sont impliquées dans la régulation

spatiotemporelle de SENP1 à la synapse, la PKC et la CaMKII, qui peuvent toutes deux phosphoryler SENP1. Différents outils prédictifs tels que NetPhos3.1 et GPS5.0 mettent en évidence plusieurs sites potentiels de phosphorylation sur SENP1 par ces deux kinases (S170 et T174 pour la PKC et les résidus T59 et S224 pour la CaMKII).

Dans leur étude, Dephoure et ses collègues observent SENP1 phosphorylée sur son résidu sérine S157, SENP3 sur ses résidus sérine/thréonine S169, T176, S181, S188, S212, T229, S232, S242, T353 et SENP6 sur son résidu S353 (Dephoure *et al.*, 2008). Il apparaît que la phosphorylation simultanée des 9 résidus sérine/thréonine de SENP3 dans les cellules HeLa supprime l'activité de désSUMOylation des protéines associées aux chromosomes, pendant la mitose (Wei *et al.*, 2018). De manière intéressante, ce site semble être un site de phosphorylation par la PKA d'après les outils prédictifs NetPhos3.1 et GPS5.0. La PKA ne semble pas impliquée dans la régulation spatiotemporelle de SENP1, cependant les outils prédictifs indiquent plusieurs sites avec un score élevé pour les sérine S126 et S180. Avec un score moins élevé, on retrouve la sérine S157 dans cette liste dont la phosphorylation a déjà été observée dans la littérature (Dephoure *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2013).

Pour étudier le rôle potentiel de la phosphorylation de SENP1 sur son activité isopeptidase, j'ai produit par mutagenèse deux mutants du site retrouvé dans la littérature : SENP1-S157E, la forme non phosphorylable, et SENP1 S157A, la forme phosphomimétique. Leur surexpression dans les neurones pourrait nous permettre de mesurer les niveaux de SUMOylation et d'évaluer l'effet du rôle de la phosphorylation sur l'accumulation synaptique et l'activité de SENP1. Pour étudier le rôle de la phosphorylation sur la distribution et/ou la diffusion de l'enzyme à la synapse, des expériences d'imagerie dynamique (en temps réel, FRAP et photoconversion) sur des neurones hippocampiques exprimant les mutants ou GFP-SENP1-S157E, la forme non phosphorylable ou GFP-SENP1-S157A, la forme phosphomimétique, devront être menées. Il est à noter que des études récentes de phosphoprotéomique synaptique n'ont pas permis de retrouver de forme phosphorylée pour SENP1 dans les synapses de cerveaux de souris adultes (Brüning *et al.*, 2019).

Le trafic synapto-dendritique de SENP1 est dépendent des microtubules

Les précédents travaux du laboratoire montrent que, compte-tenu de sa petite taille (17kDa), l'enzyme Ubc9 diffuse à la synapse 40x plus rapidement que SENP1, qui elle, utilise le réseau de microtubules dendritiques (Loriol *et al.*, 2014; Schorova *et al.*, 2019). Il semble donc coexister deux processus de diffusion/trafic des enzymes de SUMOylation et de désSUMOylation entre la dendrite et les épines dendritiques. Cette différence pourrait expliquer la temporalité des processus de SUMOylation et désSUMOylation à la synapse nécessaire au maintien de la balance SUMO/désSUMOylation. La diffusion rapide de l'enzyme de conjugaison permet la SUMOylation rapide des protéines en réponse à l'activité neuronale. Les substrats SUMOylés par Ubc9 vont pouvoir remplir leurs fonctions à la synapse et seront ensuite désSUMOylés par SENP1 qui s'accumule

lentement à la postsynapse. Une fois les niveaux de SUMOylation initiaux rétablis, SENP1 sort des épines dendritiques lorsque la stimulation cesse.

Bien qu'une traduction locale puisse avoir lieu, la présence de SENP1 à la postsynapse est le résultat du trafic de protéines le long des dendrites. La question est aujourd'hui de savoir quelles sont les interacteurs de SENP1 à la synapse qui permettrait le trafic et l'accumulation après stimulation neuronale. Les microtubules n'entrent que rarement dans les épines dendritiques, s'arrêtant généralement au niveau du cou des épines dendritiques. Nous pouvons suggérer que les microtubules pourraient être à l'origine du trafic de l'enzyme de la dendrite jusqu'à l'épine dendritique. Le transport d'enzymes le long des dendrites via les microtubules est bien documenté dans la littérature. C'est notamment le cas pour la CaMKII dont sa relocalisation dans les épines dendritiques suite à l'activation neuronale est un processus dépendant de la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire et de la dynamique des microtubules (Thalhammer *et al.*, 2006; Lemieux *et al.*, 2012). De plus, les récepteurs mGluR du groupe I sont étroitement liés aux microtubules, notamment mGlu1R, dont l'activation réduit la formation des microtubules (Huang and Hampson, 2000). J'ai montré lors de ma thèse que la dynamique des microtubules participe à la redistribution de SENP1 à la synapse. Cependant, les expériences d'imagerie dynamique que j'ai réalisées ne me permettent pas déterminer si la dynamique des microtubules est importante pour l'entrée et/ou la sortie de SENP1 des épines dendritiques. Le rôle de la dynamique des microtubules sur le trafic synpto-dendritique de SENP1 restent à élucider. Dans ce but, des expériences de FRAP (GFP-SENP1) ou de photoconversion (Dendra-SENP1) devront être réalisées en présence de perturbateurs des microtubules comme le Nocodazole ou le Taxol afin de mesurer la dynamique de diffusion de SENP1 lors que la dynamique des microtubules est déstabilisée.

De plus, l'étude de l'implication de protéines motrices pourrait fournir plus de détails sur les mécanismes de trafic de SENP1 le long des microtubules dendritiques. Nous pourrions isoler SENP1 par immunoprécipitation dans le cytosol et identifier ses interacteurs par spectrométrie de masse afin de déterminer quels pourraient être les partenaires importants pour le trafic de l'enzyme.

Rôle de l'influx calcique dans la régulation du trafic de SENP1 ?

Le calcium est un acteur fondamental de l'excitation neuronale. Compartimentalisé par l'épine dendritique, le calcium a un rôle prépondérant pour déclencher les différentes voies de signalisation pour la transmission et la plasticité synaptique et autres processus associés à l'apprentissage et la mémorisation. L'activation des mGlu5R déclenche l'activation de multiples kinases comme la CaMKII qui conduit à la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires du RE. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la mobilisation du Ca^{2+} dans les neurones lors de la redistribution de SENP1 à la synapse. L'utilisation d'agents pharmacologiques tels que la thapsigargine, ciblant les Ca^{2+} -ATPase SERCA pour entraîner une augmentation des niveaux de calcium

intracellulaire ou inversement, le BAPTA, un chélateur du calcium permettrait d'évaluer le rôle du Ca^{2+} dans la redistribution de SENP1. Cependant, l'utilisation de ces drogues dérégule également l'homéostasie cellulaire, provoquant un stress cellulaire et conduisant généralement à l'apoptose.

De manière intéressante, l'activation des récepteurs mGlu1/5 module un grand nombre de canaux ioniques tels que certains canaux calciques tels que les canaux calciques voltage dépendants (VDCC), les récepteurs de type AMPA ou NMDA (Snyder *et al.*, 2001; Reiner and Levitz, 2018). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques Nifedipine, dAP5 ou CNQX, sur des cultures neuronales exprimant GFP-SENP1 pourrait nous permettre d'étudier le rôle de ces canaux calciques dans la régulation de la redistribution de SENP1 à la postsynapse.

Axe 2- Identification et caractérisation d'un SUMOylome synaptique chez le rat

ANNEXE 5

Article: Pronot M, Kieffer F, Gay A-S, Debayle D, Forquet R, Poupon G, Schorova L, Martin S[#] and Gwizdek C[#].

Proteomic identification of an endogenous synaptic SUMOylome in the developing rat brain.

Hypothèse de travail

La SUMOylation est essentielle pour la régulation des processus cellulaires et apparaît comme une cible thérapeutique potentielle en raison de son implication dans de nombreuses synaptopathies ainsi que dans les cancers. Dans les 15 dernières années, l'étude des cibles de la SUMOylation par approche protéomique n'a fait que croître, notamment grâce au développement de la détection des sites spécifiques de SUMOylation. Les progrès des techniques de protéomique ont permis l'identification de plus de 3500 protéines modifiées par SUMO (Hendriks and Vertegaal, 2016), qui sont principalement nucléaires, et participent à des processus tels que la transcription, le remodelage de la chromatine, la réparation de l'ADN et le transport nucléocytoplasmique (Flotho and Melchior, 2013). Ces études protéomiques des cibles de SUMO ont été réalisées sur des cultures cellulaires (Galisson *et al.*, 2011) ou sur des lysats obtenus à partir d'organes entiers (Hendriks *et al.*, 2018). La plupart de ces études utilise une stratégie d'enrichissement en protéines SUMOylées en utilisant la surexpression exogène d'un épitope de SUMO étiquetée à un tag Histidine (His) ou HA, associant souvent un variant muté de SUMO. Cependant, ces méthodes ne permettent pas l'identification des protéines SUMOylées endogènes rendant ces approches impossibles pour des analyses sur des tissus *ex vivo* sans dépendre du génie génétique. L'enrichissement efficace des protéines endogènes modifiées par SUMO grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques anti-SUMO1 ou anti-SUMO2/3 dans les tissus des mammifères est la première étape indispensable pour l'identification des cibles de la SUMOylation par spectrométrie de masse (Becker *et al.*, 2013; Barysch *et al.*, 2014). Bien que l'identification d'un SUMOylome global endogène dans le noyau et le nucléole ait été réalisée, le SUMOylome d'un compartiment spécifique ou cytosol n'a encore jamais été rapporté. La validation des protéines cibles SUMOylées d'un compartiment subcellulaire spécifique est difficile en raison des faibles niveaux à l'état basal de SUMOylation des protéines endogènes, de la faible abondance de la SUMOylation dans certains organes ou lors du développement (Hendriks *et al.*, 2018) et les niveaux d'activité de la protéase SUMO dans les lysats cellulaires (Hay, 2005).

Des altérations de la SUMOylation sont retrouvées dans certaines synaptopathies (Chen *et al.*, 2021). Cependant, la liste des protéines synaptiques SUMOylées identifiées reste très limitée dans la littérature.

Pour comprendre le comportement fonctionnel de la SUMOylation de façon physiologique et pathologique, il est maintenant crucial d'avoir une vue d'ensemble des protéines SUMOylées à la synapse, et de leur implication dans l'étiologie des maladies neurologiques. Nous nous sommes appuyés sur nos connaissances du système de la SUMOylation dans les neurones pour mettre un protocole d'enrichissement synaptique des protéines SUMO2/3-ylées. Ce projet a ainsi permis :

- D'identifier un SUMO2/3-ylome synaptique par spectrométrie de masse (MS) et d'établir la première cartographie de la SUMOylation à la synapse.
- De valider biochimiquement 5 cibles identifiées par MS.
- Mettre en évidence les réseaux synaptiques fonctionnels et les maladies neurologiques potentiellement associées à ce SUMOylome.

Matériel et méthodes

Animaux

Les rates Wistar gestantes proviennent exclusivement d'une source commerciale (Janvier, Saint Berthevin, France). Tous les animaux ont été manipulés et traités en accord avec les recommandations du conseil européen pour le bien-être des animaux utilisés à des fins expérimentales dans notre animalerie. Les animaux ont eu libre accès à l'eau et à la nourriture. Les rats ont été nourries ad libitum et sont maintenues dans une atmosphère contrôlée avec un cycle veille/sommeil de 12h/12h.

Isolation de la fraction synaptique à partir de cerveaux de rats P14 ou Adulte

Notre préparation de synaptosomes a été adapté à partir de publications précédentes (Hebb and Whittaker, 1958; Huttner et al, 1983). Les cerveaux antérieurs de rats âgés de 14 jours sont homogénéisés à l'aide d'un potter en verre et Teflon dans 26 mL de milieu Tris Sucrose froid (10 mM Tris-HCl pH7,5, 0,32 M Sucrose) en présence d'inhibiteur de protéases et de 20 mM de NEM. L'homogénat est ensuite centrifugé à 1 000 g pendant 5 min à température ambiante en utilisant le rotor JA4.2 (Beckman). Le surnageant, qui correspond au cytosol, est séparé du culot contenant les noyaux et débris membranaires. La fraction cytosolique est déposée sur un gradient croissant de 2% à 20% Percoll/tampon Tris Sucrose. Le gradient est ultracentrifugé à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C en utilisant le rotor SW41Ti (Beckman). La fraction synaptosomale est comprise à l'interface de la couche 10% et 20% Percoll et est récupérée à l'aide d'une pipette en verre. La fraction est ensuite lavée dans une solution HEPES (5mM HEPES, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose, inhibiteurs de protéases, 10 mM NEM) pour éliminer le sucre. La fraction est centrifugée à 10 000g pendant 10 min à l'aide du rotor JA25.5 (Beckman). Le culot enrichi en synaptosomes est enfin resuspendu dans du tampon de lyse (200 mM NaPi pH7,4, 1.5 M NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, 1%SDS, inhibiteurs de protéases, 10 mM NEM). Les synaptosomes ont été soit bouillis 10 min à 95°C pour les expériences de spectrométrie de masse ou chauffés 15 min à 55°C pour la validation des cibles de la SUMOylation avant immunoprécipitation. La concentration protéique a été déterminée par la méthode de Bradford.

Immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-SUMO2/3 ou anti-IgG

Les anticorps IgG ou spécifique de SUMO2/3 ont été incubés dans du PBS 1X sous agitation pendant 45 min en présence de billes de sépharose couplées à des protéines G. Les anticorps ont ensuite été couplés de façon covalente aux billes en présence de 30 mM de dimethyl pimelidate (Sigma) dans une solution de 0,2 M

Triethanolamine pH 8.2 pendant 1h sous agitation. La réaction de pontage chimique a été stoppée en resuspendant et en incubant les billes couplées aux anticorps dans une solution de 50 mM Tris pH 8 pendant 20 min. Les billes sont alors lavées avec 0.2 M Glycine pH 2.9 pendant 20 à 30 sec pour éliminer les anticorps non liés covalamment. Les billes couplées aux anticorps sont stockées à 4°C dans du PBS jusqu'à utilisation.

Le complexe anticorps-protéines SUMO2/3-ylées est ensuite formé par incubation de 2 µg anticorps IgG/12F3 couplés aux billes pour 100 µg d'extrait protéique (lysats de cerveaux ou synaptosomes purifiés) sur la nuit et sous agitation. Pour éliminer les complexes protéiques aspécifiques, les billes sont lavées dans du tampon de lyse contenant une forte concentration saline (500 mM NaCl). L'élution des protéines immunopurifiées a été réalisée de deux manières :

- Par élution peptidique à l'aide d'un peptide compétiteur conçu à partir de l'épitope reconnu par l'anticorps anti-SUMO2 12F3 (utilisation à 0.65 mg/mL). Cela permet de limiter le décrochage des anticorps ainsi que celui de protéines non spécifiques fixées sur les billes. Les éluions ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse.
- Par élution SDS : Les billes ont été bouillies dans du tampon Laemmli entraînant une élution plus efficace de tous les complexes. Ces extraits ont été utilisées pour la validation des cibles de la SUMOylation.

Le protocole d'immunoprécipitation des protéines sumo2/3-ylées a été validé en utilisant une coloration à l'argent et les extraits protéiques ont été analysés par Western Blot (méthodes p.77).

Coloration à l'argent (Silver Quest Kit ; Invitrogen)

Après la migration, le gel est rincé dans de l'eau ultra pure avant d'être fixé 20min sous agitation dans une solution 10% Acide Acétique en éthanol 40%. Après lavages successifs en éthanol 30%, le gel est incubé avec une solution de sensibilisation contenant un sensibilisant (N,N-Diméthylformamide 5% et Hydroxyde de sodium 2%) dans 30% éthanol. Le gel est ensuite lavé dans de l'éthanol 30% et de l'eau ultra pure avant de colorer le gel pendant 15 min à l'aide d'une solution de coloration. Enfin, le gel est incubé dans une solution de développement jusqu'à apparition des bandes. La réaction sera alors stoppée par une solution comprenant de 10-30 % Tetrasodium EDTA.

Anticorps	Espèces	Compagnie	Concentration utilisée
Anti-SUMO2	Souris	Cytoskeleton clone 12F3 (ASM23)	1/500 (WB) ; (IP)
Anti-SUMO1 (21C7)	Souris	Laboratoire	Surnageant de culture
Anti-SUMO2	Lapin	Laboratoire du Dr Guillaume Bossis	1/700
Anti-Ubc9	Souris	BD Biosciences (610749)	1/500 (WB) ; 8µg par point d'IP
Anti-PSD95	Souris	Neuromab	1/10 000 (WB) ; 8µg par point d'IP
Anti-Flotillin1	Souris	BD Biosciences (610820)	1/ 500 (WB) ; 8µg par point d'IP
Anti-PKC gamma	Souris	Santa Cruz	1/500 (WB)
Anti-SynGAP	Lapin	Synaptic System (157002)	1/1000 (WB) ; 8µg par point d'IP
Anti Synaptotagmin	Souris	Stressgen (SYA-148)	1/2000
Anti-Homer	Lapin	Synaptic System (160003)	1/1000
Anti CoxIV	Souris	Abcam (ab14744)	1/2000
Anti SOD2	Souris	Santa Cruz (sc-137254)	1/2000
Anti Calnexine	Souris	Santa cruz (sc-23954)	1/700
Anti GM130	Lapin	BD Biosciences (610823)	1/500
Anti Nopp140	Souris	Santa Cruz (Sc-374033)	1/700
Anti Fibrillarin	Souris	Invitrogen (MA3-16771)	1/2000
Anti Histone H4	Lapin	Active Motif (39269)	1/2000

Tableau 6. Anticorps utilisés lors de l'étude du SUMOylome synaptique

Analyse par spectrométrie de masse

Préparation des échantillons : Les protéines des éluats d'immunoprécipitation ont été séparées par SDS-PAGE sur gel gradient Bis-Tris (4-15% ou 4-20%, Mini-PROTEAN®, BioRad) et colorées par Coomassie (bleu impérial). Chaque piste a été découpée en 10 bandes. Les protéines de chaque bande ont été réduites/alkylées et digérées par un traitement au DTT et à la trypsine. Les peptides tryptinés ont été isolés par extractions successives dans l'acide formique à 1%, dans l'eau et dans l'acétonitrile. Les extraits de peptides de bandes adjacentes ont été regroupés deux par deux avant analyse par LC-MS/MS, concentrés sous vide et solubilisés dans 15 µL d'acide formique aqueux à 0,1%.

Analyse par NanoHPLC-Q-exactive plus : La séparation des peptides a été effectuée à l'aide d'un nanoHPLC (ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific). 5 µl de solution de peptides ont été injectés et concentrés sur une µ-précolonne Acclaim PepMap 100 C18 (i.d. 5 mm, 5 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) à un débit de 10 µL/min et en utilisant un solvant contenant H₂O/ACN/FA 98%/2%/0.1%. La séparation des peptides a été

effectuée sur une colonne Acclaim PepMap 100 C18 de 75 µm de diamètre interne x 500 mm (3 µm, 100 Å) (Thermo Fisher Scientific) à un débit de 200 nL/min. Le système de solvants était le suivant : (A) 100% d'eau, 0,1% de FA, (B) 100% d'acétonitrile, 0,08% de FA. Le gradient suivant a été utilisé : t = 0min 4% B ; t = 3 min 4%B ; t = 170min, 35% B ; t = 172 min, 90% B ; t = 180 min 90% B à 35°C. La nanoHPLC a été couplée via une source d'ionisation nanoelectrospray au spectromètre de masse haute résolution Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Les spectres MS ont été acquis à une résolution de 70 000 (200 m/z) dans une gamme de masse de 150-1800 m/z avec une valeur AGC cible de 5⁵ et un temps d'injection maximum de 50 ms. Les 10 ions précurseurs les plus intenses ont été sélectionnés et isolés avec une fenêtre de 2m/z et fragmentés par HCD (Higher energy C-Trap Dissociation) avec une énergie de collision normalisée (NCE) de 27. Les spectres MS/MS ont été acquis dans le piège à ions avec une valeur cible AGC 2⁵, la résolution a été fixée à 17 500 à 200 m/z combinée avec un temps d'injection de 100 ms.

Identification des protéines : Les données ont été traitées en utilisant Proteome Discoverer 2.2 équipé de Sequest HT. Les interrogations ont été faite en utilisant la base de données FASTA Swissprot Rattus Norvegicus Reviewed and Unreviewed. Une précision de masse de ± 10 ppm a été utilisée pour les ions précurseurs et de 0,02 Da pour les ions produits. La spécificité de l'enzyme a été fixée à la trypsine avec deux clivages manqués autorisés. Des bases de données de leurres inversés ont été incluses pour toutes les recherches afin d'estimer les taux de fausses découvertes, et filtrées à l'aide de l'algorithme Percolator avec un FDR (False Discovery Rate) de 1%.

Analyses bioinformatiques

Pour comparer les ensembles de données sur le protéome, les identifiants des protéines ont été convertis en Gene ID à l'aide des outils de conversion Uniprot, DAVID et db2db. Les homologues humains ou souris des données obtenues sur le rat ont été identifiés à l'aide de l'outil DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool ou Blast. L'analyse de l'enrichissement des termes de l'ontologie génétique (GO) a été réalisée à l'aide de clusterProfiler (niveau d'ontologie 2) sur l'interface web Proteore. L'analyse d'enrichissement des voies KEGG et Reactome a été réalisée à l'aide de DAVID. L'analyse d'enrichissement à l'aide de la base de données spécifique aux synapses SynGO a été effectuée à partir de la base "brain expressed", avec une stringence moyenne et des termes de niveau 2 pour la représentation des composants cellulaires et des termes de niveau 1 pour les voies biologiques. L'annotation des maladies a été réalisée avec le portail ToppGene sur les homologues humains de notre liste. L'analyse de réseau a été réalisée à l'aide de l'outil web STRING (v. 11.0) combiné à l'application Cytoscape (v. 3.8.2) implémentée par le module StringApp.

Résultats

Le laboratoire a précédemment démontré que les niveaux de protéines SUMOylées ainsi que la machinerie de SUMOylation sont régulés spatiotemporellement dans le cerveau de rat en développement et les niveaux de SUMOylation sont à leurs maximum 14 jours après la naissance. De plus, la période critique de synaptogenèse se produit au cours des 3 premières semaines après la naissance chez les rongeurs et culmine aux alentours du 14 jours post-natal (Semple *et al.*, 2013). J'ai vérifié ces données par WB en utilisant des lysats de cerveaux de rat à P14 et à l'âge adulte et des anticorps anti-SUMO1 et SUMO2/3 (Fig. 29A). J'ai ensuite mesuré la quantité de protéines SUMO1- et 2/3-ylées dans les différents compartiments neuronaux (Noyaux, Cytosol et Synapse). On remarque que la quantité de protéines SUMOylées à la synapse est relativement faible comparée au compartiment nucléaire et au cytosol (Fig. 29B-C).

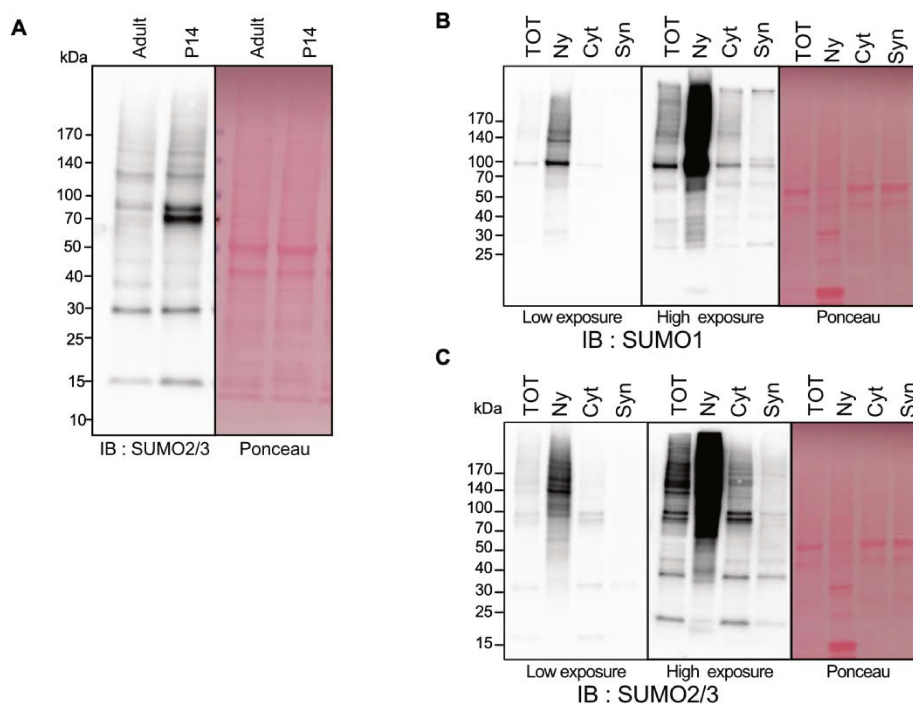


Figure 29. Niveaux de SUMOylation dans les différents compartiments cellulaires.

A Les niveaux de SUMO2/3-ylation ont été détectés par immunoblot sur des lysats de cerveaux entiers de rats adultes ou âgés de 14 jours (panneau de gauche). La quantité de protéine totale a été visualisée par Ponceau (panneau de droite). Niveaux de SUMO1-ylation (**B**) et SUMO2/3-ylation (**C**) des fractions subcellulaires indiquées (TOT : lysat cérébral total ; Cyt : fraction cytoplasmique ; Ny : fraction nucléaire ; Syn : fraction synaptique) détectés par immunoblot.

La combinaison d'une synaptogénèse intense et d'une SUMOylation forte à P14 apparaît être une fenêtre d'étude appropriée pour analyser le rôle de la SUMOylation dans la régulation des processus synaptiques par l'identification d'un SUMO2/3-ylome spécifique de la synapse.

1- Validation du protocole d'enrichissement en protéines synaptiques.

Afin d'isoler les synaptosomes à partir de cerveaux de rats âgés de 14 jours, nous avons effectué un fractionnement subcellulaire sur gradient de Percoll/Sucrose (Fig. 30A). La qualité du fractionnement a été évaluée par immunoblots avec des anticorps anti-PSD95 et HOMER1 (protéines postsynaptiques) ainsi qu'un anti-Synaptotagmine-1 (protéine présynaptique ; Fig. 30B). On remarque une faible quantité de marqueur synaptique dans l'homogénat et le cytoplasme, une absence totale dans la fraction nucléaire et un enrichissement important dans la fraction synaptosomale pour ces trois marqueurs synaptiques.

Afin de vérifier l'absence de toute contamination par un autre compartiment cellulaire, nous avons réalisé des immunoblots avec des anticorps dirigés contre des protéines marqueurs d'autres compartiments subcellulaires. Nous pouvons constater que les protéines CoxIV et SOD2, marqueurs de la mitochondrie, sont retrouvés dans l'homogénat, le cytoplasme et la fraction synaptosomale (Fig. 30B). La calnexine, marqueur du réticulum endoplasmique, est aussi retrouvée dans l'homogénat, le cytoplasme et la fraction synaptosomale (Fig. 30B). En effet, les synaptosomes contiennent du réticulum endoplasmique (source de calcium) et des mitochondries (source d'ATP) (Mironov and Symonchuk, 2006). Enfin, nous pouvons constater que la protéine GM130, marqueur spécifique de l'appareil de Golgi, n'est présente que dans l'homogénat et le cytoplasme mais pas dans la fraction nucléaire ni synaptosomale. La protéine nucléaire Histone (H4) est faiblement retrouvée dans l'homogénat, fortement enrichie dans la fraction nucléaire et totalement absente du cytoplasme et de la fraction synaptosomale (Fig. 30B). Ces résultats confirment la qualité du protocole de préparation de synaptosomes mis au point au laboratoire et montrent l'absence de contamination par d'autres compartiments tels que l'appareil de Golgi, ou le noyau, qui est notamment très riche en protéines SUMOylées (Fig. 29B-C).

Nous avons ensuite identifié par spectrométrie de masse les protéines contenues dans la fraction synaptosomale qui nous servira de synaptome de référence pour le reste de l'analyse. L'identification des protéines de l'échantillon réalisée par Proteome Discover 2.0 a permis l'identification de 4379 protéines synaptiques présentes dans au moins 3 des 4 répétitions réalisées.

Pour évaluer la qualité de notre synaptome, des analyses bioinformatiques ont été réalisées à l'aide de ClusterProfiler (interface Proteore) et de DAVID afin d'étudier la représentation des termes d'ontologie génique (GO) associé à notre échantillon pour la composition cellulaire, les processus biologiques ainsi que les voies KEGG. Les analyses montrent que les protéines de notre synaptome sont enrichies pour les compartiments cellulaires tels que la synapse, la mitochondrie ou encore les vésicules (Fig. 30C) et aux fonctions associées à l'organisation synaptique, le transport vésiculaire ainsi que l'organisation mitochondriale (Fig. 30D).

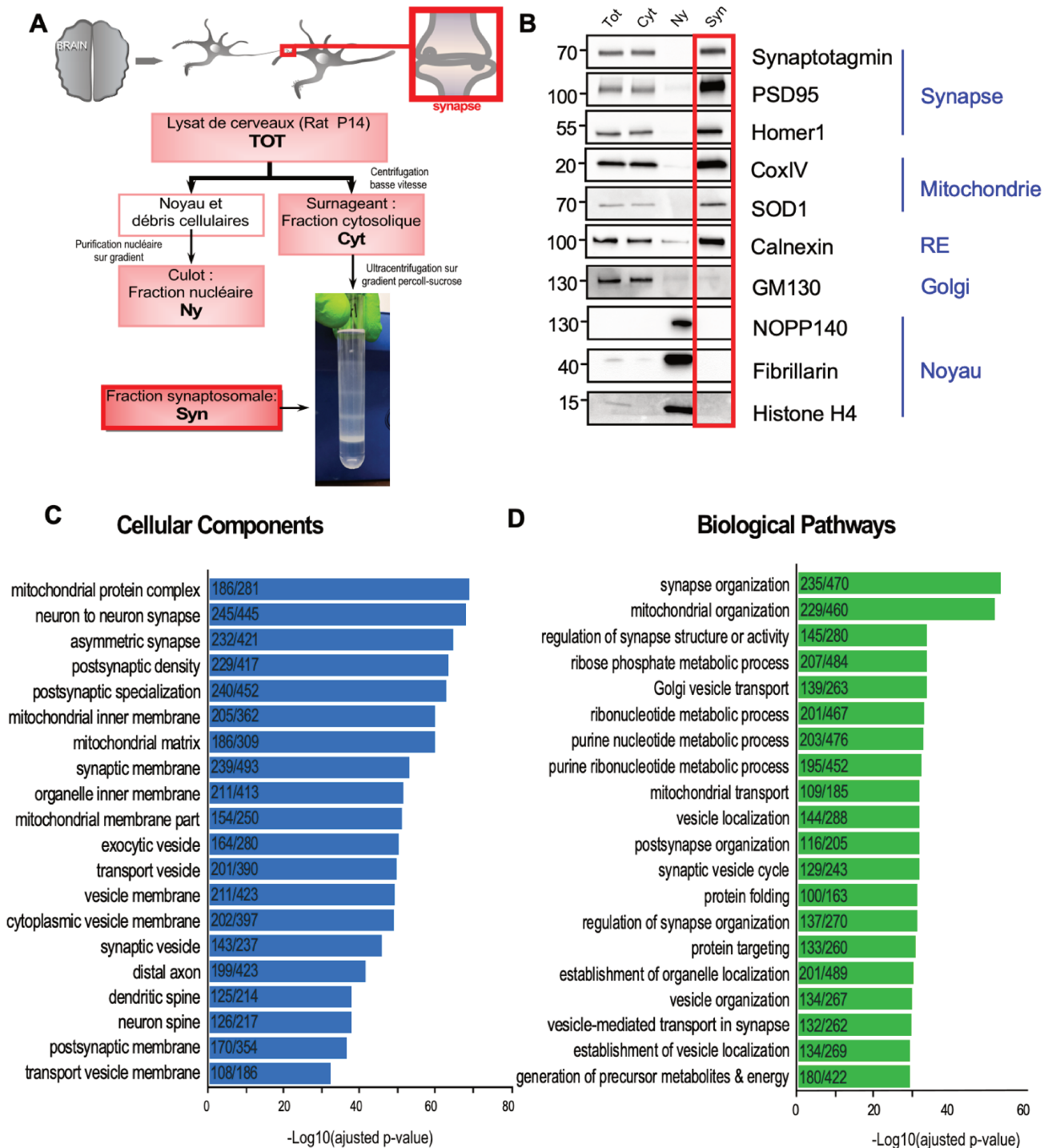


Figure 30. Contrôle qualité du fractionnement synaptique

A Procédure de fractionnement subcellulaire biochimique à partir de cerveaux de rats âgés de 14 jours. Après centrifugation à basse vitesse du lysat total (TOT), le surnageant correspondant à la fraction cytoplasmique (Cyt) a été chargé sur des gradients percoll/Sucrose pour isoler la fraction synaptosomale (Syn). **B** Analyse par Western blot des différentes fractions. La liste des protéines obtenues par MS a été soumise à analyse d'enrichissement pour les termes associés aux compartiments cellulaires (**C**) ou aux voies biologiques (**D**) par rapport au protéome du rat. Les catégories ont été classées en fonction du $-\text{Log}_{10}$ de la p -value ajustée par méthode de Benjamini-Hochberg. Le nombre de protéines de notre liste par rapport à l'occurrence des catégories est indiqué entre parenthèses.

2- Immunoprécipitation des protéines synaptique SUMO2/3

Afin d'identifier les protéines modifiées par SUMO2/3 à la synapse, nous avons réalisé des immunoprécipitations en condition dénaturante en utilisant les anticorps anti-SUMO2/3 12F3 commerciaux.

Nous avons utilisé des billes sépharose couplées à la protéine G soit avec l'anticorps SUMO2/3 soit avec l'anticorps IgG souris correspondant comme contrôle négatif. Les billes ont ensuite été mises en présence de la fraction synaptosomale toute la nuit à 4°C sous agitation lente (Fig. 31A). Les interactions protéiques non covalentes ont été éliminées par lavage dans une solution tampon contenant une forte concentration en sel. Les protéines SUMO2/3 ont ensuite été éluées par compétition à l'aide d'un peptide SUMO2 correspondant à l'épitope reconnu par l'anticorps SUMO2/3 (Fraction Élution peptidique). Une seconde élution des billes par un tampon dénaturant riche en SDS nous a permis de récupérer le matériel non élué (Fraction Élution SDS).

Afin de valider l'efficacité de notre protocole d'immunoprécipitation SUMO2/3, nous avons réalisé dans un premier temps une coloration à l'argent sur les protéines récupérées dans les différentes fractions et séparées par SDS-PAGE. Les mêmes échantillons ont ensuite été étudiés par immunoblot anti-SUMO2/3 (Fig. 31 B-H). Nous avons montré que deux lavages à haute concentration en sel (500mM NaCl) sont suffisants pour éliminer les interactions aspécifiques des protéines (Fig. 31B). On peut constater une absence de signal SUMO2/3 dans les fractions récupérées lors des lavages permettant la réduction des interactions protéiques aspécifiques (Fig. 31D). Il faut noter que la coloration à l'argent de la fraction éluee par tampon dénaturant SDS montre la présence de protéines qui collent aux billes de manière aspécifique (Fig. 31B). L'étude de cet éluat par immunoblot révèle que les protéines qui collent aux billes contiennent des protéines reconnues par l'anticorps SUMO2/3 et que cette méthode d'élution n'est pas la plus adéquate pour identifier les protéines SUMOylées à la synapse (Fig. 31D). Nous avons donc procédé à une élution des protéines SUMOylées par compétition avec le peptide SUMO2/3. Nous pouvons constater que l'élution par un peptide compétiteur a permis d'éluer des protéines présentes sur les billes dans la condition 12F3 mais aussi dans la condition IgG en plus faible quantité (Fig. 31C). Ces résultats montrent que nous nous plaçons dans des conditions très strictes avec une réduction des interactions protéiques aspécifiques par lavages en haute concentration de sel suivi d'une élution des protéines spécifiques par compétition peptidique. Par immunoblot, nous avons peu de protéines SUMO2/3ylées dans le contrôle négatif (IgG) alors que nous observons une grande quantité de protéines

SUMOylées dans les hauts poids moléculaires ainsi qu'une bande intense à environ 15kDa correspondant à SUMO2/3 libre c'est-à-dire non conjugué (Fig. 31E).

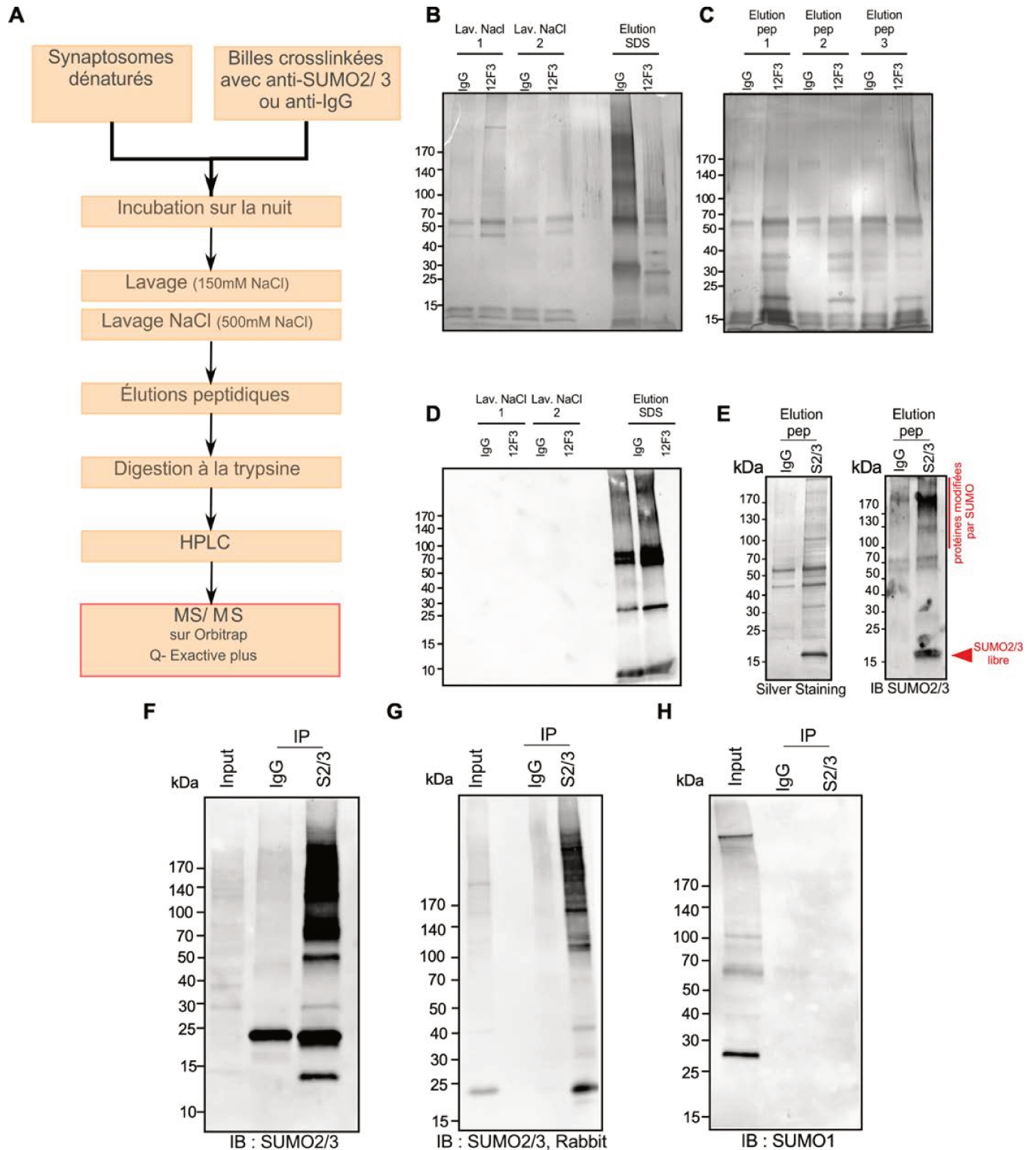


Figure 31. Immunoprécipitation des protéines synaptiques SUMO2/3ylées

A Procédure utilisée pour l'identification des protéines SUMO2/3-ylées de la synapse. Analyse des différentes étapes de la procédure par coloration à l'argent (**B**, **C**, **E**) et par immunoblot avec un anticorps anti-SUMO2/3 (**D**, **E**). Analyse par immunoblot de l'éluion SDS après immunoprécipitation de cerveau entier de rat âgés de 14 jours en utilisant l'anticorps SUMO2/3 (souris ; **F**), un autre anticorps SUMO2/3 (lapin ; **G**) et un anticorps anti-SUMO1 (21C7 ; **H**)

Enfin, la spécificité de l'immunoprécipitation SUMO2/3 a été validée par l'utilisation de l'anticorps commercial SUMO2/3 (Fig. 31F), d'un autre anticorps anti-SUMO2/3 produit chez le lapin (Fig. 31G) et d'un anticorps SUMO1 #21C7 (Fig. 31H). On remarque une absence de signal SUMO1 dans les immunoprécipitats SUMO2/3. Ces résultats ont permis de valider le protocole d'immunoprécipitation et montrent que nous avons bien isolé des protéines SUMO2/3ylées. Cependant, le rendement de l'élution peptidique n'est pas total puisque toutes les protéines SUMOylées n'ont pas été éluées par compétition peptidique. Le rendement est cependant suffisant pour identifier les protéines SUMOylées en spectrométrie de masse en tenant compte de la gamme de détection du spectromètre utilisé.

3- Identification des protéines synaptiques SUMOylées par spectrométrie de masse et validation de certaines cibles par immunoprécipitation.

Afin d'identifier les protéines synaptiques SUMO2/3ylées par spectrométrie de masse, les échantillons obtenus après immunoprécipitation sont séparés sur gel d'acrylamide puis digérées par la trypsine et les peptides obtenus sont injectés dans une colonne de chromatographie liquide pour être séparés selon leur hydrophobicité. Les peptides ont ensuite été détectés et analysés par le spectromètre de masse.

Nous avons réalisé quatre expériences indépendantes afin d'identifier les protéines SUMO2/3ylées de la synapse. Nous avons obtenu une liste finale de 803 protéines synaptiques modifiées par SUMO2/3 retrouvées dans au moins 3 des 4 expériences dont 36% sont présentes dans les 4 expériences. Nous retrouvons d'ailleurs dans nos résultats de MS/MS des protéines synaptiques déjà montrées comme étant SUMOylées dans la littérature comme par exemple, DJ-1/ Park 7 (Guerra de Souza *et al.*, 2016), la Tubuline (Feng *et al.*, 2021) ou encore les Ras/Rab, facteurs impliqués dans les voies de signalisation (Choi *et al.*, 2018; Striz *et al.*, 2018). Parmi les nouvelles cibles du SUMOylome synaptique, on retrouve notamment des récepteurs aux neurotransmetteur comme mGluR3, les sous-unité 1 et 2b des rNMDAs ou encore les récepteurs GABAergiques, des transporteurs tels que VGLUT1 ou des transpoteurs du GABA, des protéines d'échafaudage comme PSD95, HOMER1, et SynGAP, des protéines des vésicules synaptiques tels que SV2B, Synaptotagmin-5 et VAP-A ainsi que des protéines impliquées dans les voies de signalisation comme la CaMKIV, la PKC ou encore des MAPKs (Annexe 5 Tableau Supp 3).

Pour valider biochimiquement la liste de protéines synaptiques SUMO2/3ylées obtenue par MS, nous avons sélectionné 5 cibles (Ubc9, Flotillin-1, PSD95, SynGAP et PKC) et optimisé le protocole d'Immunoprécipitation afin d'étudier la SUMOylation des cibles spécifiques (Fig. 32-36). Les formes SUMOylées de ces cibles ont été détectées par immunoblot après immunoprécipitation des protéines synaptiques SUMOylées et/ou de la protéine cible.

Ubc9 est l'enzyme de conjugaison de la voie de SUMOylation et est déjà connue pour être cible de la SUMOylation. La forme non modifiée de Ubc9 migre à 17 kDa et est présente dans le cytosol mais pas dans la fraction synaptique où l'on voit une forme à 40 kDa correspondant à Ubc9 SUMO1-ylée (Loriol *et al.*, 2012 ; Fig. 32 panneau de gauche). Les immunoblots montrent que l'enzyme de conjugaison Ubc9 présente 4 formes SUMO2/3-ylées à de plus hauts poids moléculaires : 27 kDa, 33 kDa, 38kDa et 43kDa (Fig. 32).

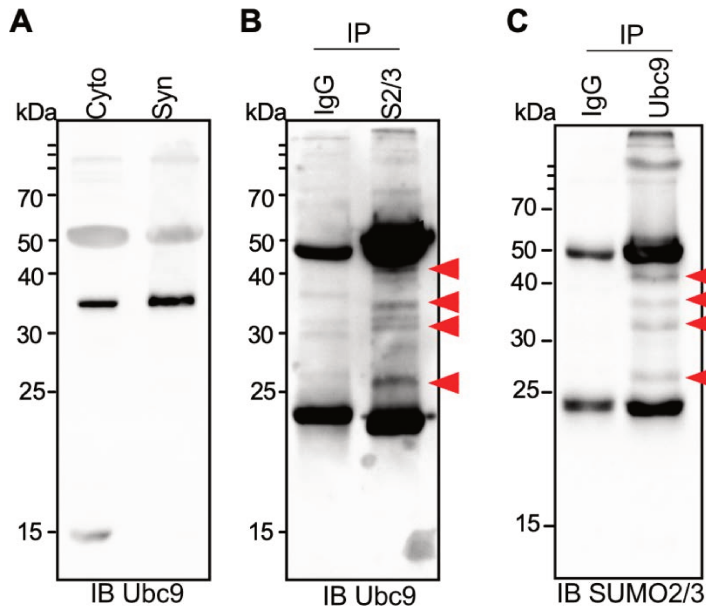
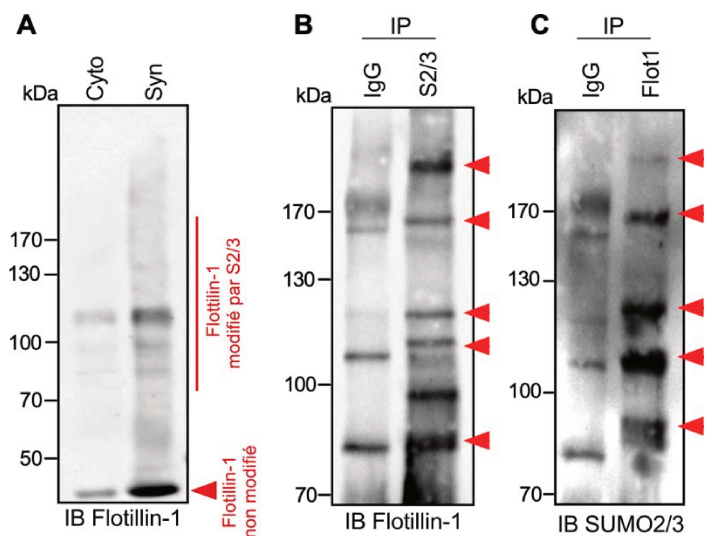


Figure 32. Ubc9 est SUMO2/3-ylée à la synapse.
A Immunoblot anti-Ubc9 des fractions cytoplasmiques (Cyto) et synaptosomales (Syn).
B-C Immunoblots montrant les formes SUMOylées de Ubc9 après immunoprécipitations SUMO2/3 (**B** ; n=3) et Ubc9 (**C** ; n=3). Les formes SUMOylées sont identifiées par des flèches rouges.

La Flotilline-1 est une protéine associée au raft lipidique et est impliquée dans l'endocytose et le trafic vésiculaire. Elle a été montrée comme cible de la SUMOylation dans des lignées cellulaires prostatiques humaines en utilisant une méthode de surexpression (Jang *et al.*, 2019) mais pas dans les neurones. Les immunoblots pour les IP SUMO2/3 et IP Flotillin-1 montrent que la Flotillin-1 a plusieurs formes SUMO2-ylées de plus hauts poids moléculaires : un doublet à 80 kDa, ainsi que des formes modifiées à 110, 120, 170 et 200 kDa (Fig. 33).

Figure 33. La Flotilline-1 est modifiée par SUMO2/3 à la synapse.

A Immunoblot anti-Flotilline-1 des fractions cytoplasmiques (Cyto) et synaptosomales (Syn).
B-C Immunoblots montrant les formes SUMOylées de Flotilline-1 après immunoprécipitations SUMO2/3 (**B** ; n=3) et Flotilline-1 (**C** ; n=3). Les formes SUMOylées sont identifiées par des flèches rouges.



La protéine SynGAP est fortement enrichie dans les épines dendritiques. C'est un composant du complexe de signalisation associés aux rNMDAs et régule négativement l'activité des petites GTPases ainsi que le trafic des rAMPA à la surface postsynaptique. Les immunoblots montrent la présence d'un doublet de la protéine SynGAP dans les IP SUMO2/3 au même poids que la forme non modifiée. Ce résultat a été confirmé par IP de SynGAP et immunoblot à l'aide de l'anticorps SUMO2/3 (Fig. 34).

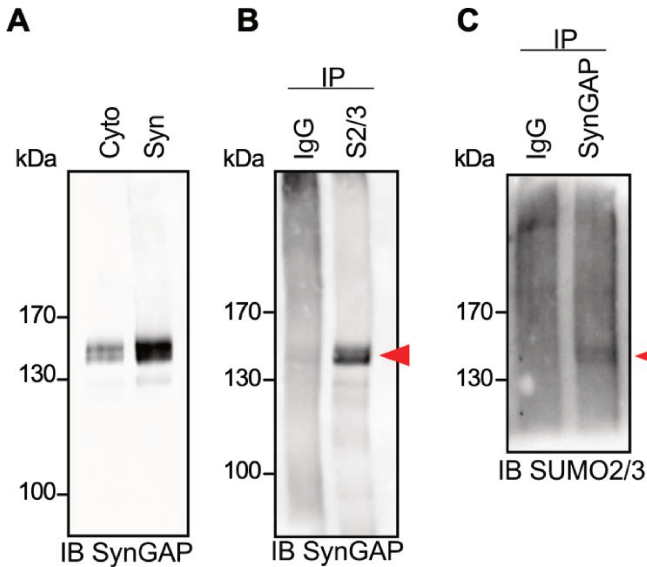


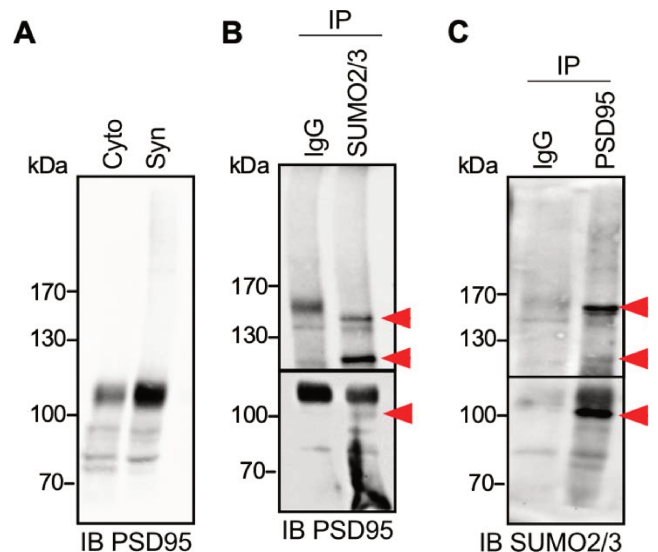
Figure 34. SynGAP, protéine majoritaire de la PSD est SUMO2/3-ylée.

A Immunoblot anti-SynGAP des fractions cytoplasmiques (Cyto) et synaptosomales (Syn). **B-C** Immunoblots montrant les formes SUMOylées de SynGAP après immunoprécipitations SUMO2/3 (**B**; n=8) et SynGAP (**C**; n=3). Les formes SUMOylées sont identifiées par des flèches rouges.

PSD95 est un élément central de la synapse et interagit avec les récepteurs du glutamate, les molécules d'adhésion et les éléments du cytosquelette. L'immunoblot pour l'IP SUMO2/3 montre une bande intense à 120 kDa ainsi qu'un doublet à 150 kDa (Fig. 35 ; panneau de gauche). L'immunoblot pour l'IP PSD95 montrent une bande majeure qui migre en dessous de la forme non modifiée (environ 100 kDa) ainsi qu'une bande intense à 150 kDa (Fig. 35 ; panneau de droite). Cette différence d'intensité des formes SUMOylées entre les 2 IP proviendrait de l'utilisation de 2 anticorps différents. Ils pourraient immunoprécipiter préférentiellement une forme plutôt qu'une autre. De plus, on retrouve aussi la forme majoritaire non modifiée dans les immunoprécipitations IgG, SUMO2/3 et PSD95, qui pourrait correspondre à une liaison aspécifique de PSD95 aux billes ou encore une dégradation de PSD95-SUMO.

Figure 35. PSD95, protéine centrale de la synapse, est SUMO2/3ylée.

A Immunoblot anti-PSD95 des fractions cytoplasmiques (Cyto) et synaptosomales (Syn). **B-C** Immunoblots montrant les formes SUMOylées de PSD95 après immunoprécipitations SUMO2/3 (**B**; n=3) et PSD95 (**C**; n=3). Les formes SUMOylées sont identifiées par des flèches rouges.



Enfin, la PKC, qui est une kinase notamment impliquée dans la voie de signalisation des récepteurs mGluR du groupe I. Certaines isoformes ont été rapportées SUMOylées mais jamais à la synapse. Seules les immunoprécipitations SUMO2/3 suivies d'immunoblots avec un anticorps anti-PKC ont été réalisées. Ces résultats montrent la présence de plusieurs formes SUMOylées de la PKC : un doublet vers 100 kDa, une bande à 120, à 170, à 180 kDa et au-dessus de 200 kDa (Fig. 36). Nous pouvons observer ses formes modifiées dans la fraction synaptosomale avant immunoprécipitation (Fig. 36 ; panneau de gauche).

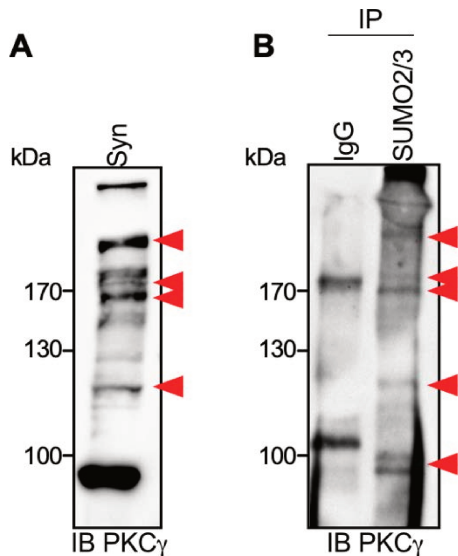


Figure 36. PKC γ est modifiée par SUMO2/3 à la synapse.

A Immunoblot anti-PKC γ de la fraction synaptosomale (Syn). *B* Immunoblot montrant les formes SUMOylées de PKC γ après immunoprécipitations SUMO2/3 (n=3). Les formes SUMOylées sont identifiées par des flèches rouges.

4- Analyse bio-informatique du SUMOylome synaptique

Pour évaluer le rôle biologique et fonctionnel du SUMO2/3-ylome synaptique, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement des termes GO liés aux compartiments cellulaires (Fig. 37A), aux voies biologiques (Fig. 37B), ou d'enrichissement pour les voies KEGG (Fig. 37C) par rapport au protéome de rat.

Les protéines du SUMOylome synaptique sont enrichies dans les groupes cellulaires associés à la synapse (dendritic spine, distal axon, post-synaptic specialization, ...), aux mitochondries (mitochondrial membrane, mitochondrial protein complexes, ...) ou encore aux vésicules (vesicle membrane, transport vesicle, ...) ce qui est cohérent avec la qualité de la fraction synaptique utilisée pour identifier les protéines synaptiques SUMO2/3ylées (Fig. 37A). En ce qui concerne les voies biologiques, les protéines du SUMOylome sont enrichies dans des groupes fonctionnels associés au développement de la dendrite (36 protéines présentent dans le SUMOylome sur 301 protéines associées au groupe fonctionnel), à la régulation du transport intracellulaire (46/454) et la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine (25/175 ; Fig. 37B).

Nous avons ensuite soumis notre SUMOylome synaptique à l'analyse d'enrichissement pour les voies KEGG/Reactome. Les résultats montrent que les protéines SUMO2/3-ylées synaptiques sont enrichies dans les synapses glutamatergiques, GABAergiques ou dopaminergiques, ou encore dans la plasticité synaptique, la

régulation de l'endo/exocytose des vésicules et les fonctions mitochondriales, deux processus liés à la fonction synaptique, enrichies dans notre SUMOylome (Fig. 37C).

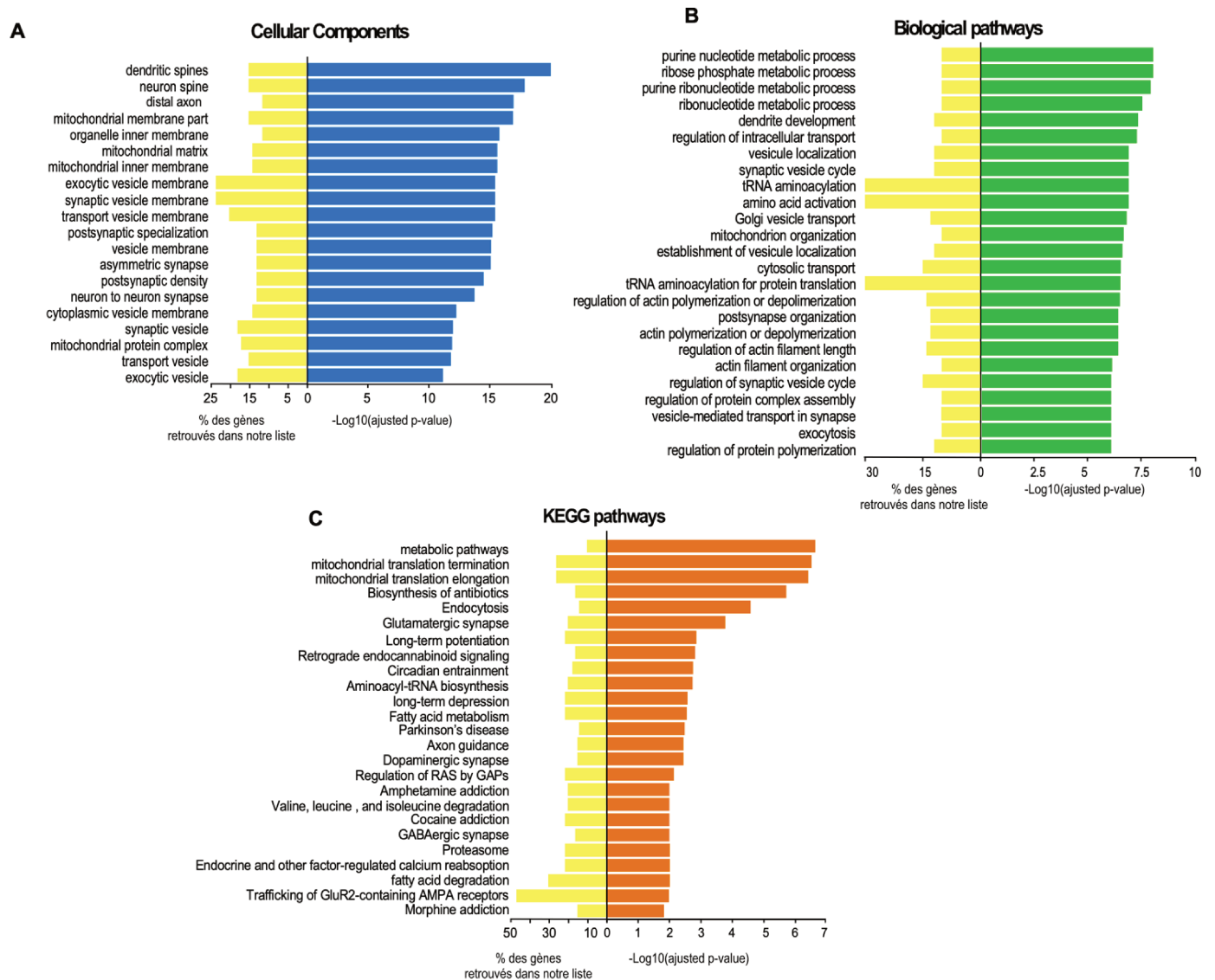


Figure 37. Analyse d'enrichissement des termes du SUMO2/3ylome à partir des bases de données Gene Ontology, KEGG, Reactome.

La liste a été soumise à des analyses d'enrichissement pour la composition cellulaire (A), les fonctions biologiques (B) ainsi que les voies KEGG/Reactome (C) contre le protéome de rat. Les différentes catégories ont été classées selon le $-\text{Log}_{10}$ de la p -value ajustée. Le pourcentage de gènes du SUMOylome associé aux catégories est indiqué sous forme d'un histogramme.

Grâce aux outils STRING et Cytoscape, nous avons pu analyser l'interconnectivité entre les protéines du SUMOylome synaptique sur la base de l'ensemble des liens proposés par STRING. Ce réseau a été restreints aux liens expérimentaux afin de dégager les protéines physiquement connectées. Ce réseau d'interactions, présenté Fig. 38, est un grand réseau très organisé qui comprend 68% du SUMOylome dans le regroupement

principal. L'analyse en sous-groupes de ce réseau permet d'identifier 96 sous-complexes. Parmi ces sous-groupes, j'ai choisi de détailler 4 sous-regroupements qui interviennent dans plusieurs processus de la synapse (Fig. 38). On retrouve notamment 2 regroupements de protéines fonctionnellement reliées au protéasome et aux ribosomes mitochondriaux. Les protéines du protéasome et du ribosome mitochondrial ont largement été rapportées dans différents SUMO protéomes non cérébraux (Hendriks *et al.*, 2014; Pfammatter *et al.*, 2018). On retrouve également un groupe composé de protéines présents à la PSD et un groupe de protéines appartenant au complexe rétromère impliqué dans le trafic intracellulaire.

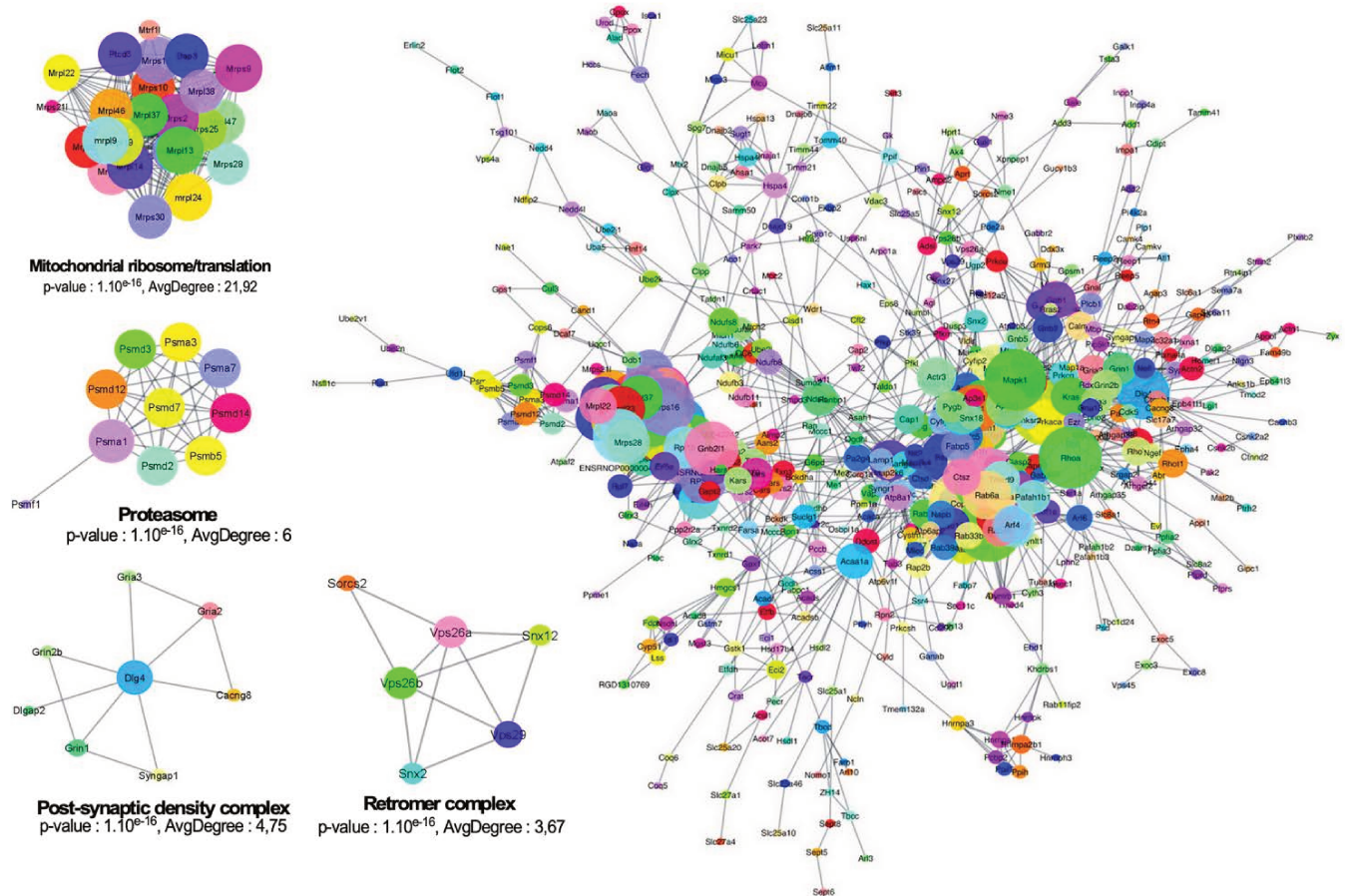


Figure 38. Organisation du réseau synaptique des protéines SUMO2/3-ylées.

Analyse du réseau STRING de toutes les protéines identifiées par MS/MS. Confiance d'interaction : > 0,7. (B) Sous-complexe résultant d'une analyse plus stricte (346 protéines) ont été regroupée sous forme d'un graphe utilisant Markov Cluster Algorithm. On obtient 96 sous complexes dont les 4 groupes d'interaction présentés à gauche qui ont un « average degree » > à 3.

Par ailleurs, on retrouve dans notre liste, des protéines associées à des pathologies neuronales telles que la maladie de Parkinson ou encore les addictions (Fig. 39). C'est pourquoi, la liste du SUMOylome synaptique a été soumise à l'outil Toppgene et à la base de données DisGeNet pour associer les protéines retrouvées modifiées par SUMO à des maladies. De manière intéressante, nous retrouvons des pathologies déjà associées

à la dérégulation de la SUMOylation telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, et d'Huntington. Nous montrons que des protéines présentes dans notre SUMOylome sont également associées à des maladies psychiatriques comme les troubles bipolaires et la schizophrénie ainsi qu'à troubles du neurodéveloppement tels que les troubles autistiques ou l'épilepsie (Fig. 39).

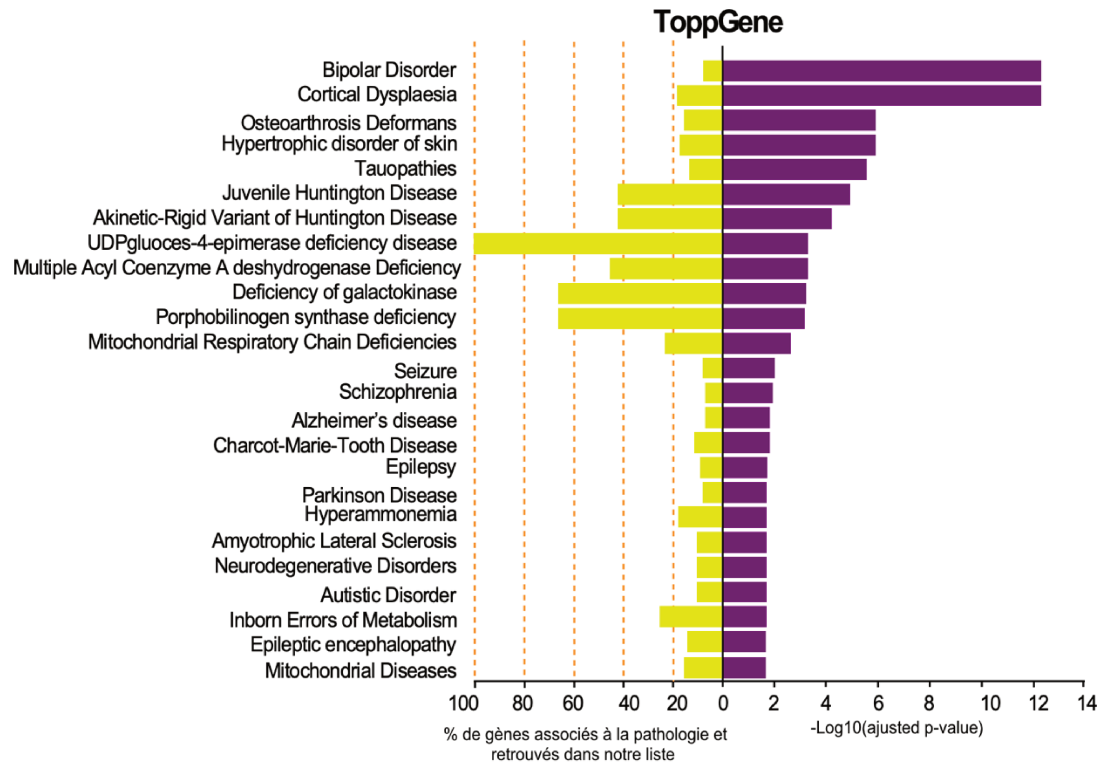


Figure 39. Analyse de l'enrichissement des pathologies associées au SUMO2/3-ylome synaptique. Les protéines du SUMO2/3-ylome synaptique ont été corrélées avec des pathologies à l'aide de l'outil ToppGene. Les catégories ont été classées en fonction de leur $-\text{Log}_{10}$ de la p-value ajustée. Le pourcentage de gènes du SUMOylome associé aux catégories est indiqué sous forme d'un histogramme.

Discussion

Comparaison de notre synaptome et SUMOylome synaptique à la littérature

Pour étudier la qualité du synaptome obtenu par MS/MS, nous avons tout d'abord étudié la localisation des protéines. Nous montrons que 61,5% de protéines sont cytosoliques, 33,5% sont connues pour avoir une localisation mixte (nucléaire et cytosolique), 3,8% ont une localisation non documentée dans la base de données et 1,1% des protéines (soit 5 protéines) ont une localisation nucléaire (Fig. 40A). Nous avons ensuite comparé notre synaptome avec 11 autres synaptomes récents de la littérature (Noya *et al.*, 2019; Heo *et al.*, 2018; Koopmans *et al.*, 2018; Pandya *et al.*, 2017; Bayes *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2015; Biesemann *et al.*, 2014; Carney *et al.*, 2014; Moczulska *et al.*, 2014; Wilhelm *et al.*, 2014; Végh *et al.*, 2012). 86% (3767/4379) des protéines de notre synaptome sont retrouvées dans au moins 3 études publiées et 96% (4213/4379) des protéines sont retrouvées au moins une fois dans la littérature (Fig. 40B). L'ensemble des données que nous avons collecté par approches biochimiques et d'analyses bio-informatiques de nos échantillons synaptiques ainsi que ces comparaisons à la littérature confirment l'enrichissement en protéines synaptiques ou associées à la synapse dans notre préparation de départ et souligne la qualité des préparations synaptosomales en amont des immunoprécipitations des protéines SUMOylées.

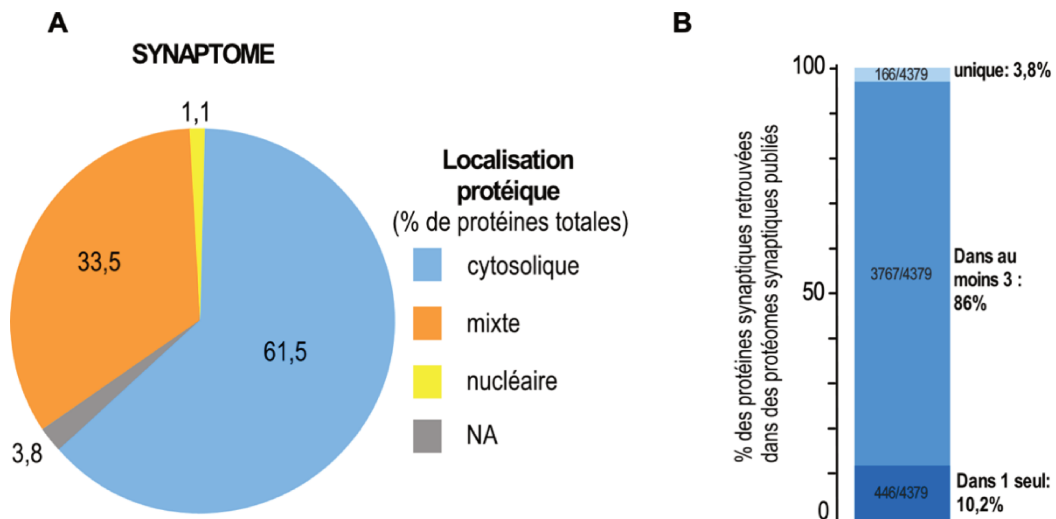


Figure 40. Comparaison de notre synaptome à la littérature

A Analyse de la localisation connue des protéines de notre synaptome. **B** Comparaison de notre synaptome à 11 autres synaptomes publiés.

Pour analyser la pertinence du SUMOylome synaptique, nous avons comparé notre liste de 803 protéines aux au synaptome obtenu par MS/MS et aux autres synaptomes mentionnés ci-dessus. 21 protéines du SUMOylome synaptique ne sont retrouvées dans aucun des synaptomes précédemment mentionnés. De

manière intéressante, parmi les protéines non retrouvées, on identifie Ubc9 et SUMO2. Cela pourrait s'expliquer par la faible expression de SUMO et de l'enzyme de conjugaison dans le compartiment synaptique à l'état basal. De plus, ce sont des protéines de faible poids moléculaire, qui présentent donc un petit nombre de peptides post-digestion à la trypsine. Ceci pourrait rendre difficile l'identification des peptides uniques de Ubc9 et SUMO due à la complexité de l'échantillon à analyser en MS. 87% des protéines identifiées dans le SUMOylome synaptique sont retrouvées dans au moins 3 des synaptomes étudiés (**Annexe 5 Tableau Supp 4**). Quand nous comparons le SUMOylome synaptique à des protéomes plus spécifiques des composants synaptiques tels que la zone présynaptique (Weingarten *et al.*, 2015), la fente synaptique (Cijssouw *et al.*, 2018), les mitochondries synaptiques (Stauch *et al.*, 2015) ou encore les complexes multiprotéiques de la synapse tels que les interacteurs des récepteurs du glutamate AMPAR (Chen *et al.*, 2014) ; mGlu5R (Farr *et al.*, 2004) ou NMDAR (Bayés *et al.*, 2014). Les données du SUMOylome chevauchent largement l'ensemble des protéines synaptosomales caractérisé dans la littérature démontrant ainsi que les protéines du SUMOylome synaptique sont connectées au compartiment synaptique.

SUMOylation à la synapse : la controverse ?

Nous avons comparé le SUMOylome synaptique à deux SUMOylomes cérébraux (Yang *et al.*, 2014; Hendriks *et al.*, 2018) chez le rongeur et uniquement 4,7% des protéines de notre liste ont été retrouvés dans ces deux analyses protéomiques. Ce chevauchement faible s'explique par le fait que les niveaux de SUMOylation dans le cytosol et plus particulièrement dans les synapses (**Fig. 29B**) sont très bas en comparaison des niveaux de SUMOylation retrouvés dans le cerveau entier ou encore dans le noyau. Nous estimons aussi que la fraction nucléaire est au minimum 100x plus abondante en protéines SUMOylées que pour la fraction synaptique (**Fig. 29B**). De plus, ces 2 analyses de protéomique ont été réalisées sur des extraits issus d'un cerveau entier d'une souris adulte. Le volume de la synapse par rapport au reste du neurone est négligeable d'où la nécessité d'enrichir notre échantillon en protéine synaptique grâce au fractionnement subcellulaire. L'ensemble de ces remarques laissent penser que les analyses protéomiques précédentes ont identifiés peu de protéines cytosoliques et synaptiques et de nombreuses cibles nucléaires modifiées par SUMO du fait que 1) elles sont plus abondantes dans le noyau qu'ailleurs et que 2) à l'âge adulte, la SUMOylation cérébrale n'est pas à son maximum.

Les principales difficultés rencontrées dans l'étude de la SUMOylation sont : 1) la nature dynamique et réversible du processus de SUMOylation ; 2) la faible proportion des protéines modifiées dans un extrait tissulaire. Comme montré précédemment dans ce manuscrit ainsi que dans une des publications du laboratoire (Loriol *et al.*, 2012), les niveaux globaux de protéines modifiées par SUMO2/3 augmentent au cours du développement cérébral avec un pic 14 jours après la naissance pour diminuer et atteindre des niveaux

relativement faibles à l'âge adulte. Pour contourner ces difficultés nous avons utilisé des cerveaux de rats âgés de 14 jours, moment où la SUMOylation cérébrale est à son maximum. Nous avons, à partir de ces cerveaux, purifié et enrichi en protéine synaptique, isolé les protéines synaptiques SUMO2/3-ylées par immunoprécipitation avant identification à la spectrométrie de masse. Nous sommes partis d'une grande quantité de matériel puisque chaque fraction synaptosomale provient d'en moyenne 10 cerveaux de jeunes rats (14 JPN). Du fait de la gamme dynamique de détection du spectromètre de masse utilisé dans cette étude, un fractionnement permet d'éviter l'identification de cibles de la SUMOylation prépondérantes des autres compartiments tels que le noyau. Grâce à toutes ces optimisations, nous avons identifié 803 cibles de la SUMOylation à la synapse.

De manière surprenante, nous n'avons pas retrouvé de protéines SUMO1-ylées après IP SUMO2/3. Les protéines SUMO2/3 ont la capacité de former des chaînes poly-SUMO mais pas la protéine SUMO1. SUMO1 ne peut être conjugué qu'à des chaînes poly-SUMO2/3 pour terminer les chaînes poly-SUMO 2/3 (Matic *et al.*, 2008). Le fait que l'on ne détecte pas de protéines SUMO1-ylées après enrichissement en protéines SUMO2/3ylée pourrait être dû au fait que les niveaux de SUMO1-ylation des protéines SUO2/3-ylées de nos échantillons sont trop bas pour être détectés par la méthode employée.

Validation des cibles de la SUMOylation

La SUMOylation de l'enzyme de conjugaison Ubc9 a été documentée dans la littérature. Plusieurs études ont montré principalement Ubc9 conjuguée à SUMO1 (Loriol *et al.*, 2012; Knipscheer *et al.*, 2008; Eisenhardt *et al.*, 2019). La SUMO2-ylation d'Ubc9 a été étudiée *in vitro* (Wiechmann *et al.*, 2017) ou de manière endogène dans des cellules HeLa (Becker *et al.*, 2013) et montre une seule bande à environ 35kDa. Comme ces précédentes études, nous obtenons une bande à environ 35kDa. L'étude des sites de SUMOylation par spectrométrie de masse sur des cellules HeLa surexprimant His10-SUMO2 a permis la détection de 5 sites de SUMOylation pour la protéine Ubc9 (Hendriks *et al.*, 2017). Enfin, l'étude des sites endogènes de SUMOylation dans le cerveau de souris a mis en évidence la présence de 3 sites endogène de la SUMO2-ylation pour Ubc9 (Hendriks *et al.*, 2018). Ces données sont en accord avec les multiples formes SUMOylées que l'on obtient à la synapse par immunoprécipitation et immunoblot (Fig. 32).

La SUMO2-ylation de la Flotillin-1 aussi appelée Reggie-2, a été étudié en surexprimant Ubc9 et SUMO2/3 dans deux lignées cellulaires humaines de cancers prostatiques (Jang *et al.*, 2019). Les auteurs ont montré que la présence de bandes multiples correspondre aux formes SUMOylées de Flotillin-1. Certaines des bandes que nous observons dans nos échantillons correspondent aux bandes retrouvées par Jang et ses collègues. La prédiction des sites de SUMOylation de la Flotillin-1 par trois outils (SUMOsp2.0, SUMO plot et PCI-SUMO) propose 6 sites potentiels de SUMOylation (Jang *et al.*, 2019). De plus, les auteurs mettent en évidence que

dans les lignées cancéreuses PC3 et LNCAP, la Flotillin-1 est SUMOylée sur les résidus lysine K51 et K196 (Jang *et al.*, 2019). Hendriks et ses collègues identifient par MS 5 sites de SUMOylation en position 96, 114, 176, 232 et 352 sur la Flotillin-1 dans les cellules HeLa (Hendriks *et al.*, 2017). Ces différences de sites pourraient être expliquées par le type de tissus ou de cellules étudiées, le stimulus/stress appliqué aux cellules pour l'étude ou encore la technique endogène ou exogène utilisée pour étudier la SUMOylation. Enfin, du fait de la participation de la Flotillin-1 à la formation des synapses excitatrices dans l'hippocampe (Swanwick *et al.*, 2010), il serait intéressant d'étudier le rôle de la SUMOylation de la Flotillin-1 sur la synaptogenèse en utilisant des formes mutées empêchant sa SUMOylation et en mesurant la densité synaptique et la morphologie des épines dendritiques dans ces conditions.

Plusieurs isoformes de la PKC ont été rapportées comme étant SUMOylées dans la littérature (Sun *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2015, Zhao *et al.*, 2020). Des études ont notamment montré une interconnexion entre phosphorylation et SUMOylation de la PKC pour réguler sa stabilité (Wang *et al.*, 2015) mais aussi sa fonction dans le trafic des rKAs (Sun *et al.*, 2014). De manière intéressante, la SUMOylation de la PKC ϵ dans les neurones de la corde dorsale est augmentée en réponse à l'inflammation périphérique ce qui, en retour, augmente la sensibilité du canal TRPV1 (Zhao *et al.*, 2020). L'étude du rôle de la SUMOylation des différentes isoformes de la PKC a été réalisé par mutation de sites de SUMOylation prédits. La PKC γ est exprimée uniquement dans le cerveau et la moelle épinière avec une localisation restreinte aux neurones contrairement aux PKC α et PKC β qui sont exprimées dans de nombreux tissus en plus du cerveau. Au sein du cerveau, l'expression de la PKC γ est la plus abondante dans le cervelet, l'hippocampe et le cortex cérébral. La PKC γ est notamment requise dans différentes fonctions neuronales dont notamment la LTP, la LTD et la modulation de la fonction des récepteurs GABA α (Saito and Shirai, 2002). Enfin, des mutations du gène de la PKC γ ont été liées à des pathologies telles que la maladie de Parkinson (Shahraki and Stone, 2002). Lors de ma thèse, j'ai montré que les formes SUMOylées de la PKC γ sont présentes à la synapse. Il serait tout d'abord important de confirmer les résultats obtenus après IP SUMO2/3 en faisant une immunoprécipitation anti-PKC suivie d'un immunoblot anti-SUMO2/3. Enfin, il serait intéressant d'étudier le rôle de la SUMOylation de la PKC γ lors de l'induction et/ou sur le maintien de la LTP ou de la LTD en exprimant un mutant non SUMOylable de la PKC γ combiné à des techniques de biochimie et d'électrophysiologie.

SynGAP est une Ras-/Rap- GTPase-activating protéine qui va permettre l'hydrolyse du GTP lié aux petites protéines-G en GDP. SynGAP est fortement enrichie dans les épines dendritiques et est un composant du complexe de signalisation associés aux rNMDAs. SynGAP régule négativement l'activité des petites GTPases ainsi que le trafic des rAMPA à la surface postsynaptique (Jeyabalan and Clement, 2016). De plus, SynGAP interagit avec les protéines de la famille des MAGUK comme PSD95 ou SAPA102. Il existe différents variants :

140 kDa (isoforme A), 137 kDa (isoforme B), 134 kDa (isoforme C). Ces isoformes diffèrent dans leur séquence N-terminal. Alors que les isoformes A et B contiennent une séquence peptidique unique et un domaine PH (pleckstrin homology) complet, l'isoforme C est une protéine tronquée sans séquence peptidique ni domaine PH (Jeyabalan and Clement, 2016). Après analyse des sites de SUMOylation de la séquence SynGAP1, GPS SUMO et l'outil JASSA proposent un site consensus en position K149 et des SIM (SUMO Interacting Motif) en position 708-711 pour l'outil JASSA et en position 1266-1270 pour l'outil GPS SUMO. De manière intéressante, le site K149 se trouve dans la partie N-Terminale et est présente pour les isoformes A et B mais absente pour l'isoforme C, ce qui pourrait expliquer que seules ces deux isoformes soient retrouvées sous une forme SUMOylée.

PSD95 est fortement enrichie à la synapse excitatrice. Elle est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles dont la palmitoylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la nitrosylation et la neddylation (Vallejo *et al.*, 2017) régulant ainsi la stabilité et la fonction de la protéine dans les épines dendritiques. Cependant, la SUMOylation de la protéine de même que la fonction de cette SUMOylation n'ont pas été étudiées. Lors de mon projet de thèse, j'ai démontré que PSD95 est une cible de la SUMOylation à la synapse.

PSD95 et SynGAP sont impliquées dans l'organisation de la PSD via leurs interactions et la stabilisation des protéines d'adhésion et de signalisation. La SUMOylation a pour conséquences moléculaires de moduler la localisation subcellulaire des protéines cibles ainsi que leurs interactions protéiques. Nous pourrions donc émettre l'hypothèse que la SUMOylation modulerait la localisation de PSD95 ou SynGAP à la synapse et/ou leurs interactions protéiques à la PSD. Pour cela, il serait intéressant d'évaluer le rôle de SUMOylation sur la localisation synaptique des deux protéines en mutant leurs sites potentiels de SUMOylation les rendant non-SUMOylables et d'étudier leurs effets sur la morphologie synaptique et d'identifier leurs partenaires protéiques par MS/MS. PSD95 et SynGAP participent également à la maturation des synapses et régulent la fonction des rNMDAs et des rAMPAs. Il serait donc intéressant d'évaluer le rôle de la SUMOylation de ces protéines sur ces deux points en surexprimant une forme mutée non-SUMOylable de ces protéines dans les neurones et d'utiliser des techniques de biochimie synaptique, d'imagerie confocale et d'électrophysiologie pour identifier les rôles fonctionnels de la SUMOylation de PSD95 et de SynGAP.

SUMOylation et trafic vésiculaire

La libération des neurotransmetteurs est médiée par l'exocytose des vésicules synaptiques au niveau de la zone active présynaptique des terminaisons nerveuses. Pour permettre des cycles de libération des neurotransmetteurs rapides et répétés, les vésicules synaptiques suivent un cycle de trafic. Le point central de ce cycle est l'exocytose déclenchée par le Ca²⁺, suivie de différentes voies d'endocytose et de recyclage. Le recyclage conduit ensuite à l'amarrage et à l'amorçage des vésicules pour un autre cycle d'exocytose et

d'endocytose. Ces dernières années, l'un des principaux objectifs de la neurobiologie a été de mieux comprendre le mécanisme moléculaire qui régit la libération des neurotransmetteurs. Plus de 1000 protéines différentes sont présentes dans le compartiment présynaptique, et la plupart de ces protéines forment des réseaux denses difficiles à définir et à valider du fait que de nombreuses protéines participent à plus d'une fonction au sein de ce cycle (Sudhof, 2004). La régulation fine des interactions et du cycle vésiculaire reste encore peu explorée.

De manière intéressante, la manipulation des niveaux de SUMOylation à l'intérieur de synaptosomes isolés a des effets sur la libération de neurotransmetteurs suite à une dépolarisation (Feligioni *et al.*, 2009). De plus, l'étude du rôle de la SUMOylation de protéines associées aux vésicules comme RIM α , Syntaxin1A et Synapsin1A démontre une régulation par SUMO de plusieurs composants clé du mécanisme de libération présynaptique (Girach *et al.*, 2013; Craig *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015).

Nous avons observé que les protéines de notre SUMOylome sont enrichies pour le terme cellulaire « vésicule ». On retrouve environ 12% des protéines associées à la localisation (34/288), au transport des vésicules synaptiques (30/262) et au cycle des ces vésicules (31/243) ainsi qu'à la régulation du cycle vésiculaires (23/157).

Parmi les protéines du SUMOylome synaptique identifiées, on retrouve notamment des protéines connues pour être des composants des vésicules synaptiques comme la Synaptotagmin 5, SV2B, VAP-A, Rab3, SCAMP1, etc... (Fig. 41A) et d'autres protéines qui sont associées transitoirement à la membrane des vésicules au cours du cycle endocytose/exocytose comme la Rabphilin-3A, les protéines Arfs, le complexe de nucléation de l'actine ARP2/3, les kinésines ou encore les dynéines, etc ... (Fig. 41B).

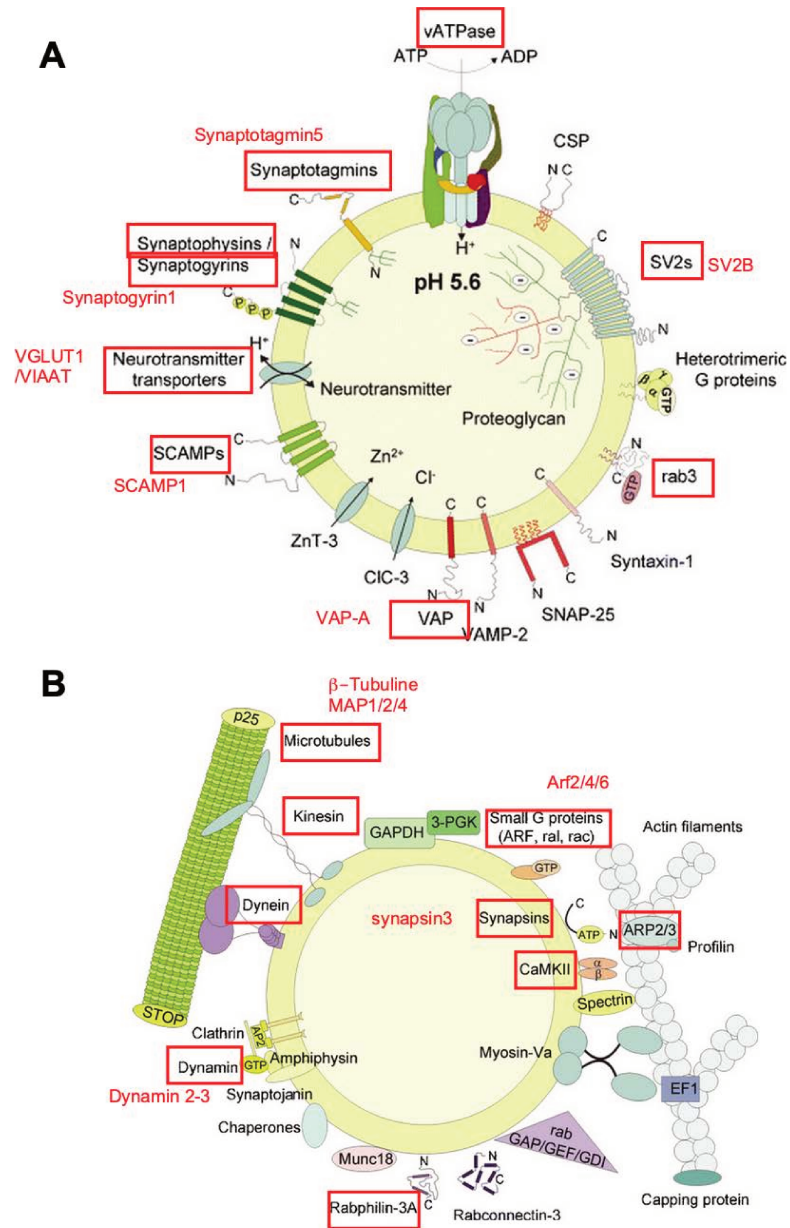


Figure 41. Protéines SUMO2/3-ylées de la vésicule synaptique

A Protéines composant la vésicule synaptique. **B** Protéines associées transitoirement à la vésicule synaptique au corus du cycle vésiculaire. En rouge sont représentées les protéines et leurs isoformes spécifiques retrouvées dans notre SUMOylome synaptique et présentes sur les vésicules synaptiques. (D'après Burré and Volkmandt , 2007)

Ces données tendent à indiquer une implication centrale de la SUMO2/3-ylation dans la régulation de la formation, de la localisation et du trafic des vésicules synaptiques tout au long du cycle vésiculaire. Des études futures sur le rôle de la SUMOylation des protéines associées aux vésicules et présentes dans le SUMO2/3-ylome permettront de mieux comprendre comment la SUMOylation agit dans le maintien du pool vésiculaire, dans son cycle ou encore dans la reformation des vésicules au sein de la présynapse.

SUMOylation et nano-organisation des récepteurs à la postsynapse

La dynamique des rAMPAs repose sur leur transport via de multiples voies telles que le transport vésiculaire intracellulaire via les microtubules, l'exocytose vers la surface cellulaire, l'endocytose ainsi que la diffusion brownienne aléatoire à la surface du neurone. Ces voies sont modulées par l'activité neuronale et contribue à réguler le nombre de rAMPAs disponibles au niveau des synapses, notamment pendant la plasticité synaptique. Cette régulation du nombre de récepteurs résulte d'une interaction dynamique entre biosynthèse des protéines, trafic et stabilisation des récepteurs rAMPAs à la postsynapse. Cependant les mécanismes de régulation de cette dynamique ainsi que la contribution de ces voies restent relativement peu documentés. De plus, les mécanismes qui permettent la localisation synaptique précise en nanodomains en les localisant face aux sites de libération du glutamate, facteur déterminant de l'efficacité de la transmission synaptique, reste à élucider. Le rôle central de ces nanodomains dans la transmission synaptique provient de la faible affinité des rAMPAs pour le glutamate et par le fait qu'ils ne sont activés que par une unique libération de glutamate.

Récemment, Daniel Choquet et Eric Hosy (IINS, CNRS, Bordeaux) ont émis l'hypothèse que la dynamique moléculaire permettant l'organisation des nanodomains pourrait résulter de modifications post-traductionnelles à la postsynapse permettant un enrichissement local de complexes protéiques en interaction avec les rAMPAs (Choquet and Hosy, 2020). Ils citent notamment les protéines PSD95, SynGAP, Homer, CASK, RIM1, Syntaxine et les neuroligines comme interacteurs pré- et postsynaptiques impliqués dans l'organisation de ces domaines. De manière intéressante, toutes ces protéines sont retrouvées soit dans le SUMOylome synaptique, soit dans la littérature comme substrats synaptiques de la SUMOylation (Chao *et al.*, 2008; Craig *et al.*, 2015; Girach *et al.*, 2013). De plus, nos études bio-informatiques montre que 7 protéines sur 15 (soit environ 50%) protéines associées au trafic des rAMPAs contenant la sous-unité GluA2 sont retrouvées dans le SUMOylome synaptique. La SUMOylation, en favorisant les interactions multiples ou, au contraire, la dissociation des complexes macromoléculaires synaptiques, pourrait représenter un moyen de moduler rapidement l'organisation de ces nanodomains rAMPAs en réponse à des variations de l'activation neuronale ou lors d'évènements de plasticité synaptique.

Les rAMPAs ne sont pas les seuls récepteurs organisés sous formes de nanodomains sub-synaptiques. La combinaison d'imagerie à super-résolution et d'électrophysiologie a permis de modéliser l'organisation des différents récepteurs du glutamate à l'échelle nanométrique et de déterminer dans quelle proportion cette nano-organisation participe à la régulation de l'activation de ces récepteurs (Goncalves *et al.*, 2020). Ils ont notamment mis en évidence une organisation centrale des rNMDAs à la PSD entourés par les rAMPAs alors que les mGlu5Rs, eux, se dispersent de manière plus homogène à la surface de la postsynapse. Une analyse comparative du SUMOylome synaptique et d'études spécifiques du complexe mGlu5R montrent que 19

protéines sur les 75 retrouvées associées aux récepteurs mGlu5 sont SUMOylées. On retrouve notamment la protéine HOMER1 dans notre liste, qui participe à la régulation de l'expression de surface des récepteurs mGlu5 et au couplage de ces récepteurs à ces différents partenaires postsynaptiques. De plus, on retrouve aussi des protéines, telles que Rabphilin3A ou la Synaptogyrin, associées aux vésicules synaptiques qui sont impliqués dans l'endocytose et l'exocytose des récepteurs mGlu5.

Compte-tenu des conséquences moléculaires de la SUMOylation et de sa régulation par l'activité neuronale, la SUMOylation se place comme une modification post-traductionnelle d'importance permettant à la fois la modulation de l'organisation de ces nanodomains et le maintien des fonctions synaptiques.

SUMOylation et pathologies cérébrales

La SUMOylation joue un rôle clé dans la régulation des processus fondamentaux des neurones. Il existe de plus en plus de données montrant que l'augmentation de la SUMOylation joue un rôle de neuroprotection. C'est notamment le cas dans la réponse neuronale à la suite d'une ischémie. Les animaux qui hibernent subissent une ischémie prolongée suivie d'une reperfusion qui s'effectue sans dommages en raison d'une forte augmentation de la SUMOylation cérébrale (Lee *et al.*, 2007). A l'inverse, la dérégulation de la balance SUMOylation/désSUMOylation est impliquée dans plusieurs maladies neurologiques et neurodégénératives (Chen *et al.*, 2021). Trois protéines impliquées dans l'étiologie de la maladie de Parkinson, l' α -synucléine, DJ-1 et la Parkine, ont été montrées SUMOylées ou associées à SUMO. Une dérégulation de la SUMOylation cérébrale a été rapportée dans la maladie d'Alzheimer et dans le modèle Alzheimer de souris triple-transgénique Tg2576. Les protéines APP et Tau sont également cibles de la SUMOylation (Dorval *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2014). Du fait de la caractéristique d'agrégation et d'accumulation de ces protéines dans les maladies neurodégénératives, la SUMOylation a été proposée comme un régulateur de la stabilité et/ou la solubilité de ces différentes protéines. Suite aux analyses bio-informatiques du SUMOylome synaptique, nous avons montré que les protéines synaptiques SUMOylées ne sont pas uniquement associées aux maladies neurodégénératives mais également à des pathologies du neurodéveloppement ou maladies psychiatriques comme les troubles autistiques et la schizophrénie (Fig. 39). Ces travaux ouvrent ainsi un nouveau champ d'investigation du rôle de la SUMOylation et sa dérégulation dans ces différentes pathologies.

L'ensemble de ces données, de plus en plus nombreux dans la littérature, suggèrent un rôle essentiel, mais encore mal défini, de la SUMOylation dans la mise en place, la progression et la manifestation de nombreuses maladies cérébrales. Ainsi, définir les mécanismes précis impliqués dans ces pathologies et mettre au point de nouveaux outils ou molécules thérapeutiques ciblant le processus de SUMOylation sont des domaines de recherche à explorer dans le futur.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La SUMOylation est essentielle pour la régulation de la communication et de la plasticité synaptique. Elle apparaît comme une cible thérapeutique potentielle en raison de son implication dans de nombreuses désordres neurologiques ainsi qu'un grand nombre de cancer.

La balance SUMO/désSUMOylation est essentielle pour le maintien de la communication neuronale. Lors de ma thèse j'ai démontré que les récepteurs métabotropiques du glutamate de type I, mGlu1 et mGlu5, sont impliqués dans cette régulation dynamique et opèrent en opposition pour contrôler les niveaux de SENP1 présents au niveau de la postsynapse. L'accumulation postsynaptique de SENP1 en réponse à la seule activation des mGlu5Rs nécessite l'activation préalable de la PKC ou de la CaMKII, en aval de l'activation de ces récepteurs (Fig. 42).

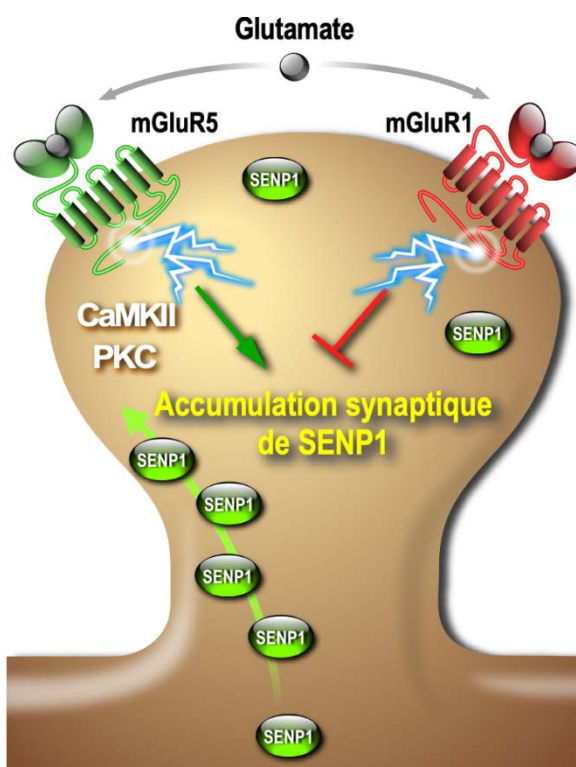


Figure 42. Modèle de régulation bidirectionnelle de la désSUMOylation synaptique par les récepteurs métabotropiques du groupe I.

La régulation de la balance SUMO/désSUMOylation synaptique apparaît plus complexe qu'initialement imaginée. En effet, ces deux processus sont conjointement régulés par l'activation des mGluRs et impliquent l'activation des kinases PKC et CaMKII. Suite à l'activation des mGluRs et à la phosphorylation des protéines synaptiques par la PKC, un piégeage synaptique rapide et transitoire de l'enzyme de conjugaison Ubc9 a lieu

permettant la SUMOylation rapide des protéines cibles synaptiques (Loriol *et al.*,2014). Ceci est ensuite suivie par une diminution de la sortie de SENP1 des épines dendritiques et en conséquence, par une augmentation de la déSUMOylation pour ramener les protéines postsynaptiques modifiées par SUMO à leur niveau basal (**Annexe 2** ; Schorova *et al.*, 2019). J'ai pu de plus mettre en évidence un niveau supplémentaire de complexité en démontrant que les récepteurs mGlu1 agissent comme un frein à l'accumulation de SENP1 dépendante de l'activation concomitante des récepteurs mGlu5 (**Annexe 4** ; Pronot *et al.*).

Parallèlement à ces travaux et pour mieux analyser les conséquences fonctionnelles de la SUMOylation, nous avons identifié un SUMOylome synaptique comprenant 803 protéines. Nous avons mis en évidence des réseaux synaptiques fonctionnels montrant une implication de la SUMOylation dans les fonctions métaboliques, dans l'organisation et les fonctions de la synapse telles que le cycle vésiculaire ou la transmission synaptique. Enfin, nous avons révélé des connexions entre maladies neurologiques et SUMOylome synaptique (**Annexe 5**, Pronot *et al.*).

La comparaison des pathologies associées aux récepteurs mGlu1 et mGlu5 avec celles associées au SUMOylome synaptique montre un chevauchement intéressant. Sur 9 neuropathologies connectées au SUMOylome, 7 sont également associées aux récepteurs mGlu1 et 8 maladies à mGlu5. Du fait de la régulation de la SUMOylation synaptique par les mGluRs du groupe I, il n'est donc pas surprenant d'avoir un chevauchement aussi important. Parmi ces pathologies, on retrouve notamment des maladies du neurodéveloppement telles que l'autisme et la déficience intellectuelle (**Tableau 7**).

Pathologies vs SUMOylome	Pathologies vs mGlu1R	Pathologies vs mGlu5R
Troubles bipolaires	X	X
Tauopathies		
Maladies de Huntington	X	X
Épilepsie	X	X
Schizophrénie	X	X
Maladie d'Alzheimer	X	X
Maladie de Parkinson	X	X
Sclérose latérale amyotrophique		X
Autisme	X	X

Tableau 7. Comparaison des pathologies connectées au SUMOylome ou aux récepteurs mGlu du groupe I.

Le développement normal du cerveau repose essentiellement sur l'action coordonnée dans le temps de processus génétiques et environnementaux, et des altérations dans ces processus peuvent conduire à des troubles du neurodéveloppement. Ces troubles du neurodéveloppement incluent, mais ne se limitent pas seulement à, la déficience intellectuelle et aux troubles de l'attention qui touchent entre 3 et 5 % de la

population mondiale, représentant un défi sociétal majeur. Il est donc important de mieux comprendre l'étiologie et la pathophysiologie de ces maladies afin de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Par exemple, cinq causes monogéniques majeures de la déficience intellectuelle et l'autisme ciblent les gènes *FMR1*, *SYNGAP1*, *MECP2*, *SHANK2/3* et *NLGN3*. Malgré des origines diverses, les effets de ces mutations convergent vers des voies de signalisation communes ou apparentées conduisant à un phénotype typique de la déficience intellectuelle et de l'autisme caractérisé par des déficits socio-cognitifs et émotionnels (Barnes *et al.*, 2015). Cette convergence met en évidence des processus physiopathologiques communs à ces différentes maladies qui pourraient être ciblés par une thérapie. L'un de ces processus est notamment la dérégulation de la signalisation des récepteurs mGlu5 qui entraîne, dans la plupart des cas, des défauts de plasticité synaptique comme la LTD (Bourgeron, 2015).

Lors de ma thèse, j'ai montré que l'activation des mGluRs du groupe I est essentielle au maintien des niveaux de SENP1 synaptiques. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une altération fonctionnelle des mGluRs de type I pourrait directement impacter l'homéostasie de la SUMOylation des protéines synaptiques en dérégulant à la fois la diffusion de Ubc9 et le trafic synapto-dendritique de SENP1 dans les neurones activés.

De manière intéressante, les souris haplodéficientes pour *Senp1* (*Senp1*^{-/-}) montrent une augmentation de la SUMOylation des protéines neuronales associée à des défauts d'interactions sociales, des comportements stéréotypés sans altération des processus d'apprentissage et de mémorisation (Yang *et al.*, 2021). Les souris *Senp1*^{-/-} présentent un développement cérébral anormal avec un élargissement et un épaississement du cortex à la fois chez les mâles et les femelles (Yang *et al.*, 2021). Ces défauts structuraux sont souvent observés chez les patients atteints d'autisme et chez les modèles murins de la maladie (Kwon *et al.*, 2006). De manière intéressante, les défauts d'interactions sociales sont totalement corrigés par la réexpression de SENP1 chez les souris *Senp1*^{-/-}.

Au laboratoire, nous nous sommes intéressés à FMRP, une protéine issue du gène *FMR1* et cible de la SUMOylation. Nous avons montré que l'activation des récepteurs mGlu5 (<5min) permet la SUMOylation de FMRP qui en retour, favorise la dissociation de FMRP des granules de transport ainsi que la libération et la traduction locale des ARNm. Cette traduction locale est nécessaire pour la régulation de l'élimination et la maturation des épines dendritiques (Annexe 1, Khayachi *et al.*, 2018). L'expression de la forme non-SUMOylable de FMRP (FMRP K88,130R) dans des neurones sauvages empêche l'élimination et la maturation des épines conduisant à une hyper-abondance de longues protubérances le long des dendrites similaires à celles observées chez les patients atteints du SXF (Annexe 1, Khayachi *et al.*, 2018). Ces données montrent que la SUMOylation agit comme un mécanisme de régulation dépendant de l'activité neuronale critique pour la fonction de la protéine FMRP.

Les souris Fmr1-KO présentent des défauts similaires avec des protrusions dendritiques immatures très abondantes témoignant d'une altération du processus d'élimination synaptique. Ce processus est corrélé à des anomalies de plasticité synaptique ainsi qu'à des déficits sociocognitifs. De manière intéressante, FMRP joue le rôle de répresseur traductionnel en inhibant la synthèse des protéines requises pour la LTD dépendante de l'activité des mGlu5R. La « théorie du mGluR » propose que la protéine FMRP agit comme un frein à l'expression de la LTD dans les conditions physiologiques (Bear *et al.*, 2004). De manière intéressante, l'absence de FMRP dans les neurones Fmr1-KO conduit à une traduction locale anarchique des ARNm préexistants et, par conséquent, entraîne une réduction de l'expression de rAMPA à la surface suite à une mGluR-LTD exacerbée (Bear *et al.*, 2004). Enfin, il est intéressant de noter que, chez les souris Fmr1-KO, les récepteurs mGlu5 sont davantage associés à la forme courte Homer1a. Homer1a ne peut plus se multimériser et réduit ainsi le couplage de mGlu5R à ses effecteurs (Kammermeier and Worley, 2007).

Compte-tenu des défauts de signalisation des récepteurs mGlu5 chez les souris Fmr1-KO, il serait intéressant d'étudier le trafic des enzymes de la machinerie de SUMOylation ainsi que d'évaluer les niveaux de SUMOylation synaptique chez ces animaux. Nous avons montré que les protéines SUMOylées de la synapse sont impliquées dans l'organisation et la fonction synaptique (**Annexe 5**, Pronot *et al.*). Cette étude pourrait ainsi permettre de déterminer si l'altération des niveaux de SUMOylation liée aux défauts de signalisation des mGlu5R participe aux défauts structuraux et fonctionnels des épines dendritiques dans le SXF.

Le modèle murin KI FMRP-R138Q, généré au laboratoire, présente une densité synaptique accrue associée à des défauts ultrastructuraux de la synapse et une augmentation de l'expression de rAMPA à la surface synaptique. De plus, les souris KI présentent une diminution de la LTP dans l'hippocampe associée à des déficits socio-cognitifs (**Annexe 3**, Prieto *et al.*, 2021). Cependant, l'expression des récepteurs mGlu1 et 5 à la surface ainsi que la LTD dépendante de l'activité de ces récepteurs n'ont pas encore été étudiées chez les souris FMRP-R138Q. Du fait de la présence de la protéine FMRP dans les neurones et de la mutation X-Fragile proche d'un des sites de SUMOylation, il serait intéressant, en plus de l'étude de la signalisation de mGlu5R, d'évaluer les niveaux de SUMOylation de FMRP-R138Q ainsi que ceux des protéines synaptiques.

A terme, ces études permettront de définir une relation entre dérégulation de la SUMOylation due à des mutations faux sens de FMRP et les anomalies fonctionnelles des mGluRs et ainsi, de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent, de manière globale, les maladies où la signalisation des récepteurs mGlu1/5 est dérégulée.

Malgré les efforts consacrés au développement de traitements pour les patients atteints de troubles du neurodéveloppement comme le SXF (*FMR1*), le syndrome de Rett (*MECP2*), le syndrome de Phelan-McDermid (*SHANK3*), ou MRD5 (*SYNGAP1*), il n'existe à ce jour aucune thérapie réellement efficace. Basée sur la théorie

du mGluR, la première stratégie thérapeutique testée en essais cliniques a ciblé le système glutamatergique. Bien que plusieurs études précliniques prometteuses aient réussi à corriger les défauts cellulaires, synaptiques et comportementaux observés dans les modèles animaux de ces maladies, ces thérapies se sont avérées inefficaces en clinique. Il existe donc un besoin réel de développer des thérapies nouvelles et efficaces pour ces pathologies et nos données suggèrent que les récepteurs mGlu1 et mGlu5 ainsi que la SUMOylation pourraient être des cibles thérapeutiques nouvelles et prometteuses pour les maladies du neurodéveloppement pour lesquelles des anomalies de la signalisation des mGluRs ont été rapportées.

REFERENCES

RÉFÉRENCES

- Aiba, A. (1994) 'Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice', *Cell*, 79(2), pp. 365-375.
- Akin, D., Manier, D. H., Sanders-Bush, E. and Shelton, R. C. (2005) 'Signal transduction abnormalities in melancholic depression', *Int J Neuropsychopharmacol*, 8(1), pp. 5-16.
- Akiyama, H., Nakadate, K. and Sakakibara, S. I. (2018) 'Synaptic localization of the SUMOylation-regulating protease SENP5 in the adult mouse brain', *J Comp Neurol*, 526(6), pp. 990-1005.
- Altrock, W. D., tom Dieck, S., Sokolov, M., Meyer, A. C., Sigler, A., Brakebusch, C., Fassler, R., Richter, K., Boeckers, T. M., Potschka, H., Brandt, C., Loscher, W., Grimberg, D., Dresbach, T., Hempelmann, A., Hassan, H., Balschun, D., Frey, J. U., Brandstatter, J. H., Garner, C. C., Rosenmund, C. and Gundelfinger, E. D. (2003) 'Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon', *Neuron*, 37(5), pp. 787-800.
- Anggono, V. and Huganir, R. L. (2012) 'Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity', *Curr Opin Neurobiol*, 22(3), pp. 461-9.
- Ango, F., Prezeau, L., Muller, T., Tu, J. C., Xiao, B., Worley, P. F., Pin, J. P., Bockaert, J. and Fagni, L. (2001) 'Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer', *Nature*, 411(6840), pp. 962-5.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. and Haydon, P. G. (1999) 'Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner', *Trends in Neurosciences*, 22(5), pp. 208--215.
- Baas, P. W., Deitch, J. S., Black, M. M. and Banker, G. A. (1988) 'Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(21), pp. 8335-9.
- Barberis, A., Sachidhanandam, S. and Mulle, C. (2008) 'GluR6/KA2 kainate receptors mediate slow-deactivating currents', *J Neurosci*, 28(25), pp. 6402-6.
- Barnes, S. A., Wijetunge, L. S., Jackson, A. D., Katsanevaki, D., Osterweil, E. K., Komiyama, N. H., Grant, S. G., Bear, M. F., Nägerl, U. V., Kind, P. C. and Wyllie, D. J. (2015) 'Convergence of Hippocampal Pathophysiology in Syngap+/- and Fmr1-/y Mice', *J Neurosci*, 35(45), pp. 15073-81.
- Barysch, S. V., Dittner, C., Flotho, A., Becker, J. and Melchior, F. (2014) 'Identification and analysis of endogenous SUMO1 and SUMO2/3 targets in mammalian cells and tissues using monoclonal antibodies', *Nat Protoc*, 9(4), pp. 896-909.
- Bats, C., Groc, L. and Choquet, D. (2007) 'The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking', *Neuron*, 53(5), pp. 719-734.
- Bayés, À., Collins, M. O., Galtrey, C. M., Simonnet, C., Roy, M., Croning, M. D., Gou, G., van de Lagemaat, L. N., Milward, D., Whittle, I. R., Smith, C., Choudhary, J. S. and Grant, S. G. (2014) 'Human post-mortem synapse proteome integrity screening for proteomic studies of postsynaptic complexes', *Mol Brain*, 7, pp. 88.
- Bayes, A., Collins, M. O., Reig-Viader, R., Gou, G., Goulding, D., Izquierdo, A., Choudhary, J. S., Emes, R. D. and Grant, S. G. (2017) 'Evolution of complexity in the zebrafish synapse proteome', *Nat Commun*, 8, pp. 14613.
- Bear, M. F., Huber, K. M. and Warren, S. T. (2004) 'The mGluR theory of fragile X mental retardation', *Trends Neurosci*, 27(7), pp. 370-7.

- Beauclair, G., Bridier-Nahmias, A., Zagury, J. F., Saib, A. and Zamborlini, A. (2015) 'JASSA: a comprehensive tool for prediction of SUMOylation sites and SIMs', *Bioinformatics*, 31(21), pp. 3483-91.
- Becker, J., Barysch, S. V., Karaca, S., Dittner, C., Hsiao, H. H., Berriel Diaz, M., Herzig, S., Urlaub, H. and Melchior, F. (2013) 'Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues', *Nat Struct Mol Biol*, 20(4), pp. 525-31.
- Beebe, S. J. (1994) 'The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction', *Semin Cancer Biol*, 5(4), pp. 285-94.
- Benson, M., Iniguez-Lluhi, J. A. and Martens, J. (2017) 'Sumo Modification of Ion Channels', *Adv Exp Med Biol*, 963, pp. 127-141.
- Beqollari, D. and Kammermeier, P. J. (2010) 'Venus fly trap domain of mGluR1 functions as a dominant negative against group I mGluR signaling', *J Neurophysiol*, 104(1), pp. 439-48.
- Bernstock, J. D., Peruzzotti-Jametti, L., Leonardi, T., Vicario, N., Ye, D., Lee, Y. J., Maric, D., Johnson, K. R., Mou, Y., Van Den Bosch, A., Winterbone, M., Friedman, G. K., Franklin, R. J. M., Hallenbeck, J. M. and Pluchino, S. (2019) 'SUMOylation promotes survival and integration of neural stem cell grafts in ischemic stroke', *EBioMedicine*, 42, pp. 214-224.
- Bernstock, J. D., Ye, D. G., Griffin, A., Lee, Y. J., Lynch, J., Latour, L. L., Friedman, G. K., Maric, D. and Hallenbeck, J. M. (2017) 'Cerebral Ischemia Increases Small Ubiquitin-Like Modifier Conjugation within Human Penumbra Tissue: Radiological-Pathological Correlation', *Front Neurol*, 8(JAN), pp. 738.
- Biederer, T. and Sudhof, T. C. (2001) 'CASK and protein 4.1 support F-actin nucleation on neuexins', *J Biol Chem*, 276(51), pp. 47869-76.
- Biesemann, C., Gronborg, M., Luquet, E., Wichert, S. P., Bernard, V., Bungers, S. R., Cooper, B., Varoqueaux, F., Li, L., Byrne, J. A., Urlaub, H., Jahn, O., Brose, N. and Herzog, E. (2014) 'Proteomic screening of glutamatergic mouse brain synaptosomes isolated by fluorescence activated sorting', *EMBO J*, 33(2), pp. 157-70.
- Bingol, B. and Schuman, E. M. (2005) 'Synaptic protein degradation by the ubiquitin proteasome system', *Curr Opin Neurobiol*, 15(5), pp. 536-41.
- Bingol, B., Wang, C. F., Arnott, D., Cheng, D., Peng, J. and Sheng, M. (2010) 'Autophosphorylated CaMKIIalpha acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines', *Cell*, 140(4), pp. 567-78.
- Bliss, T. V. P. and Collingridge, G. L. (1993) 'A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus', *Nature*, 361, pp. 31--39.
- Bockaert, J., Perroy, J., Bécamel, C., Marin, P. and Fagni, L. (2010) 'GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, pp. 89-109.
- Bohren, K. M., Nadkarni, V., Song, J. H., Gabbay, K. H. and Owerbach, D. (2004) 'A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus', *J Biol Chem*, 279(26), pp. 27233-8.
- Borges, K. and Dingledine, R. (1998) 'AMPA receptors: molecular and functional diversity', *Prog Brain Res*, 116, pp. 153-70.
- Borovok, N., Neshet, E., Levin, Y., Reichenstein, M., Pinhasov, A. and Michaelievski, I. (2016) 'Dynamics of Hippocampal Protein Expression During Long-term Spatial Memory Formation', *Mol Cell Proteomics*, 15(2), pp. 523-41.
- Bortolotto, Z. A., Lauri, S., Isaac, J. T. R. and Collingridge, G. L. (2003) 'Kainate receptors and the induction of mossy fibre long-term potentiation', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358, pp. 657--666.

- Bossis, G., Sarry, J. E., Kifagi, C., Ristic, M., Saland, E., Vergez, F., Salem, T., Boutzen, H., Baik, H., Brockly, F., Pelegrin, M., Kaoma, T., Vallar, L., Recher, C., Manenti, S. and Piechaczyk, M. (2014) 'The ROS/SUMO axis contributes to the response of acute myeloid leukemia cells to chemotherapeutic drugs', *Cell Rep*, 7(6), pp. 1815-23.
- Boulanger, M., Paolillo, R., Piechaczyk, M. and Bossis, G. (2019) 'The SUMO pathway in hematological malignancies and their response to therapies', *Int J Mol Sci*, 20.
- Bourgeron, T. (2015) 'From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder', *Nature Reviews Neuroscience*, 16(9), pp. 551-563.
- Bourne, J. N. and Harris, K. M. (2008) 'Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines', *Annu Rev Neurosci*, 31(1), pp. 47-67.
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y. and Sudhof, T. C. (1995) 'Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins', *J Biol Chem*, 270(42), pp. 25273-80.
- Bureau, I., Dieudonne, S., Coussen, F. and Mulle, C. (2000) 'Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), pp. 6838-43.
- Bursomanno, S., Beli, P., Khan, A. M., Minocherhomji, S., Wagner, S. A., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Choudhary, C., Hickson, I. D. and Liu, Y. (2015a) 'Proteome-wide analysis of SUMO2 targets in response to pathological DNA replication stress in human cells', *DNA Repair (Amst)*, 25, pp. 84-96.
- Bursomanno, S., McGouran, J. F., Kessler, B. M., Hickson, I. D. and Liu, Y. (2015b) 'Regulation of SUMO2 target proteins by the proteasome in human cells exposed to replication stress', *J Proteome Res*, 14(4), pp. 1687-99.
- Bykhovskaia, M. (2011) 'Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools', *Semin Cell Dev Biol*, 22, pp. 387--392.
- Carlin, R. K., Grab, D. J., Cohen, R. S. and Siekevitz, P. (1980) 'Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities', *J Cell Biol*, 86(3), pp. 831-45.
- Carmichael, R. E. and Henley, J. M. 2018. Transcriptional and post-translational regulation of Arc in synaptic plasticity.
- Carney, K. E., Milanese, M., van Nierop, P., Li, K. W., Oliet, S. H., Smit, A. B., Bonanno, G. and Verheijen, M. H. (2014) 'Proteomic analysis of gliosomes from mouse brain: identification and investigation of glial membrane proteins', *J Proteome Res*, 13(12), pp. 5918-27.
- Cartier, E., Garcia-Olivares, J., Janezic, E., Viana, J., Moore, M., Lin, M. L., Caplan, J. L., Torres, G. and Kim, Y. H. (2019) 'The SUMO-Conjugase Ubc9 Prevents the Degradation of the Dopamine Transporter, Enhancing Its Cell Surface Level and Dopamine Uptake', *Front Cell Neurosci*, 13(February), pp. 35.
- Casimiro, T. M., Sossa, K. G., Uzunova, G., Beattie, J. B., Marsden, K. C. and Carroll, R. C. (2011) 'mGluR and NMDAR activation internalize distinct populations of AMPARs', *Mol Cell Neurosci*, 48(2), pp. 161-70.
- Castillo-Lluva, S., Tatham, M. H., Jones, R. C., Jaffray, E. G., Edmondson, R. D., Hay, R. T. and Malliri, A. (2010) 'SUMOylation of the GTPase Rac1 is required for optimal cell migration', *Nat Cell Biol*, 12(11), pp. 1078-85.
- Castillo, P. E., Schoch, S., Schmitz, F., Sudhof, T. C. and Malenka, R. C. (2002) 'RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation', *Nature*, 415(6869), pp. 327-30.
- Castro, L., Yapo, C. and Vincent, P. (2016) '[Physiopathology of cAMP/PKA signaling in neurons]', *Biol Aujourd'hui*, 210(4), pp. 191-203.

- Chamberlain, S. E., Gonzalez-Gonzalez, I. M., Wilkinson, K. A., Konopacki, F. A., Kantamneni, S., Henley, J. M. and Mellor, J. R. (2012) 'SUMOylation and phosphorylation of GluK2 regulate kainate receptor trafficking and synaptic plasticity', *Nat Neurosci*, 15(6), pp. 845-52.
- Chang, A., Li, P. P. and Warsh, J. J. (2003) 'Altered cAMP-dependent protein kinase subunit immunolabeling in post-mortem brain from patients with bipolar affective disorder', *J Neurochem*, 84(4), pp. 781-91.
- Chang, R. Y., Etheridge, N., Nouwens, A. S. and Dodd, P. R. (2015) 'SWATH analysis of the synaptic proteome in Alzheimer's disease', *Neurochem Int*, 87, pp. 1-12.
- Chao, H. W., Hong, C. J., Huang, T. N., Lin, Y. L. and Hsueh, Y. P. (2008) 'SUMOylation of the MAGUK protein CASK regulates dendritic spinogenesis', *J Cell Biol*, 182(1), pp. 141-55.
- Chen, N., Pandya, N. J., Koopmans, F., Castelo-Székely, V., van der Schors, R. C., Smit, A. B. and Li, K. W. (2014) 'Interaction proteomics reveals brain region-specific AMPA receptor complexes', *J Proteome Res*, 13(12), pp. 5695-706.
- Chen, X., Zhang, Y., Wang, Q., Qin, Y., Yang, X., Xing, Z., Shen, Y., Wu, H. and Qi, Y. (2021) 'The function of SUMOylation and its crucial roles in the development of neurological diseases', *FASEB J*, 35(4), pp. e21510.
- Cheng, D., Hoogenraad, C. C., Rush, J., Ramm, E., Schlager, M. A., Duong, D. M., Xu, P., Wijayawardana, S. R., Hanfelt, J., Nakagawa, T., Sheng, M. and Peng, J. (2006) 'Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum', *Mol Cell Proteomics*, 5(6), pp. 1158-70.
- Cheng, J., Deng, Y. and Zhou, J. (2021) 'Role of the Ubiquitin System in Chronic Pain', *Front Mol Neurosci*, 14, pp. 674914.
- Cheng, J., Huang, M., Zhu, Y., Xin, Y. J., Zhao, Y. K., Huang, J., Yu, J. X., Zhou, W. H. and Qiu, Z. (2014) 'SUMOylation of MeCP2 is essential for transcriptional repression and hippocampal synapse development', *J Neurochem*, 128(6), pp. 798-806.
- Chiu, S. Y., Asai, N., Costantini, F. and Hsu, W. (2008) 'SUMO-specific protease 2 is essential for modulating p53-Mdm2 in development of trophoblast stem cell niches and lineages', *PLoS Biol*, 6(12), pp. e310.
- Choi, B. H., Philips, M. R., Chen, Y., Lu, L. and Dai, W. (2018) 'K-Ras Lys-42 is crucial for its signaling, cell migration, and invasion', *J Biol Chem*, 293(45), pp. 17574-17581.
- Choi, J. H., Park, J. Y., Park, S. P., Lee, H., Han, S., Park, K. H. and Suh, Y. H. (2016) 'Regulation of mGluR7 trafficking by SUMOylation in neurons', *Neuropharmacology*, 102, pp. 229-35.
- Choi, K. Y., Chung, S. and Roche, K. W. (2011) 'Differential binding of calmodulin to group I metabotropic glutamate receptors regulates receptor trafficking and signaling', *J Neurosci*, 31(16), pp. 5921-30.
- Choi, S. G., Kim, H., Jeong, E. I., Lee, H. J., Park, S., Lee, S. Y., Lee, H. J., Lee, S. W., Chung, C. H. and Jung, Y. K. (2017) 'SUMO-Modified FADD Recruits Cytosolic Drp1 and Caspase-10 to Mitochondria for Regulated Necrosis', *Mol Cell Biol*, 37(2).
- Choquet, D. and Hossy, E. (2020) 'AMPA receptor nanoscale dynamic organization and synaptic plasticities', *Curr Opin Neurobiol*, 63, pp. 137-145.
- Choquet, D. and Triller, A. (2013) 'The dynamic synapse', *Neuron*, 80(3), pp. 691-703.
- Cijsouw, T., Ramsey, A., Lam, T., Carbone, B., Blanpied, T. and Biederer, T. (2018) 'Mapping the Proteome of the Synaptic Cleft through Proximity Labeling Reveals New Cleft Proteins', *Proteomes*, 6(4), pp. 48.
- Cimarosti, H., Ashikaga, E., Jaafari, N., Dearden, L., Rubin, P., Wilkinson, K. A. and Henley, J. M. (2012) 'Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones', *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(1), pp. 17-22.

- Ciruela, F., Escriche, M., Burgueno, J., Angulo, E., Casado, V., Soloviev, M. M., Canela, E. I., Mallol, J., Chan, W. Y., Lluís, C., McIlhinney, R. A. and Franco, R. (2001) 'Metabotropic glutamate 1 α and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes', *J Biol Chem*, 276(21), pp. 18345-51.
- Ciruela, F., Robbins, M. J., Willis, A. C. and McIlhinney, R. A. J. (1999) 'Interactions of the C Terminus of Metabotropic Glutamate Receptor Type 1 α with Rat Brain Proteins: Evidence for a Direct Interaction with Tubulin', *J Neurochem*, 72(1), pp. 346-354.
- Clem, R. L., Anggono, V. and Huganir, R. L. (2010) 'PICK1 regulates incorporation of calcium-permeable AMPA receptors during cortical synaptic strengthening', *J Neurosci*, 30(18), pp. 6360-6.
- Collins, M. O., Husi, H., Yu, L., Brandon, J. M., Anderson, C. N., Blackstock, W. P., Choudhary, J. S. and Grant, S. G. (2006) 'Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome', *J Neurochem*, 97 Suppl 1, pp. 16-23.
- Colnaghi, L., Conz, A., Russo, L., Musi, C. A., Fioriti, L., Borsello, T. and Salmons, M. (2020) 'Neuronal Localization of SENP Proteins with Super Resolution Microscopy', *Brain Sci*, 10(11), pp. 1--11.
- Colnaghi, L., Russo, L., Natale, C., Restelli, E., Cagnotto, A., Salmons, M., Chiesa, R. and Fioriti, L. (2019) 'Super Resolution Microscopy of SUMO Proteins in Neurons', *Front Cell Neurosci*, 13, pp. 486.
- Conquet, F., Bashir, Z. I., Davies, C. H., Daniel, H., Ferraguti, F., Bordi, F., Franz-Bacon, K., Reggiani, A., Matarese, V., Condé, F., Collingridge, G. L. and Crépel, F. (1994) 'Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1', *Nature*, 372(6503), pp. 237-243.
- Coombs, I. D. and Cull-Candy, S. G. (2009) 'Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins and AMPA receptor function in the cerebellum', *Neuroscience*, 162(3), pp. 656-65.
- Cossart, R., Epsztein, J., Tyzio, R., Becq, H., Hirsch, J., Ben-Ari, Y. and Crépel, V. (2002) 'Quantal release of glutamate generates pure kainate and mixed AMPA/kainate EPSCs in hippocampal neurons', *Neuron*, 35(1), pp. 147-59.
- Craig, T. J., Anderson, D., Evans, A. J., Girach, F. and Henley, J. M. (2015) 'SUMOylation of Syntaxin1A regulates presynaptic endocytosis', *Sci Rep*, 5, pp. 17669.
- Craig, T. J. and Henley, J. M. (2012) 'SUMOylation, Arc and the regulation homeostatic synaptic scaling: Implications in health and disease', *Commun Integr Biol*, 5(6), pp. 634-6.
- Craig, T. J., Jaafari, N., Petrovic, M. M., Jacobs, S. C., Rubin, P. P., Mellor, J. R. and Henley, J. M. (2012) 'Homeostatic synaptic scaling is regulated by protein SUMOylation', *J Biol Chem*, 287(27), pp. 22781-8.
- Curtis, D. R., Phillis, J. W. and Watkins, J. C. (1960) 'The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids', *J Physiol*, 150(3), pp. 656-82.
- Curtis, D. R. and Watkins, J. C. (1960) 'The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids', *J Neurochem*, 6(2), pp. 117-41.
- Dale, L. B., Babwah, A. V., Bhattacharya, M., Kelvin, D. J. and Ferguson, S. S. (2001) 'Spatial-temporal patterning of metabotropic glutamate receptor-mediated inositol 1,4,5-triphosphate, calcium, and protein kinase C oscillations: protein kinase C-dependent receptor phosphorylation is not required', *J Biol Chem*, 276(38), pp. 35900-8.
- Daniel, J. A., Cooper, B. H., Palvimo, J. J., Zhang, F. P., Brose, N. and Tirard, M. (2017) 'Analysis of SUMO1-conjugation at synapses', *Elife*, 6.

- Datwyler, A. L., Lattig-Tunnemann, G., Yang, W., Paschen, W., Lee, S. L., Dirnagl, U., Endres, M. and Harms, C. (2011) 'SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism', *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(11), pp. 2152-9.
- de Forges, H., Pilon, A., Poüs, C. and Perez, F. (2013) 'Imaging GTP-bound tubulin: from cellular to in vitro assembled microtubules', *Methods Cell Biol*, 115, pp. 139-53.
- Demarque, M. D., Nacerddine, K., Neyret-Kahn, H., Andrieux, A., Danenberg, E., Jouvion, G., Bomme, P., Hamard, G., Romagnolo, B., Terris, B., Cumano, A., Barker, N., Clevers, H. and Dejean, A. (2011) 'Sumoylation by Ubc9 regulates the stem cell compartment and structure and function of the intestinal epithelium in mice', *Gastroenterology*, 140(1), pp. 286-96.
- Deng, L., Kaeser, P. S., Xu, W. and Sudhof, T. C. (2011) 'RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13', *Neuron*, 69(2), pp. 317-31.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J. and Gygi, S. P. (2008) 'A quantitative atlas of mitotic phosphorylation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(31), pp. 10762-7.
- Dhami, G. K. and Ferguson, S. S. (2006) 'Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis', *Pharmacol Ther*, 111(1), pp. 260-71.
- Dictenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H. and Bassell, G. J. (2008) 'A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome', *Dev Cell*, 14(6), pp. 926-39.
- Diering, G. H. and Huganir, R. L. (2018) 'The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity', *Neuron*, 100(2), pp. 314-329.
- Dillon, C. and Goda, Y. (2005) 'The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse', *Annu Rev Neurosci*, 28(1), pp. 25-55.
- Dineley, K. T., Weeber, E. J., Atkins, C., Adams, J. P., Anne and Sweatt, J. D. (2001) 'Leitmotifs in the biochemistry of LTP induction: amplification, integration and coordination', *Journal of Neurochemistry*, 77(4), pp. 961-971.
- Dityatev, A. and Rusakov, D. A. 2011. Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse.
- Dore, K., Labrecque, S., Tardif, C. and De Koninck, P. (2014) 'FRET-FLIM investigation of PSD95-NMDA receptor interaction in dendritic spines; control by calpain, CaMKII and Src family kinase', *PLoS One*, 9(11), pp. e112170.
- Dorval, V. and Fraser, P. E. (2006) 'Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein', *J Biol Chem*, 281(15), pp. 9919-24.
- Dorval, V., Mazzella, M. J., Mathews, P. M., Hay, R. T. and Fraser, P. E. (2007) 'Modulation of Aβ generation by small ubiquitin-like modifiers does not require conjugation to target proteins', *Biochem J*, 404(2), pp. 309-16.
- Doumazane, E., Scholler, P., Zwier, J. M., Trinquet, E., Rondard, P. and Pin, J. P. (2011) 'A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors', *FASEB J*, 25(1), pp. 66-77.
- Drisaldi, B., Colnaghi, L., Fioriti, L., Rao, N., Myers, C., Snyder, A. M., Metzger, D. J., Tarasoff, J., Konstantinov, E., Fraser, P. E., Manley, J. L. and Kandel, E. R. (2015) 'SUMOylation Is an Inhibitory Constraint that Regulates the Prion-like Aggregation and Activity of CPEB3', *Cell Rep*, 11(11), pp. 1694-702.
- Du, C. P., Wang, M., Geng, C., Hu, B., Meng, L., Xu, Y., Cheng, B., Wang, N., Zhu, Q. J. and Hou, X. Y. (2020) 'Activity-Induced SUMOylation of Neuronal Nitric Oxide Synthase Is Associated with Plasticity of Synaptic Transmission and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling', *Antioxid Redox Signal*, 32(1), pp. 18-34.

- Dustrude, E. T., Wilson, S. M., Ju, W., Xiao, Y. and Khanna, R. (2013) 'CRMP2 protein SUMOylation modulates Nav1.7 channel trafficking', *J Biol Chem*, 288(34), pp. 24316-31.
- Dutting, E., Schroder-Kress, N., Sticht, H. and Enz, R. (2011) 'SUMO E3 ligases are expressed in the retina and regulate SUMOylation of the metabotropic glutamate receptor 8b', *Biochem J*, 435(2), pp. 365-71.
- Eifler, K. and Vertegaal, A. C. O. (2015) 'SUMOylation-Mediated Regulation of Cell Cycle Progression and Cancer', *Trends Biochem Sci*, 40(12), pp. 779-793.
- Eisenhardt, N., Ilic, D., Nagamalleswari, E. and Pichler, A. (2019) 'Biochemical characterization of SUMO-conjugating enzymes by in vitro sumoylation assays', *Methods Enzymol*, 618, pp. 167-185.
- Esteras, M., Liu, I. C., Snijders, A. P., Jarmuz, A. and Aragon, L. (2017) 'Identification of SUMO conjugation sites in the budding yeast proteome', *Microb Cell*, 4(10), pp. 331-341.
- Evdokimov, E., Sharma, P., Lockett, S. J., Lualdi, M. and Kuehn, M. R. (2008) 'Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3', *J Cell Sci*, 121(Pt 24), pp. 4106-13.
- Farr, C. D., Gafken, P. R., Norbeck, A. D., Doneanu, C. E., Stapels, M. D., Barofsky, D. F., Minami, M. and Saugstad, J. A. (2004) 'Proteomic analysis of native metabotropic glutamate receptor 5 protein complexes reveals novel molecular constituents', *J Neurochem*, 91(2), pp. 438-50.
- Feliciangeli, S., Bendahhou, S., Sandoz, G., Gounon, P., Reichold, M., Warth, R., Lazdunski, M., Barhanin, J. and Lesage, F. (2007) 'Does Sumoylation Control K2P1/TWIK1 Background K+ Channels?', *Cell*, 130(3), pp. 563-569.
- Feligioni, M., Nishimune, A. and Henley, J. M. (2009) 'Protein SUMOylation modulates calcium influx and glutamate release from presynaptic terminals', *Eur J Neurosci*, 29(7), pp. 1348-56.
- Feng, W., Liu, R., Xie, X., Diao, L., Gao, N., Cheng, J., Zhang, X., Li, Y. and Bao, L. (2021) 'SUMOylation of alpha-tubulin is a novel modification regulating microtubule dynamics', *J Mol Cell Biol*, 13(2), pp. 91-103.
- Ferraguti, F., Crepaldi, L. and Nicoletti, F. (2008) 'Metabotropic glutamate 1 receptor: current concepts and perspectives', *Pharmacol Rev*, 60(4), pp. 536-81.
- Ferraguti, F., Klausberger, T., Cobden, P., Baude, A., Roberts, J. D., Szucs, P., Kinoshita, A., Shigemoto, R., Somogyi, P. and Dalezios, Y. (2005) 'Metabotropic glutamate receptor 8-expressing nerve terminals target subsets of GABAergic neurons in the hippocampus', *J Neurosci*, 25(45), pp. 10520-36.
- Flotho, A. and Melchior, F. (2013) 'Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease', *Annu Rev Biochem*, 82, pp. 357-85.
- Fourgeaud, L., Bessis, A. S., Rossignol, F., Pin, J. P., Olivo-Marin, J. C. and Hemar, A. (2003) 'The metabotropic glutamate receptor mGluR5 is endocytosed by a clathrin-independent pathway', *J Biol Chem*, 278(14), pp. 12222-30.
- Francois-Moutal, L., Dustrude, E. T., Wang, Y., Brustovetsky, T., Dorame, A., Ju, W., Moutal, A., Perez-Miller, S., Brustovetsky, N., Gokhale, V., Khanna, M. and Khanna, R. (2018) 'Inhibition of the Ubc9 E2 SUMO-conjugating enzyme-CRMP2 interaction decreases Nav1.7 currents and reverses experimental neuropathic pain', *Pain*, 159(10), pp. 2115-2127.
- Frankland, P. W., O'Brien, C., Ohno, M., Nature, A. K. and undefined (2001) ' α -CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory'. Available at: www.nature.com.
- Fu, J., Yu, H. M., Chiu, S. Y., Mirando, A. J., Maruyama, E. O., Cheng, J. G. and Hsu, W. (2014) 'Disruption of SUMO-specific protease 2 induces mitochondria mediated neurodegeneration', *PLoS Genet*, 10(10), pp. e1004579.

- Galisson, F., Mahrouche, L., Courcelles, M., Bonneil, E., Meloche, S., Chelbi-Alix, M. K. and Thibault, P. (2011) 'A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells', *Mol Cell Proteomics*, 10(2), pp. M110 004796.
- Gardiner, K. (2006) 'Transcriptional Dysregulation in Down Syndrome: Predictions for Altered Protein Complex Stoichiometries and Post-translational Modifications, and Consequences for Learning/Behavior Genes ELK, CREB, and the Estrogen and Glucocorticoid Receptors', *Behavior Genetics*, 36(3), pp. 439-453.
- Gareau, J. R., Reverter, D. and Lima, C. D. (2012) 'Determinants of small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO1) protein specificity, E3 ligase, and SUMO-RanGAP1 binding activities of nucleoporin RanBP2', *J Biol Chem*, 287(7), pp. 4740-51.
- Gatel, P., Brockly, F., Reynes, C., Pastore, M., Hicheri, Y., Cartron, G., Piechaczyk, M. and Bossis, G. (2020) 'Ubiquitin and SUMO conjugation as biomarkers of acute myeloid leukemias response to chemotherapies', *Life Sci Alliance*, 3(6).
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F. and Südhof, T. C. (1994) 'Synaptotagmin I: A major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse', *Cell*, 79(4), pp. 717-727.
- Gerber, S. H., Rah, J. C., Min, S. W., Liu, X., de Wit, H., Dulubova, I., Meyer, A. C., Rizo, J., Arancillo, M., Hammer, R. E., Verhage, M., Rosenmund, C. and Südhof, T. C. (2008) 'Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion', *Science*, 321(5895), pp. 1507-10.
- Gerber, U., Gee, C. and Benquet, P. (2007) 'Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways', *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), pp. 56-61.
- Ghosh, H., Auguadri, L., Battaglia, S., Simone Thirouin, Z., Zemoura, K., Messner, S., Acuna, M. A., Wildner, H., Yevenes, G. E., Dieter, A., Kawasaki, H., M, O. H., Zeilhofer, H. U., Fritschy, J. M. and Tyagarajan, S. K. (2016) 'Several posttranslational modifications act in concert to regulate gephyrin scaffolding and GABAergic transmission', *Nat Commun*, 7, pp. 13365.
- Girach, F., Craig, T. J., Rocca, D. L. and Henley, J. M. (2013) 'RIM1alpha SUMOylation is required for fast synaptic vesicle exocytosis', *Cell Rep*, 5(5), pp. 1294-301.
- Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M. H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., Cox, J., Barton, G. J., Mann, M. and Hay, R. T. (2009) 'System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock', *Sci Signal*, 2(72), pp. ra24.
- Goncalves, J., Bartol, T. M., Camus, C., Levet, F., Menegolla, A. P., Sejnowski, T. J., Sibarita, J. B., Vivaudou, M., Choquet, D. and Hosy, E. (2020) 'Nanoscale co-organization and coactivation of AMPAR, NMDAR, and mGluR at excitatory synapses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(25), pp. 14503-14511.
- Grandes, P., Mateos, J. M., Ruegg, D., Kuhn, R. and Knopfel, T. (1994) 'Differential cellular localization of three splice variants of the mGluR1 metabotropic glutamate receptor in rat cerebellum', *Neuroreport*, 5(17), pp. 2249-52.
- Grant, S. G. N. (2012) 'Synaptopathies: Diseases of the synaptome', *Curr Opin Neurobiol*, 22, pp. 522--529.
- Gray, E. G. (1959) 'Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex', *Nature*, 183(4675), pp. 1592-3.
- Gubellini, P., Saulle, E., Centonze, D., Bonsi, P., Pisani, A., Bernardi, G., Conquet, F. and Calabresi, P. (2001) 'Selective involvement of mGlu1 receptors in corticostriatal LTD', *Neuropharmacology*, 40(7), pp. 839-846.
- Gubellini, P., Saulle, E., Centonze, D., Costa, C., Tropepi, D., Bernardi, G., Conquet, F. and Calabresi, P. (2003) 'Corticostriatal LTP requires combined mGluR1 and mGluR5 activation', *Neuropharmacology*, 44(1), pp. 8-16.

- Guerra de Souza, A. C., Prediger, R. D. and Cimarosti, H. (2016) 'SUMO-regulated mitochondrial function in Parkinson's disease', *J Neurochem*, 137(5), pp. 673-86.
- Guerrini, R. and Parrini, E. (2012) 'Epilepsy in Rett syndrome, and CDKL5- and FOXP1-gene-related encephalopathies', *Epilepsia*, 53, pp. 2067--2078.
- Guillery, R. W. (2000) 'Early electron microscopic observations of synaptic structures in the cerebral cortex: A view of the contributions made by George Gray (1924-1999)', *Trends Neurosci*, 23, pp. 594--598.
- Guo, C. and Henley, J. M. (2014) 'Wrestling with stress: roles of protein SUMOylation and deSUMOylation in cell stress response', *IUBMB Life*, 66(2), pp. 71-7.
- Guo, C., Hildick, K. L., Luo, J., Dearden, L., Wilkinson, K. A. and Henley, J. M. (2013) 'SEN3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia', *EMBO J*, 32(11), pp. 1514-28.
- Guo, C., Wilkinson, K. A., Evans, A. J., Rubin, P. P. and Henley, J. M. (2017) 'SEN3-mediated deSUMOylation of Drp1 facilitates interaction with Mff to promote cell death', *Sci Rep*, 7, pp. 43811.
- Guo, D., Li, M., Zhang, Y., Yang, P., Eckenrode, S., Hopkins, D., Zheng, W., Purohit, S., Podolsky, R. H., Muir, A., Wang, J., Dong, Z., Brusko, T., Atkinson, M., Pozzilli, P., Zeidler, A., Raffel, L. J., Jacob, C. O., Park, Y., Serrano-Rios, M., Larrad, M. T., Zhang, Z., Garchon, H. J., Bach, J. F., Rotter, J. I., She, J. X. and Wang, C. Y. (2004) 'A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes', *Nat Genet*, 36(8), pp. 837-41.
- Hafner, A. S., Donlin-Asp, P. G., Leitch, B., Herzog, E. and Schuman, E. M. (2019) 'Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments', *Science*, 364(6441).
- Hamilton, A. M., Oh, W. C., Vega-Ramirez, H., Stein, I. S., Hell, J. W., Patrick, G. N. and Zito, K. (2012) 'Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome', *Neuron*, 74(6), pp. 1023-30.
- Hannoun, Z., Greenhough, S., Jaffray, E., Hay, R. T. and Hay, D. C. (2010) 'Post-translational modification by SUMO', *Toxicology*, 278, pp. 288--293.
- Harder, Z., Zunino, R. and McBride, H. (2004) 'Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission', *Curr Biol*, 14(4), pp. 340-5.
- Hay, R. T. (2005) 'SUMO: A history of modification', *Mol Cell*, 18, pp. 1--12.
- He, K., Song, L., Cummings, L. W., Goldman, J., Haganir, R. L. and Lee, H. K. (2009) 'Stabilization of Ca²⁺-permeable AMPA receptors at perisynaptic sites by GluR1-S845 phosphorylation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(47), pp. 20033-8.
- Heidemann, S. R., Landers, J. M. and Hamborg, M. A. (1981) 'Polarity orientation of axonal microtubules', *J Cell Biol*, 91(3 Pt 1), pp. 661-5.
- Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Beique, J. C., Lounis, B., Rumbaugh, G., Haganir, R. L., Cognet, L. and Choquet, D. (2008) 'Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission', *Science*, 320(5873), pp. 201-5.
- Hell, J. W. (2014) 'CaMKII: Claiming center stage in postsynaptic function and organization', *Neuron*, 81, pp. 249--265.
- Hendriks, I. A., D'Souza, R. C., Chang, J. G., Mann, M. and Vertegaal, A. C. (2015a) 'System-wide identification of wild-type SUMO-2 conjugation sites', *Nat Commun*, 6, pp. 7289.
- Hendriks, I. A., D'Souza, R. C., Yang, B., Verlaan-de Vries, M., Mann, M. and Vertegaal, A. C. (2014) 'Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner', *Nat Struct Mol Biol*, 21(10), pp. 927-36.

- Hendriks, I. A., Lyon, D., Su, D., Skotte, N. H., Daniel, J. A., Jensen, L. J. and Nielsen, M. L. (2018) 'Site-specific characterization of endogenous SUMOylation across species and organs', *Nat Commun*, 9(1), pp. 2456.
- Hendriks, I. A., Lyon, D., Young, C., Jensen, L. J., Vertegaal, A. C. and Nielsen, M. L. (2017) 'Site-specific mapping of the human SUMO proteome reveals co-modification with phosphorylation', *Nat Struct Mol Biol*, 24(3), pp. 325-336.
- Hendriks, I. A., Souza, R. C. J. D., Yang, B., Vries, M. V.-d. and Vertegaal, A. C. O. (2015b) 'Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner.', *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(10), pp. 927--936.
- Hendriks, I. A. and Vertegaal, A. C. (2016) 'A comprehensive compilation of SUMO proteomics', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(9), pp. 581-95.
- Henley, J. M., Carmichael, R. E. and Wilkinson, K. A. (2018) 'Extranuclear SUMOylation in Neurons', *Trends Neurosci*, 41, pp. 198--210.
- Henley, J. M., Seager, R., Nakamura, Y., Talandyte, K., Nair, J. and Wilkinson, K. A. (2021) 'SUMOylation of synaptic and synapse-associated proteins: An update', *J Neurochem*, 156(2), pp. 145-161.
- Heo, S., Diering, G. H., Na, C. H., Nirujogi, R. S., Bachman, J. L., Pandey, A. and Haganir, R. L. (2018) 'Identification of long-lived synaptic proteins by proteomic analysis of synaptosome protein turnover', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(16), pp. E3827-E3836.
- Hoogenraad, C. C. and Bradke, F. (2009) 'Control of neuronal polarity and plasticity--a renaissance for microtubules?', *Trends Cell Biol*, 19(12), pp. 669-76.
- Hotulainen, P. and Hoogenraad, C. C. (2010) 'Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function', *J Cell Biol*, 189, pp. 619--629.
- Hsueh, Y. P. (2006) 'The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function', *Curr Med Chem*, 13(16), pp. 1915-27.
- Hu, J. H., Park, J. M., Park, S., Xiao, B., Dehoff, M. H., Kim, S., Hayashi, T., Schwarz, M. K., Haganir, R. L., Seeburg, P. H., Linden, D. J. and Worley, P. F. (2010) 'Homeostatic scaling requires group I mGluR activation mediated by Homer1a', *Neuron*, 68(6), pp. 1128-42.
- Hu, X., Ballo, L., Pietila, L., Viesselmann, C., Ballweg, J., Lombard, D., Stevenson, M., Merriam, E. and Dent, E. W. (2011) 'BDNF-induced increase of PSD-95 in dendritic spines requires dynamic microtubule invasions', *J Neurosci*, 31(43), pp. 15597-603.
- Hu, X., Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E. and Dent, E. W. (2008) 'Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines', *J Neurosci*, 28(49), pp. 13094-105.
- Huang, D., Liu, H., Zhu, A., Zhou, Y. and Li, Y. (2020) 'Forebrain excitatory neuron-specific SENP2 knockout mouse displays hyperactivity, impaired learning and memory, and anxiolytic-like behavior', *Mol Brain*, 13(1), pp. 59.
- Huang, X. P. and Hampson, D. R. (2000) 'Inhibition of microtubule formation by metabotropic glutamate receptors', *J Neurochem*, 74(1), pp. 104-13.
- Haganir, R. L. and Nicoll, R. A. (2013) 'AMPA receptors and synaptic plasticity: The last 25 years', *Neuron*, 80, pp. 704--717.
- Impens, F., Radoshevich, L., Cossart, P. and Ribet, D. (2014) 'Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(34), pp. 12432-7.

- Jaafari, N., Henley, J. M. and Hanley, J. G. (2012) 'PICK1 mediates transient synaptic expression of GluA2-lacking AMPA receptors during glycine-induced AMPA receptor trafficking', *J Neurosci*, 32(34), pp. 11618-30.
- Jang, D., Kwon, H., Choi, M., Lee, J. and Pak, Y. (2019) 'Sumoylation of Flotillin-1 promotes EMT in metastatic prostate cancer by suppressing Snail degradation', *Oncogene*, 38(17), pp. 3248-3260.
- Jaworski, J., Kapitein, L. C., Gouveia, S. M., Dortland, B. R., Wulf, P. S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S. A., Di Stefano, P., Demmers, J., Krugers, H., Defilippi, P., Akhmanova, A. and Hoogenraad, C. C. (2009) 'Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity', *Neuron*, 61(1), pp. 85-100.
- Jeyabalan, N. and Clement, J. P. (2016) 'SYNGAP1: Mind the Gap', *Front Cell Neurosci*, 10, pp. 32.
- Johnson, E. S. and Blobel, G. (1999) 'Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins', *J Cell Biol*, 147(5), pp. 981-94.
- Joly, C., Gomeza, J., Brabet, I., Curry, K., Bockaert, J. and Pin, J. P. (1995) 'Molecular, functional, and pharmacological characterization of the metabotropic glutamate receptor type 5 splice variants: comparison with mGluR1', *J Neurosci*, 15(5 Pt 2), pp. 3970-81.
- Josa-Prado, F., Luo, J., Rubin, P., Henley, J. M. and Wilkinson, K. A. (2019) 'Developmental profiles of SUMOylation pathway proteins in rat cerebrum and cerebellum', *PLoS One*, 14(2), pp. e0212857.
- Ju, W., Li, Q., Wilson, S. M., Brittain, J. M., Meroueh, L. and Khanna, R. (2013) 'SUMOylation alters CRMP2 regulation of calcium influx in sensory neurons', *Channels (Austin)*, 7(3), pp. 153-9.
- Kaesler, P. S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J. and Sudhof, T. C. (2011) 'RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction', *Cell*, 144(2), pp. 282-95.
- Kamiya, H. and Ozawa, S. (2000) 'Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre synapse', *J Physiol*, 523 Pt 3(3), pp. 653-65.
- Kamiya, H., Ozawa, S. and Manabe, T. (2002) 'Kainate Receptor-Dependent Short-Term Plasticity of Presynaptic Ca²⁺Influx at the Hippocampal Mossy Fiber Synapses', *The Journal of Neuroscience*, 22(21), pp. 9237-9243.
- Kammermeier, P. J. (2006) 'Surface clustering of metabotropic glutamate receptor 1 induced by long Homer proteins', *BMC Neurosci*, 7, pp. 1.
- Kammermeier, P. J. (2012a) 'Functional and pharmacological characteristics of metabotropic glutamate receptors 2/4 heterodimers', *Mol Pharmacol*, 82(3), pp. 438-47.
- Kammermeier, P. J. (2012b) 'The orthosteric agonist 2-chloro-5-hydroxyphenylglycine activates mGluR5 and mGluR1 with similar efficacy and potency', *BMC Pharmacol*, 12, pp. 6.
- Kammermeier, P. J. and Worley, P. F. (2007) 'Homer 1a uncouples metabotropic glutamate receptor 5 from postsynaptic effectors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(14), pp. 6055-60.
- Kang, X., Qi, Y., Zuo, Y., Wang, Q., Zou, Y., Schwartz, R. J., Cheng, J. and Yeh, E. T. (2010) 'SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of polycomb group protein-mediated gene silencing during embryonic development', *Mol Cell*, 38(2), pp. 191-201.
- Kerchner, G. A. and Nicoll, R. A. (2008) 'Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP', *Nat Rev Neurosci*, 9, pp. 813--825.
- Kerscher, O. (2007) 'SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs', *EMBO Rep*, 8(6), pp. 550-5.
- Khayachi, A., Gwizdek, C., Poupon, G., Alcor, D., Chafai, M., Casse, F., Maurin, T., Prieto, M., Folci, A., De Graeve, F., Castagnola, S., Gautier, R., Schorova, L., Loriol, C., Pronot, M., Besse, F., Brau, F., Deval, E., Bardoni, B. and

- Martin, S. (2018) 'Sumoylation regulates FMRP-mediated dendritic spine elimination and maturation', *Nat Commun*, 9(1), pp. 757.
- Kidd, F. L. and Isaac, J. T. (2001) 'Kinetics and activation of postsynaptic kainate receptors at thalamocortical synapses: role of glutamate clearance', *J Neurophysiol*, 86(3), pp. 1139-48.
- Kim, Y. M., Jang, W. H., Quezado, M. M., Oh, Y., Chung, K. C., Junn, E. and Mouradian, M. M. (2011) 'Proteasome inhibition induces alpha-synuclein SUMOylation and aggregate formation', *J Neurol Sci*, 307(1-2), pp. 157-61.
- Knipscheer, P., Flotho, A., Klug, H., Olsen, J. V., van Dijk, W. J., Fish, A., Johnson, E. S., Mann, M., Sixma, T. K. and Pichler, A. (2008) 'Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination', *Mol Cell*, 31(3), pp. 371-82.
- Koopmans, F., Pandya, N. J., Franke, S. K., Phillippens, I., Paliukhovich, I., Li, K. W. and Smit, A. B. (2018) 'Comparative Hippocampal Synaptic Proteomes of Rodents and Primates: Differences in Neuroplasticity-Related Proteins', *Front Mol Neurosci*, 11, pp. 364.
- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. and Seeburg, P. H. (1995) 'Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95', *Science*, 269(5231), pp. 1737-40.
- Kristensen, A. S., Jenkins, M. A., Banke, T. G., Schousboe, A., Makino, Y., Johnson, R. C., Haganir, R. and Traynelis, S. F. (2011) 'Mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating', *Nat Neurosci*, 14(6), pp. 727-35.
- Kunadt, M., Eckermann, K., Stuenkel, A., Gong, J., Russo, B., Strauss, K., Rai, S., Kugler, S., Falomir Lockhart, L., Schwalbe, M., Krumova, P., Oliveira, L. M., Bahr, M., Mobius, W., Levin, J., Giese, A., Kruse, N., Mollenhauer, B., Geiss-Friedlander, R., Ludolph, A. C., Freischmidt, A., Feiler, M. S., Danzer, K. M., Zweckstetter, M., Jovin, T. M., Simons, M., Weishaupt, J. H. and Schneider, A. (2015) 'Extracellular vesicle sorting of alpha-Synuclein is regulated by sumoylation', *Acta Neuropathol*, 129(5), pp. 695-713.
- Lamoliatte, F., Caron, D., Durette, C., Mahrouche, L., Maroui, M. A., Caron-Lizotte, O., Bonneil, E., Chelbi-Alix, M. K. and Thibault, P. (2014) 'Large-scale analysis of lysine SUMOylation by SUMO remnant immunoaffinity profiling', *Nat Commun*, 5, pp. 5409.
- Landis, D. M. and Reese, T. S. (1983) 'Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines', *J Cell Biol*, 97(4), pp. 1169-78.
- Lee, J., Munguba, H., Gutzeit, V. A., Singh, D. R., Kristt, M., Dittman, J. S. and Levitz, J. (2020) 'Defining the Homo- and Heterodimerization Propensities of Metabotropic Glutamate Receptors', *Cell Rep*, 31(5), pp. 107605.
- Lee, J. H., Lee, J., Choi, K. Y., Hepp, R., Lee, J. Y., Lim, M. K., Chatani-Hinze, M., Roche, P. A., Kim, D. G., Ahn, Y. S., Kim, C. H. and Roche, K. W. (2008) 'Calmodulin dynamically regulates the trafficking of the metabotropic glutamate receptor mGluR5', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(34), pp. 12575-80.
- Lee, L., Dale, E., Staniszewski, A., Zhang, H., Saeed, F., Sakurai, M., Fa, M., Orozco, I., Michelassi, F., Akpan, N., Lehrer, H. and Arancio, O. (2014) 'Regulation of synaptic plasticity and cognition by SUMO in normal physiology and Alzheimer's disease', *Sci Rep*, 4(1), pp. 7190.
- Lee, Y. J., Miyake, S., Wakita, H., McMullen, D. C., Azuma, Y., Auh, S. and Hallenbeck, J. M. (2007) 'Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells', *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(5), pp. 950-62.
- Lee, Y. J., Mou, Y., Maric, D., Klimanis, D., Auh, S. and Hallenbeck, J. M. (2011) 'Elevated global SUMOylation in Ubc9 transgenic mice protects their brains against focal cerebral ischemic damage', *PLoS One*, 6(10), pp. e25852.

- Lemieux, M., Labrecque, S., Tardif, C., Labrie-Dion, É., Lebel, É. and De Koninck, P. (2012) 'Translocation of CaMKII to dendritic microtubules supports the plasticity of local synapses', *J Cell Biol*, 198(6), pp. 1055-73.
- Lepeta, K., Lourenco, M. V. and Schweitzer, B. C. a. (2016) 'Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders – A review from students to students', *J Neurochem*, pp. 785--805.
- Li, X., Luo, Y., Yu, L., Lin, Y., Luo, D., Zhang, H., He, Y., Kim, Y. O., Kim, Y., Tang, S. and Min, W. (2008) 'SEN1 mediates TNF-induced desumoylation and cytoplasmic translocation of HIPK1 to enhance ASK1-dependent apoptosis', *Cell Death Differ*, 15(4), pp. 739-50.
- Li, X., Wang, Y., Zhu, A., Zhou, J. and Li, Y. (2017) 'PKC SUMOylation inhibits the binding of 14-3-3tau to GluK2', *Channels (Austin)*, 11(6), pp. 616-623.
- Li, Y., Wang, H., Wang, S., Quon, D., Liu, Y. W. and Cordell, B. (2003) 'Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(1), pp. 259-64.
- Liang, Y. C., Lee, C. C., Yao, Y. L., Lai, C. C., Schmitz, M. L. and Yang, W. M. (2016) 'SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies', *Sci Rep*, 6, pp. 26509.
- Lin, D. T., Makino, Y., Sharma, K., Hayashi, T., Neve, R., Takamiya, K. and Huganir, R. L. (2009) 'Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation', *Nat Neurosci*, 12(7), pp. 879-87.
- Lise, M. F., Wong, T. P., Trinh, A., Hines, R. M., Liu, L., Kang, R., Hines, D. J., Lu, J., Goldenring, J. R., Wang, Y. T. and El-Husseini, A. (2006) 'Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking', *J Biol Chem*, 281(6), pp. 3669-78.
- Loftus, L. T., Gala, R., Yang, T., Jessick, V. J., Ashley, M. D., Ordonez, A. N., Thompson, S. J., Simon, R. P. and Meller, R. (2009) 'Sumo-2/3-ylation following in vitro modeled ischemia is reduced in delayed ischemic tolerance', *Brain Res*, 1272, pp. 71-80.
- Loriol, C., Casse, F., Khayachi, A., Poupon, G., Chafai, M., Deval, E., Gwizdek, C. and Martin, S. (2014) 'mGlu5 receptors regulate synaptic sumoylation via a transient PKC-dependent diffusional trapping of Ubc9 into spines', *Nat Commun*, 5, pp. 5113.
- Loriol, C., Khayachi, A., Poupon, G., Gwizdek, C. and Martin, S. (2013) 'Activity-dependent regulation of the sumoylation machinery in rat hippocampal neurons', *Biol Cell*, 105(1), pp. 30-45.
- Loriol, C., Parisot, J., Poupon, G., Gwizdek, C. and Martin, S. (2012) 'Developmental regulation and spatiotemporal redistribution of the sumoylation machinery in the rat central nervous system', *PLoS One*, 7(3), pp. e33757.
- Lu, W., Man, H., Ju, W., Trimble, W. S., MacDonald, J. F. and Wang, Y. T. (2001) 'Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons', *Neuron*, 29(1), pp. 243-54.
- Lu, W., Shi, Y., Jackson, A. C., Bjorgan, K., Doring, M. J., Sprengel, R., Seeburg, P. H. and Nicoll, R. A. (2009) 'Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach', *Neuron*, 62(2), pp. 254-68.
- Lu, Y.-M., Jia, Z., Janus, C., Henderson, J. T., Gerlai, R., Wojtowicz, J. M. and Roder, J. C. (1997) 'Mice Lacking Metabotropic Glutamate Receptor 5 Show Impaired Learning and Reduced CA1 Long-Term Potentiation (LTP) But Normal CA3 LTP', *The Journal of Neuroscience*, 17(13), pp. 5196-5205.
- Luo, H. B., Xia, Y. Y., Shu, X. J., Liu, Z. C., Feng, Y., Liu, X. H., Yu, G., Yin, G., Xiong, Y. S., Zeng, K., Jiang, J., Ye, K., Wang, X. C. and Wang, J. Z. (2014) 'SUMOylation at K340 inhibits tau degradation through deregulating its phosphorylation and ubiquitination', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(46), pp. 16586-91.

- Luo, J., Gurung, S., Lee, L., Henley, J. M., Wilkinson, K. A. and Guo, C. (2017) 'Increased SUMO-2/3-ylation mediated by SENP3 degradation is protective against cadmium-induced caspase 3-dependent cytotoxicity', *J Toxicol Sci*, 42(5), pp. 529-538.
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G. and Schottler, F. (1983) 'Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation', *Nature*, 305(5936), pp. 719-21.
- MacGillavry, H. D., Kerr, J. M., Kassner, J., Frost, N. A. and Blanpied, T. A. (2016) 'Shank-cortactin interactions control actin dynamics to maintain flexibility of neuronal spines and synapses', *Eur J Neurosci*, 43(2), pp. 179-93.
- MacGillavry, H. D., Song, Y., Raghavachari, S. and Blanpied, T. A. (2013) 'Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic AMPA receptors', *Neuron*, 78(4), pp. 615-22.
- Malenka, R. C. and Bear, M. F. (2004) 'LTP and LTD: An embarrassment of riches', *Neuron*, 44, pp. 5--21.
- Malherbe, P., Kew, J. N., Richards, J. G., Knoflach, F., Kratzeisen, C., Zenner, M. T., Faull, R. L., Kemp, J. A. and Mutel, V. (2002) 'Identification and characterization of a novel splice variant of the metabotropic glutamate receptor 5 gene in human hippocampus and cerebellum', *Brain Res Mol Brain Res*, 109(1-2), pp. 168-78.
- Malherbe, P., Kratochwil, N., Knoflach, F., Zenner, M. T., Kew, J. N., Kratzeisen, C., Maerki, H. P., Adam, G. and Mutel, V. (2003) 'Mutational analysis and molecular modeling of the allosteric binding site of a novel, selective, noncompetitive antagonist of the metabotropic glutamate 1 receptor', *J Biol Chem*, 278(10), pp. 8340-7.
- Malinow, R., Madison, D. V. and Tsien, R. W. (1988) 'Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation', *Nature*, 335(6193), pp. 820-4.
- Malinow, R. and Malenka, R. C. (2002) 'AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity', *Annu Rev Neurosci*, 25, pp. 103--126.
- Malinow, R., Schulman, H. and Tsien, R. W. (1989) 'Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP', *Science*, 245(4920), pp. 862-6.
- Mandelkow, E. M. M. and Mandelkow, E. (1992) 'Microtubule oscillations', *Cell Motil Cytoskeleton*, 22, pp. 235-244.
- Marmor-Kollet, H., Siany, A., Kedersha, N., Knafo, N., Rivkin, N., Danino, Y. M., Moens, T. G., Olender, T., Sheban, D., Cohen, N., Dadosh, T., Addadi, Y., Ravid, R., Eitan, C., Toth Cohen, B., Hofmann, S., Riggs, C. L., Advani, V. M., Higginbottom, A., Cooper-Knock, J., Hanna, J. H., Merbl, Y., Van Den Bosch, L., Anderson, P., Ivanov, P., Geiger, T. and Hornstein, E. (2020) 'Spatiotemporal Proteomic Analysis of Stress Granule Disassembly Using APEX Reveals Regulation by SUMOylation and Links to ALS Pathogenesis', *Mol Cell*, 80(5), pp. 876-891 e6.
- Martin, S., Nishimune, A., Mellor, J. R. and Henley, J. M. (2007a) 'SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission', *Nature*, 447(7142), pp. 321-5.
- Martin, S., Wilkinson, K. A., Nishimune, A. and Henley, J. M. (2007b) 'Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction', *Nat Rev Neurosci*, 8, pp. 948--959.
- Mary, S., Gomeza, J., Prezeau, L., Bockaert, J. and Pin, J. P. (1998) 'A cluster of basic residues in the carboxyl-terminal tail of the short metabotropic glutamate receptor 1 variants impairs their coupling to phospholipase C', *J Biol Chem*, 273(1), pp. 425-32.
- Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I. A., van Santen, M. A., van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M. and Vertegaal, A. C. (2010) 'Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif', *Mol Cell*, 39(4), pp. 641-52.

- Matic, I., van Hagen, M., Schimmel, J., Macek, B., Ogg, S. C., Tatham, M. H., Hay, R. T., Lamond, A. I., Mann, M. and Vertegaal, A. C. O. (2008) 'In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy', *Mol Cell Proteomics*, 7(1), pp. 132-44.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R. and Kasai, H. (2004) 'Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines', *Nature*, 429(June).
- Matsuzaki, S., Lee, L., Knock, E., Srikumar, T., Sakurai, M., Hazrati, L. N., Katayama, T., Staniszewski, A., Raught, B., Arancio, O. and Fraser, P. E. (2015) 'SUMO1 Affects Synaptic Function, Spine Density and Memory', *Sci Rep*, 5, pp. 10730.
- Matunis, M. J., Coutavas, E. and Blobel, G. (1996) 'A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex', *J Cell Biol*, 135(6 Pt 1), pp. 1457-70.
- Maurin, T., Zongaro, S. and Bardoni, B. (2014) 'Fragile X Syndrome: from molecular pathology to therapy', *Neurosci Biobehav Rev*, 46 Pt 2, pp. 242-55.
- Melchior, F. (2000) 'SUMO - Nonclassical ubiquitin', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, pp. 591--626.
- Meng, Y., Zhang, Y. and Jia, Z. (2003) 'Synaptic transmission and plasticity in the absence of AMPA glutamate receptor GluR2 and GluR3', *Neuron*, 39(1), pp. 163-76.
- Merriam, E. B., Millette, M., Lumbard, D. C., Saengsawang, W., Fothergill, T., Hu, X., Ferhat, L. and Dent, E. W. (2013) 'Synaptic regulation of microtubule dynamics in dendritic spines by calcium, F-actin, and drebrin', *J Neurosci*, 33(42), pp. 16471-82.
- Mientjies, E. J., Nieuwenhuizen, I., Kirkpatrick, L., Zu, T., Hoogeveen-Westerveld, M., Severijnen, L., Rifé, M., Willemsen, R., Nelson, D. L. and Oostra, B. A. (2006) 'The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo', *Neurobiol Dis*, 21(3), pp. 549-55.
- Milstein, A. D. and Nicoll, R. A. (2008) 'Regulation of AMPA receptor gating and pharmacology by TARP auxiliary subunits', *Trends Pharmacol Sci*, 29(7), pp. 333-9.
- Mironov, S. L. and Symonchuk, N. (2006) 'ER vesicles and mitochondria move and communicate at synapses', *J Cell Sci*, 119(Pt 23), pp. 4926-34.
- Moczulska, K. E., Pichler, P., Schutzbier, M., Schleiffer, A., Rumpel, S. and Mechtler, K. (2014) 'Deep and precise quantification of the mouse synaptosomal proteome reveals substantial remodeling during postnatal maturation', *J Proteome Res*, 13(10), pp. 4310-24.
- Moutal, A., Cai, S., Yu, J., Stratton, H. J., Chefdeville, A., Gomez, K., Ran, D., Madura, C. L., Boinon, L., Soto, M., Zhou, Y., Shan, Z., Chew, L. A., Rodgers, K. E. and Khanna, R. (2020) 'Studies on CRMP2 SUMOylation-deficient transgenic mice identify sex-specific Nav1.7 regulation in the pathogenesis of chronic neuropathic pain', *Pain*, 161(11), pp. 2629-2651.
- Moutal, A., Dustrude, E. T., Largent-Milnes, T. M., Vanderah, T. W., Khanna, M. and Khanna, R. (2018) 'Blocking CRMP2 SUMOylation reverses neuropathic pain', *Mol Psychiatry*, 23(11), pp. 2119-2121.
- Moutal, A., White, K. A., Chefdeville, A., Laufmann, R. N., Vitiello, P. F., Feinstein, D., Weimer, J. M. and Khanna, R. (2019) 'Dysregulation of CRMP2 Post-Translational Modifications Drive Its Pathological Functions', *Mol Neurobiol*, 56(10), pp. 6736-6755.
- Mukherjee, K., Yang, X., Gerber, S. H., Kwon, H. B., Ho, A., Castillo, P. E., Liu, X. and Sudhof, T. C. (2010) 'Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(14), pp. 6504-9.

- Mundell, S. J., Pula, G., More, J. C., Jane, D. E., Roberts, P. J. and Kelly, E. (2004) 'Activation of cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the desensitization and internalization of metabotropic glutamate receptors 1a and 1b', *Mol Pharmacol*, 65(6), pp. 1507-16.
- Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P. P. and Dejean, A. (2005) 'The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice', *Dev Cell*, 9(6), pp. 769-79.
- Nair, D., Hosy, E., Petersen, J. D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D. and Sibarita, J. B. (2013) 'Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95', *J Neurosci*, 33(32), pp. 13204-24.
- Nair, R. R., Patil, S., Tiron, A., Kanhema, T., Panja, D., Schiro, L., Parobczak, K., Wilczynski, G. and Bramham, C. R. (2017) 'Dynamic Arc SUMOylation and Selective Interaction with F-Actin-Binding Protein Drebrin A in LTP Consolidation In Vivo', *Front Synaptic Neurosci*, 9, pp. 8.
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R. J., Worley, P. F. and Sheng, M. (1999) 'Shank, a Novel Family of Postsynaptic Density Proteins that Binds to the NMDA Receptor/PSD-95/GKAP Complex and Cortactin', *Neuron*, 23(3), pp. 569-582.
- Nayak, A. and Muller, S. (2014) 'SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond', *Genome Biol*, 15(7), pp. 422.
- Neves, S. R., Tsokas, P., Sarkar, A., Grace, E. A., Rangamani, P., Taubenfeld, S. M., Alberini, C. M., Schaff, J. C., Blitzer, R. D., Moraru, I. and Iyengar, R. (2008) 'Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks', *Cell*, 133(4), pp. 666-80.
- Newton, A. C. (2010) 'Protein kinase C: Poised to signal', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298.
- Nicholls, R. E., Alarcon, J. M., Malleret, G., Carroll, R. C., Grody, M., Vronskaya, S. and Kandel, E. R. (2008) 'Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility', *Neuron*, 58(1), pp. 104-17.
- Nicoll, R. A. (2017) 'A Brief History of Long-Term Potentiation', *Neuron*, 93(2), pp. 281-290.
- Nishiki, T. and Augustine, G. J. (2004) 'Synaptotagmin I synchronizes transmitter release in mouse hippocampal neurons', *J Neurosci*, 24(27), pp. 6127-32.
- Niswender, C. M. and Conn, P. J. (2010) 'Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50(1), pp. 295-322.
- Noya, S. B., Colameo, D., Brüning, F., Spinnler, A., Mircsof, D., Opitz, L., Mann, M., Tyagarajan, S. K., Robles, M. S. and Brown, S. A. (2019) 'The forebrain synaptic transcriptome is organized by clocks but its proteome is driven by sleep', *Science*, 366(6462).
- O'Hayre, M., Eichel, K., Avino, S., Zhao, X., Steffen, D. J., Feng, X., Kawakami, K., Aoki, J., Messer, K., Sunahara, R., Inoue, A., von Zastrow, M. and Gutkind, J. S. (2017) 'Genetic evidence that beta-arrestins are dispensable for the initiation of beta2-adrenergic receptor signaling to ERK', *Sci Signal*, 10(484).
- O'Rourke, J. G., Gareau, J. R., Ochaba, J., Song, W., Rasko, T., Reverter, D., Lee, J., Monteys, A. M., Pallos, J., Mee, L., Vashishtha, M., Apostol, B. L., Nicholson, T. P., Illes, K., Zhu, Y. Z., Dasso, M., Bates, G. P., Difulgia, M., Davidson, B., Wanker, E. E., Marsh, J. L., Lima, C. D., Steffan, J. S. and Thompson, L. M. (2013) 'SUMO-2 and PIAS1 modulate insoluble mutant huntingtin protein accumulation', *Cell Rep*, 4(2), pp. 362-75.
- Oh, Y., Kim, Y. M., Mouradian, M. M. and Chung, K. C. (2011) 'Human Polycomb protein 2 promotes alpha-synuclein aggregate formation through covalent SUMOylation', *Brain Res*, 1381, pp. 78-89.

- Opazo, P. and Choquet, D. (2011) 'A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors', *Mol Cell Neurosci*, 46, pp. 1--8.
- Opazo, P., Sainlos, M. and Choquet, D. (2012) 'Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots', *Curr Opin Neurobiol*, 22(3), pp. 453-60.
- Pandya, N. J., Koopmans, F., Slotman, J. A., Paliukhovich, I., Houtsmuller, A. B., Smit, A. B. and Li, K. W. (2017) 'Correlation profiling of brain sub-cellular proteomes reveals co-assembly of synaptic proteins and subcellular distribution', *Sci Rep*, 7(1), pp. 12107.
- Paoletti, P., Bellone, C. and Zhou, Q. (2013) 'NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease', *Nat Rev Neurosci*, 14, pp. 383--400.
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D. and Gross, C. T. (2011) 'Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development', *Science*, 333(6048), pp. 1456-8.
- Park, S., Park, J. M., Kim, S., Kim, J. A., Shepherd, J. D., Smith-Hicks, C. L., Chowdhury, S., Kaufmann, W., Kuhl, D., Ryazanov, A. G., Haganir, R. L., Linden, D. J. and Worley, P. F. (2008) 'Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD', *Neuron*, 59(1), pp. 70-83.
- Parker, A. R., Forster, L. A. and Baro, D. J. (2019) 'Modulator-Gated, SUMOylation-Mediated, Activity-Dependent Regulation of Ionic Current Densities Contributes to Short-Term Activity Homeostasis', *J Neurosci*, 39(4), pp. 596-611.
- Parmentier, M. L., Prézeau, L., Bockaert, J. and Pin, J. P. (2002) 'A model for the functioning of family 3 GPCRs', *Trends Pharmacol Sci*, 23(6), pp. 268-74.
- Perroy, J., El Far, O., Bertaso, F., Pin, J. P., Betz, H., Bockaert, J. and Fagni, L. (2002) 'PICK1 is required for the control of synaptic transmission by the metabotropic glutamate receptor 7', *EMBO J*, 21(12), pp. 2990-9.
- Pfammatter, S., Bonneil, E., McManus, F. P. and Thibault, P. (2018) 'Gas-Phase Enrichment of Multiply Charged Peptide Ions by Differential Ion Mobility Extend the Comprehensiveness of SUMO Proteome Analyses', *J Am Soc Mass Spectrom*, 29(6), pp. 1111-1124.
- Pin, J. P. and Bettler, B. (2016) 'Organization and functions of mGlu and GABAB receptor complexes', *Nature*, 540(7631), pp. 60-68.
- Pin, J. P., Galvez, T. and Prézeau, L. (2003) 'Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors', *Pharmacol Ther*, 98(3), pp. 325-54.
- Plant, K., Pelkey, K. A., Bortolotto, Z. A., Morita, D., Terashima, A., McBain, C. J., Collingridge, G. L. and Isaac, J. T. (2006) 'Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation', *Nat Neurosci*, 9(5), pp. 602-4.
- Prezeau, L., Gomeza, J., Ahern, S., Mary, S., Galvez, T., Bockaert, J. and Pin, J. P. (1996) 'Changes in the carboxyl-terminal domain of metabotropic glutamate receptor 1 by alternative splicing generate receptors with differing agonist-independent activity', *Mol Pharmacol*, 49(3), pp. 422-9.
- Prieto, M., Folci, A., Poupon, G., Schiavi, S., Buzzelli, V., Pronot, M., Francois, U., Pousinha, P., Lattuada, N., Abelanet, S., Castagnola, S., Chafai, M., Khayachi, A., Gwizdek, C., Brau, F., Deval, E., Francolini, M., Bardoni, B., Humeau, Y., Trezza, V. and Martin, S. (2021) 'Missense mutation of Fmr1 results in impaired AMPAR-mediated plasticity and socio-cognitive deficits in mice', *Nat Commun*, 12(1), pp. 1557.
- Prota, A. E., Bargsten, K., Zurwerra, D., Field, J. J., Diaz, J. F., Altmann, K. H. and Steinmetz, M. O. (2013) 'Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents', *Science*, 339(6119), pp. 587-90.

- Prudent, J., Zunino, R., Sugiura, A., Mattie, S., Shore, G. C. and McBride, H. M. (2015) 'MAPL SUMOylation of Drp1 Stabilizes an ER/Mitochondrial Platform Required for Cell Death', *Mol Cell*, 59(6), pp. 941-55.
- Prybylowski, K., Chang, K., Sans, N., Kan, L., Vicini, S. and Wenthold, R. J. (2005) 'The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2', *Neuron*, 47(6), pp. 845-57.
- Pula, G., Mundell, S. J., Roberts, P. J. and Kelly, E. (2004) 'Agonist-independent internalization of metabotropic glutamate receptor 1a is arrestin- and clathrin-dependent and is suppressed by receptor inverse agonists', *J Neurochem*, 89(4), pp. 1009-20.
- Qi, Y., Wang, J., Bomben, V. C., Li, D. P., Chen, S. R., Sun, H., Xi, Y., Reed, J. G., Cheng, J., Pan, H. L., Noebels, J. L. and Yeh, E. T. (2014) 'Hyper-SUMOylation of the Kv7 potassium channel diminishes the M-current leading to seizures and sudden death', *Neuron*, 83(5), pp. 1159-71.
- Rajan, S., Plant, L. D., Rabin, M. L., Butler, M. H. and Goldstein, S. A. (2005) 'Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1', *Cell*, 121(1), pp. 37-47.
- Raynaud, F., Homburger, V., Seveno, M., Vigy, O., Moutin, E., Fagni, L. and Perroy, J. (2018) 'SNAP23-Kif5 complex controls mGlu1 receptor trafficking', *J Mol Cell Biol*, 10(5), pp. 423-436.
- Rebola, N., Carta, M. and Mulle, C. (2017) 'Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: Implications for memory encoding', *Nat Rev Neurosci*, 18, pp. 209--221.
- Reiner, A. and Levitz, J. (2018) 'Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert', *Neuron*, 98(6), pp. 1080-1098.
- Roberson, E. D. and Sweatt, J. D. (1996) 'Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation', *J Biol Chem*, 271(48), pp. 30436-41.
- Rodriguez, M. S., Dargemont, C. and Hay, R. T. (2001) 'SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting', *J Biol Chem*, 276(16), pp. 12654-9.
- Romano, C., Yang, W. L. and O'Malley, K. L. (1996) 'Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer', *J Biol Chem*, 271(45), pp. 28612-6.
- Rondard, P., Goudet, C., Kniazeff, J., Pin, J. P. and Przeau, L. (2011) 'The complexity of their activation mechanism opens new possibilities for the modulation of mGlu and GABAB class C G protein-coupled receptors', *Neuropharmacology*, 60, pp. 82--92.
- Rott, R., Szargel, R., Shani, V., Hamza, H., Savyon, M., Abd Elghani, F., Bandopadhyay, R. and Engelender, S. (2017) 'SUMOylation and ubiquitination reciprocally regulate alpha-synuclein degradation and pathological aggregation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(50), pp. 13176-13181.
- Sager, C., Tapken, D., Kott, S. and Hollmann, M. (2009) 'Functional modulation of AMPA receptors by transmembrane AMPA receptor regulatory proteins', *Neuroscience*, 158(1), pp. 45-54.
- Saito, N. and Shirai, Y. (2002) 'Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype', *J Biochem*, 132(5), pp. 683-7.
- Salin, P. A., Malenka, R. C. and Nicoll, R. A. (1996) 'Cyclic AMP Mediates a Presynaptic Form of LTP at Cerebellar Parallel Fiber Synapses', *Neuron*, 16(4), pp. 797-803.
- Savtchenko, L. P. and Rusakov, D. A. (2014) 'Moderate AMPA receptor clustering on the nanoscale can efficiently potentiate synaptic current', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1633), pp. 20130167.

- Schapitz, I. U., Behrend, B., Pechmann, Y., Lappe-Siefke, C., Kneussel, S. J., Wallace, K. E., Stempel, A. V., Buck, F., Grant, S. G., Schweizer, M., Schmitz, D., Schwarz, J. R., Holzbaur, E. L. and Kneussel, M. (2010) 'Neurologin 1 is dynamically exchanged at postsynaptic sites', *J Neurosci*, 30(38), pp. 12733-44.
- Schatzle, P., Esteves da Silva, M., Tas, R. P., Katrukha, E. A., Hu, H. Y., Wierenga, C. J., Kapitein, L. C. and Hoogenraad, C. C. (2018) 'Activity-Dependent Actin Remodeling at the Base of Dendritic Spines Promotes Microtubule Entry', *Curr Biol*, 28(13), pp. 2081-2093 e6.
- Schimmel, J., Eifler, K., Sigurethsson, J. O., Cuijpers, S. A., Hendriks, I. A., Verlaan-de Vries, M., Kelstrup, C. D., Francavilla, C., Medema, R. H., Olsen, J. V. and Vertegaal, A. C. (2014) 'Uncovering SUMOylation dynamics during cell-cycle progression reveals FoxM1 as a key mitotic SUMO target protein', *Mol Cell*, 53(6), pp. 1053-66.
- Schmitz, D., Mellor, J., Frerking, M. and Nicoll, R. A. (2001) 'Presynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20), pp. 11003-8.
- Schorova, L. and Martin, S. (2016) 'Sumoylation in Synaptic Function and Dysfunction', *Front Synaptic Neurosci*, 8, pp. 9.
- Schorova, L., Pronot, M., Poupon, G., Prieto, M., Folci, A., Khayachi, A., Brau, F., Casse, F., Gwizdek, C. and Martin, S. (2019) 'The synaptic balance between sumoylation and desumoylation is maintained by the activation of metabotropic mGlu5 receptors', *Cell Mol Life Sci*, 76(15), pp. 3019-3031.
- Schou, J., Kelstrup, C. D., Hayward, D. G., Olsen, J. V. and Nilsson, J. (2014) 'Comprehensive identification of SUMO2/3 targets and their dynamics during mitosis', *PLoS One*, 9(6), pp. e100692.
- Schulz, S., Chachami, G., Kozackiewicz, L., Winter, U., Stankovic-Valentin, N., Haas, P., Hofmann, K., Urlaub, H., Ova, H., Wittbrodt, J., Meulmeester, E. and Melchior, F. (2012) 'Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions', *EMBO Rep*, 13(10), pp. 930-8.
- Scott, J. D., Dessauer, C. W. and Taskn, K. (2013) 'Creating order from chaos: Cellular regulation by kinase anchoring', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, pp. 187--210.
- Seitz-Tutter, D., Langford, G. M. and Weiss, D. G. (1988) 'Dynamic instability of native microtubules from squid axons is rare and independent of gliding and vesicle transport', *Experimental Cell Research*, 178(2), pp. 504-512.
- Seiple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. and Noble-Haeusslein, L. J. (2013) 'Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species', *Prog Neurobiol*, 106-107, pp. 1--16.
- Sevastyanova, T. N. and Kammermeier, P. J. (2014) 'Cooperative signaling between homodimers of metabotropic glutamate receptors 1 and 5', *Mol Pharmacol*, 86(5), pp. 492-504.
- Shahraki, A. and Stone, T. W. (2002) 'Long-term potentiation and adenosine sensitivity are unchanged in the AS/AGU protein kinase Cgamma-deficient rat', *Neurosci Lett*, 327(3), pp. 165-8.
- Shalizi, A., Gaudilliere, B., Yuan, Z., Stegmuller, J., Shirogane, T., Ge, Q., Tan, Y., Schulman, B., Harper, J. W. and Bonni, A. (2006) 'A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation', *Science*, 311(5763), pp. 1012-7.
- Sharma, P., Yamada, S., Lualdi, M., Dasso, M. and Kuehn, M. R. (2013) 'Senp1 is essential for desumoylating Sumo1-modified proteins but dispensable for Sumo2 and Sumo3 deconjugation in the mouse embryo', *Cell Rep*, 3(5), pp. 1640-50.
- Sheng, M. (2001) 'Molecular organization of the postsynaptic specialization', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13), pp. 7058-61.

- Sheng, M. and Hoogenraad, C. C. (2007) 'The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view', *Annu Rev Biochem*, 76(1), pp. 823-47.
- Sheng, M. and Kim, E. (2011) 'The postsynaptic organization of synapses', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12).
- Shepherd, J. D. and Huganir, R. L. (2007) 'The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, pp. 613--643.
- Shin, E. J., Shin, H. M., Nam, E., Kim, W. S., Kim, J. H., Oh, B. H. and Yun, Y. (2012) 'DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease', *EMBO Rep*, 13(4), pp. 339-46.
- Shinbo, Y., Niki, T., Taira, T., Ooe, H., Takahashi-Niki, K., Maita, C., Seino, C., Iguchi-Ariga, S. M. and Ariga, H. (2006) 'Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities', *Cell Death Differ*, 13(1), pp. 96-108.
- Snyder, E. M., Philpot, B. D., Huber, K. M., Dong, X., Fallon, J. R. and Bear, M. F. (2001) 'Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation', *Nat Neurosci*, 4(11), pp. 1079-85.
- Stauch, K. L., Purnell, P. R., Villeneuve, L. M. and Fox, H. S. (2015) 'Proteomic analysis and functional characterization of mouse brain mitochondria during aging reveal alterations in energy metabolism', *Proteomics*, 15(9), pp. 1574-86.
- Steffan, J. S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L. C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y. Z., Cattaneo, E., Pandolfi, P. P., Thompson, L. M. and Marsh, J. L. (2004) 'SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology', *Science*, 304(5667), pp. 100-4.
- Striz, A. C., Stephan, A. P., Lopez-Coral, A. and Tuma, P. L. (2018) 'Rab17 regulates apical delivery of hepatic transcytotic vesicles', *Mol Biol Cell*, 29(23), pp. 2887-2897.
- Sudhof, T. C. (2004) 'The synaptic vesicle cycle', *Annu Rev Neurosci*, 27(1), pp. 509-47.
- Sudhof, T. C. (2012) 'The presynaptic active zone', *Neuron*, 75(1), pp. 11-25.
- Sudhof, T. C. (2018) 'Towards an Understanding of Synapse Formation', *Neuron*, 100(2), pp. 276-293.
- Südhof, T. C. (2013) 'Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle', *Neuron*, 80.
- Südhof, T. C. and Rothman, J. E. (2009) 'Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins', *Science*, 323, pp. 474--477.
- Sun, H., Lu, L., Zuo, Y., Wang, Y., Jiao, Y., Zeng, W. Z., Huang, C., Zhu, M. X., Zamponi, G. W., Zhou, T., Xu, T. L., Cheng, J. and Li, Y. (2014) 'Kainate receptor activation induces glycine receptor endocytosis through PKC deSUMOylation', *Nat Commun*, 5, pp. 4980.
- Swanwick, C. C., Shapiro, M. E., Vicini, S. and Wenthold, R. J. (2010) 'Flotillin-1 promotes formation of glutamatergic synapses in hippocampal neurons', *Dev Neurobiol*, 70(13), pp. 875-83.
- Tai, D. J., Liu, Y. C., Hsu, W. L., Ma, Y. L., Cheng, S. J., Liu, S. Y. and Lee, E. H. (2016) 'MeCP2 SUMOylation rescues Mecp2-mutant-induced behavioural deficits in a mouse model of Rett syndrome', *Nat Commun*, 7, pp. 10552.
- Tammsalu, T., Matic, I., Jaffray, E. G., Ibrahim, A. F., Tatham, M. H. and Hay, R. T. (2015) 'Proteome-wide identification of SUMO modification sites by mass spectrometry', *Nat Protoc*, 10(9), pp. 1374-88.
- Tang, A. H., Chen, H., Li, T. P., Metzbower, S. R., MacGillavry, H. D. and Blanpied, T. A. (2016) 'A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors', *Nature*, 536(7615), pp. 210-4.
- Tang, L. T., Craig, T. J. and Henley, J. M. (2015) 'SUMOylation of synapsin Ia maintains synaptic vesicle availability and is reduced in an autism mutation', *Nat Commun*, 6, pp. 7728.

- Tang, Z., El Far, O., Betz, H. and Scheschonka, A. (2005) 'Pias1 interaction and sumoylation of metabotropic glutamate receptor 8', *J Biol Chem*, 280(46), pp. 38153-9.
- Tardin, C., Cognet, L., Bats, C., Lounis, B. and Choquet, D. (2003) 'Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses', *EMBO J*, 22(18), pp. 4656-65.
- Tatham, M. H., Matic, I., Mann, M. and Hay, R. T. (2011) 'Comparative proteomic analysis identifies a role for SUMO in protein quality control', *Sci Signal*, 4(178), pp. rs4.
- Thalhammer, A., Rudhard, Y., Tigaret, C. M., Volynski, K. E., Rusakov, D. A. and Schoepfer, R. (2006) 'CaMKII translocation requires local NMDA receptor-mediated Ca²⁺ signaling', *Embo j*, 25(24), pp. 5873-83.
- Tirard, M., Hsiao, H. H., Nikolov, M., Urlaub, H., Melchior, F. and Brose, N. (2012) 'In vivo localization and identification of SUMOylated proteins in the brain of His6-HA-SUMO1 knock-in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(51), pp. 21122-7.
- Treede, R. D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B. H., Svensson, P., Vlaeyen, J. W. S. and Wang, S. J. (2019) 'Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11)', *Pain*, 160(1), pp. 19-27.
- Tu, J. C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J. P., Petralia, R. S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V. K., Lanahan, A. A., Sheng, M. and Worley, P. F. (1999) 'Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins', *Neuron*, 23(3), pp. 583-92.
- Turrigiano, G. G. (2008) 'The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses', *Cell*, 135, pp. 422--435.
- Um, J. W. and Chung, K. C. (2006) 'Functional modulation of parkin through physical interaction with SUMO-1', *J Neurosci Res*, 84(7), pp. 1543-54.
- Vallejo, D., Codocedo, J. F. and Inestrosa, N. C. (2017) 'Posttranslational Modifications Regulate the Postsynaptic Localization of PSD-95', *Mol Neurobiol*, 54(3), pp. 1759-1776.
- Végh, M. J., de Waard, M. C., van der Pluijm, I., Ridwan, Y., Sassen, M. J., van Nierop, P., van der Schors, R. C., Li, K. W., Hoeijmakers, J. H., Smit, A. B. and van Kesteren, R. E. (2012) 'Synaptic proteome changes in a DNA repair deficient *ercc1* mouse model of accelerated aging', *J Proteome Res*, 11(3), pp. 1855-67.
- Vertegaal, A. C., Andersen, J. S., Ogg, S. C., Hay, R. T., Mann, M. and Lamond, A. I. (2006) 'Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics', *Mol Cell Proteomics*, 5(12), pp. 2298-310.
- Volk, L., Chiu, S. L., Sharma, K. and Haganir, R. L. (2015) 'Glutamate synapses in human cognitive disorders', *Annu Rev Neurosci*, 38(March), pp. 127-49.
- Wang, J., Chen, L., Wen, S., Zhu, H., Yu, W., Moskowitz, I. P., Shaw, G. M., Finnell, R. H. and Schwartz, R. J. (2011) 'Defective sumoylation pathway directs congenital heart disease', *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 91(6), pp. 468-76.
- Wang, L., Wansleeben, C., Zhao, S., Miao, P., Paschen, W. and Yang, W. (2014) 'SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development', *EMBO Rep*, 15(8), pp. 878-85.
- Wang, X. D., Gong, Y., Chen, Z. L., Gong, B. N., Xie, J. J., Zhong, C. Q., Wang, Q. L., Diao, L. H., Xu, A., Han, J., Altman, A. and Li, Y. (2015) 'TCR-induced sumoylation of the kinase PKC- θ controls T cell synapse organization and T cell activation', *Nat Immunol*, 16(11), pp. 1195-203.

- Wang, Y., Gao, Y., Tian, Q., Deng, Q., Wang, Y., Zhou, T., Liu, Q., Mei, K., Wang, Y., Liu, H., Ma, R., Ding, Y., Rong, W., Cheng, J., Yao, J., Xu, T. L., Zhu, M. X. and Li, Y. (2018) 'TRPV1 SUMOylation regulates nociceptive signaling in models of inflammatory pain', *Nat Commun*, 9(1), pp. 1529.
- Wang, Z., Edwards, J. G., Riley, N., Provance, D. W., Jr., Karcher, R., Li, X. D., Davison, I. G., Ikebe, M., Mercer, J. A., Kauer, J. A. and Ehlers, M. D. (2008) 'Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity', *Cell*, 135(3), pp. 535-48.
- Watanabe, M., Takahashi, K., Tomizawa, K., Mizusawa, H. and Takahashi, H. (2008) 'Developmental regulation of Ubc9 in the rat nervous system', *Acta Biochim Pol*, 55(4), pp. 681-6.
- Wei, B., Huang, C., Liu, B., Wang, Y., Xia, N., Fan, Q., Chen, G. Q. and Cheng, J. (2018) 'Mitotic Phosphorylation of SENP3 Regulates DeSUMOylation of Chromosome-Associated Proteins and Chromosome Stability', *Cancer Res*, 78(9), pp. 2171-2178.
- Weingarten, J., Laßek, M., Mueller, B. F., Rohmer, M., Baeumlisberger, D., Beckert, B., Ade, J., Gogesch, P., Acker-Palmer, A., Karas, M. and Volkmandt, W. (2015) 'Regional Specializations of the PAZ Proteomes Derived from Mouse Hippocampus, Olfactory Bulb and Cerebellum', *Proteomes*, 3(2), pp. 74-88.
- Wenthold, R. J., Petralia, R. S., Blahos, J., II and Niedzielski, A. S. (1996) 'Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons', *J Neurosci*, 16(6), pp. 1982-9.
- Whittaker, V. P. (1959) 'The isolation and characterization of acetylcholine-containing particles from brain', *Biochem J*, 72, pp. 694-706.
- Wiechmann, S., Gartner, A., Kniss, A., Stengl, A., Behrends, C., Rogov, V. V., Rodriguez, M. S., Dotsch, V., Muller, S. and Ernst, A. (2017) 'Site-specific inhibition of the small ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating enzyme Ubc9 selectively impairs SUMO chain formation', *J Biol Chem*, 292(37), pp. 15340-15351.
- Wilhelm, B. G., Mandad, S., Truckenbrodt, S., Krohnert, K., Schafer, C., Rammner, B., Koo, S. J., Classen, G. A., Krauss, M., Haucke, V., Urlaub, H. and Rizzoli, S. O. (2014) 'Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins', *Science*, 344(6187), pp. 1023-8.
- Wilkinson, K. A. and Henley, J. M. (2011) 'Analysis of metabotropic glutamate receptor 7 as a potential substrate for SUMOylation', *Neurosci Lett*, 491(3), pp. 181-6.
- Wilkinson, K. A., Martin, S., Tyagarajan, S. K., Arancio, O., Craig, T. J., Guo, C., Fraser, P. E., Goldstein, S. A. N. and Henley, J. M. (2017) 'Commentary: Analysis of SUMO1-conjugation at synapses', *Front Cell Neurosci*, 11, pp. 345.
- Wilkinson, K. A., Nishimune, A. and Henley, J. M. (2008) 'Analysis of SUMO-1 modification of neuronal proteins containing consensus SUMOylation motifs', *Neurosci Lett*, 436(2), pp. 239-44.
- Woolfrey, K. M. and Dell'Acqua, M. L. (2015) 'Coordination of Protein Phosphorylation and Dephosphorylation in Synaptic Plasticity', *J Biol Chem*, 290(48), pp. 28604-12.
- Xiao, Y., Pollack, D., Nieves, E., Winchell, A., Callaway, M. and Vigodner, M. (2015) 'Can your protein be sumoylated? A quick summary and important tips to study SUMO-modified proteins', *Anal Biochem*, 477, pp. 95-7.
- Xu, J., Tan, P., Li, H., Cui, Y., Qiu, Y., Wang, H., Zhang, X., Li, J., Zhu, L., Zhou, W. and Chen, H. (2019) 'Direct SUMOylation of M1 muscarinic acetylcholine receptor increases its ligand-binding affinity and signal transduction', *FASEB J*, 33(3), pp. 3237-3251.
- Yamada, T., Yang, Y., Huang, J., Coppola, G., Geschwind, D. H. and Bonni, A. (2013) 'Sumoylated MEF2A coordinately eliminates orphan presynaptic sites and promotes maturation of presynaptic boutons', *J Neurosci*, 33(11), pp. 4726-40.

- Yamaguchi, T., Sharma, P., Athanasiou, M., Kumar, A., Yamada, S. and Kuehn, M. R. (2005) 'Mutation of SENP1/SuPr-2 reveals an essential role for desumoylation in mouse development', *Mol Cell Biol*, 25(12), pp. 5171-82.
- Yang, C. Y., Yu, T. H., Wen, W. L., Ling, P. and Hsu, K. S. (2019) 'Conditional Deletion of CC2D1A Reduces Hippocampal Synaptic Plasticity and Impairs Cognitive Function through Rac1 Hyperactivation', *J Neurosci*, 39(25), pp. 4959-4975.
- Yang, K., Shi, Y., Du, X., Wang, J., Zhang, Y., Shan, S., Yuan, Y., Wang, R., Zhou, C., Liu, Y., Cai, Z., Wang, Y., Fan, L., Xu, H., Yu, J., Cheng, J., Li, F. and Qiu, Z. (2021) 'SENP1 in the retrosplenial agranular cortex regulates core autistic-like symptoms in mice', *bioRxiv*, pp. 2021.01.24.427868.
- Yang, W., Sheng, H., Homi, H. M., Warner, D. S. and Paschen, W. (2008a) 'Cerebral ischemia/stroke and small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation - A new target for therapeutic intervention?', *Journal of Neurochemistry* 106, pp. 989-999.
- Yang, W., Sheng, H., Thompson, J. W., Zhao, S., Wang, L., Miao, P., Liu, X., Moseley, M. A. and Paschen, W. (2014) 'Small ubiquitin-like modifier 3-modified proteome regulated by brain ischemia in novel small ubiquitin-like modifier transgenic mice: putative protective proteins/pathways', *Stroke*, 45(4), pp. 1115-22.
- Yang, W., Sheng, H., Warner, D. S. and Paschen, W. (2008b) 'Transient focal cerebral ischemia induces a dramatic activation of small ubiquitin-like modifier conjugation', *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(5), pp. 892-6.
- Yang, W., Wang, L., Roehn, G., Pearlstein, R. D., Ali-Osman, F., Pan, H., Goldbrunner, R., Krantz, M., Harms, C. and Paschen, W. (2013) 'Small ubiquitin-like modifier 1-3 conjugation [corrected] is activated in human astrocytic brain tumors and is required for glioblastoma cell survival', *Cancer Sci*, 104(1), pp. 70-7.
- Yin, S., Noetzel, M. J., Johnson, K. A., Zamorano, R., Jalan-Sakrikar, N., Gregory, K. J., Conn, P. J. and Niswender, C. M. (2014) 'Selective actions of novel allosteric modulators reveal functional heteromers of metabotropic glutamate receptors in the CNS', *J Neurosci*, 34(1), pp. 79-94.
- Yonekawa, Y., Harada, A., Okada, Y., Funakoshi, T., Kanai, Y., Takei, Y., Terada, S., Noda, T. and Hirokawa, N. (1998) 'Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice', *J Cell Biol*, 141(2), pp. 431-41.
- Yu, S., Galeffi, F., Rodriguiz, R. M., Wang, Z., Shen, Y., Lyu, J., Li, R., Bernstock, J. D., Johnson, K. R., Liu, S., Sheng, H., Turner, D. A., Wetsel, W. C., Paschen, W. and Yang, W. (2020) 'Small ubiquitin-like modifier 2 (SUMO2) is critical for memory processes in mice', *FASEB J*, 34(11), pp. 14750-14767.
- Zalcman, G., Federman, N. and Romano, A. (2018) 'CaMKII Isoforms in Learning and Memory: Localization and Function', *Front Mol Neurosci*, 11, pp. 445.
- Zhang, F. P., Mikkonen, L., Toppari, J., Palvimo, J. J., Thesleff, I. and Janne, O. A. (2008) 'Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development', *Mol Cell Biol*, 28(17), pp. 5381-90.
- Zhang, H., Huang, D., Zhou, J., Yue, Y. and Wang, X. (2019a) 'SUMOylation participates in induction of ischemic tolerance in mice', *Brain Res Bull*, 147, pp. 159-164.
- Zhang, H., Wang, Y., Zhu, A., Huang, D., Deng, S., Cheng, J., Zhu, M. X. and Li, Y. (2016) 'SUMO-specific protease 1 protects neurons from apoptotic death during transient brain ischemia/reperfusion', *Cell Death Dis*, 7(11), pp. e2484.
- Zhang, L., Liu, X., Sheng, H., Liu, S., Li, Y., Zhao, J. Q., Warner, D. S., Paschen, W. and Yang, W. (2017) 'Neuron-specific SUMO knockdown suppresses global gene expression response and worsens functional outcome after transient forebrain ischemia in mice', *Neuroscience*, 343, pp. 190-212.

- Zhang, W., Chuang, Y. A., Na, Y., Ye, Z., Yang, L., Lin, R., Zhou, J., Wu, J., Qiu, J., Savonenko, A., Leahy, D. J., Haganir, R., Linden, D. J. and Worley, P. F. (2019b) 'Arc Oligomerization Is Regulated by CaMKII Phosphorylation of the GAG Domain: An Essential Mechanism for Plasticity and Memory Formation', *Mol Cell*, 75(1), pp. 13-25 e5.
- Zhang, Y. Q. and Sarge, K. D. (2008) 'Sumoylation of amyloid precursor protein negatively regulates Abeta aggregate levels', *Biochem Biophys Res Commun*, 374(4), pp. 673-8.
- Zhao, X., Xia, B., Cheng, J., Zhu, M. X. and Li, Y. (2020) 'PKC ϵ SUMOylation Is Required for Mediating the Nociceptive Signaling of Inflammatory Pain', *Cell Rep*, 33(1), pp. 108191.
- Zhou, H., Di Palma, S., Preisinger, C., Peng, M., Polat, A. N., Heck, A. J. and Mohammed, S. (2013) 'Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome', *J Proteome Res*, 12(1), pp. 260-71.
- Zhou, Q., Homma, K. J. and Poo, M.-M. (2004) 'Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses', *Neuron*, 44(5), pp. 749-757.
- Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y. and Malinow, R. (2000) 'Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity', *Nat Neurosci*, 3(11), pp. 1098-106.
- Zucker, R. S. and Regehr, W. G. (2002) 'Short-term synaptic plasticity', *Annual Review of Physiology*, 64, pp. 355-405.

ANNEXES

Annexe 1

Sumoylation regulates FMRP-mediated dendritic spine elimination and maturation

(Publié dans Nature Communications, Février 2018)

Khayachi A^{1#}, Gwizdek C^{1#}, Poupon G¹, Alcor D², Chafai M¹, Cassé F¹, Maurin T¹, Prieto M¹, Folci A¹, De Graeve F³, Castagnola S¹, Gautier R¹, Schorova L¹, Loriol C¹, **Pronot M¹**, Besse F³, Brau F¹, Deval E¹, Bardoni B⁴ & Martin S⁴.

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, 06560, France.

² Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06200, France.

³ Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, 06108, France.

⁴ Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, 06560 France. # Equal contribution

Le syndrome du X fragile (SXF) est la cause la plus fréquente de déficience intellectuelle héréditaire et la cause monogénique la mieux étudiée de l'autisme. SXF résulte de l'absence fonctionnelle de la protéine FMRP (Fragile-X Mental Retardation Protein). FMRP se lie à de nombreux ARNs, et participe à l'élimination et la maturation postsynaptique. Lorsque FMRP est absente dans le SXF, cette élimination ne se fait plus correctement et conduit à des anomalies morphofonctionnelles de la synapse. Ceci est corrélé à une altération de la transmission et de la plasticité synaptique ainsi qu'à des déficits sociocognitifs. FMRP est un composant clé des granules d'ARN neuronaux dans lesquels les ARNm sont transportés le long des axones et des dendrites jusqu'à la base des synapses et libérés en fonction de l'activité pour permettre leur traduction locale. Les mécanismes de régulation qui régissent la fonction de FMRP sont encore mal compris. Nous avons démontré que FMRP est un substrat de la SUMOylation dans le cerveau des mammifères. En combinant approches de biologie moléculaire, de biochimie et d'imagerie, nous montrons que la SUMOylation de FMRP est déclenchée par l'activation des récepteurs mGlu5 dans les neurones. Ceci conduit à la dissociation de FMRP des granules d'ARNm, permettant ainsi leur traduction locale qui, à son tour, régule l'élimination et la maturation des épines dendritiques. Dans l'ensemble, nos résultats révèlent que la SUMOylation de FMRP est un mécanisme de régulation physiologique essentiel de la maturation neuronale.



Dans ce travail, J'ai participé à la préparation des cultures primaires de neurones de souris et de matériels biologiques lors du processus de révision de cet article.

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-018-03222-y

OPEN

Sumoylation regulates FMRP-mediated dendritic spine elimination and maturation

Anouar Khayachi¹, Carole Gwizdek¹, Gwénola Poupon¹, Damien Alcor², Magda Chafai¹, Frédéric Cassé¹, Thomas Maurin¹, Marta Prieto¹, Alessandra Folci¹, Fabienne De Graeve³, Sara Castagnola¹, Romain Gautier¹, Lenka Schorova¹, Céline Lorioi¹, Marie Pronot¹, Florence Besse³, Frédéric Brau¹, Emmanuel Deval¹, Barbara Bardoni ⁴ & Stéphane Martin ⁴

Fragile X syndrome (FXS) is the most frequent inherited cause of intellectual disability and the best-studied monogenic cause of autism. FXS results from the functional absence of the fragile X mental retardation protein (FMRP) leading to abnormal pruning and consequently to synaptic communication defects. Here we show that FMRP is a substrate of the small ubiquitin-like modifier (SUMO) pathway in the brain and identify its active SUMO sites. We unravel the functional consequences of FMRP sumoylation in neurons by combining molecular replacement strategy, biochemical reconstitution assays with advanced live-cell imaging. We first demonstrate that FMRP sumoylation is promoted by activation of metabotropic glutamate receptors. We then show that this increase in sumoylation controls the homomerization of FMRP within dendritic mRNA granules which, in turn, regulates spine elimination and maturation. Altogether, our findings reveal the sumoylation of FMRP as a critical activity-dependent regulatory mechanism of FMRP-mediated neuronal function.

¹Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, 06560 Valbonne, France. ²Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06200 Nice, France. ³Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, 06108 Nice, France. ⁴Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, 06560 Valbonne, France. These authors contributed equally: Anouar Khayachi and Carole Gwizdek. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.M. (email: martin@ipmc.cnrs.fr)

In neurons, messenger RNA (mRNA) targeting to synapses and local synthesis of synaptic proteins are tightly regulated. Indeed, dysregulation of such processes leads to structural synaptic abnormalities and consequently to neurological disorders¹ classified as synaptopathies². Among them, the fragile X syndrome (FXS) is the most frequent form of inherited intellectual disability and a leading monogenic cause of autism with the prevalence of 1:4000 males and 1:7000 females. FXS results from mutations within the *FMR1* gene causing the loss of function of the RNA-binding protein FMRP. Localization studies revealed that FMRP is highly expressed in the central nervous system. FMRP binds a large subset of mRNAs in the mammalian brain and is a key component of RNA granules. These granules transport mRNA along axons and dendrites and are targeted to the base of active synapses to regulate local translation in an activity-dependent manner^{3–5}. Therefore, the transport and the subsequent regulation of local translation are critical processes to brain development as they play essential roles in stabilizing and maturing synapses^{3,4}. According to the role of FMRP in regulating translation at synapses, the loss of FMRP function in FXS leads to a pathological hyperabundance of long thin immature dendritic protrusions called filopodia^{6,7}. These structural defects result from an abnormal post-synaptic maturation and/or a failure in the synapse elimination process⁸. An increased number of immature spines associated with severe changes in synaptic transmission and plasticity as well as in social and cognitive behaviors have also been reported in *Fmr1* knockout (*Fmr1*^{−/y}) mouse models for FXS^{4,9,10}.

The majority of FMRP-containing mRNA granules localizes at the base of dendritic spines^{3,4}. Neuronal activation leads to the release of mRNAs from dendritic granules and their local translation at synapses (for a review, see ref. 5). Importantly, this activity-dependent process requires a tight spatiotemporal regulation involving many protein–protein interactions. Such a regulation is mainly governed by post-translational modifications (PTMs). Previous reports have shown that FMRP function is regulated by phosphorylation, which inhibits translation of its associated mRNAs, whereas dephosphorylation of FMRP promotes their translation^{11,12}. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 (mGlu5R) induces dephosphorylation of FMRP and its subsequent ubiquitination, which ultimately leads to FMRP degradation via the ubiquitin–proteasome pathway^{13,14}. Thus, a deeper comprehension of the activity-dependent molecular mechanisms controlling FMRP is absolutely critical to understanding the functional regulation of FMRP-mediated mRNA transport and local protein synthesis in physiological and pathological conditions, including FXS.

Sumoylation is a PTM involved in many cellular signaling pathways. It consists in the covalent enzymatic conjugation of the small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein to specific lysine residues of substrate proteins^{15,16}. The sumoylation process requires a dedicated enzymatic pathway^{17–19}. SUMO paralogs (~100 amino acids; ~11 kDa) are conjugated to its substrates via the action of the E2-conjugating enzyme Ubc9. Sumoylation is a reversible process due to the activity of specific desumoylation enzymes called Sentrin-proteases (SENPs²⁰). At the molecular level, sumoylation can modulate the dynamics of multi-protein complexes by preventing protein–protein interactions and/or by providing new binding sites for novel interactors^{21,22}.

Sumoylation regulates a wide range of neurodevelopmental processes^{18,19,23}. For instance, our group has demonstrated the spatiotemporal regulation of the SUMO system in the developing rat brain²⁴ and that sumoylation is regulated by neuronal activity²⁵ and the activation of mGlu5R²⁶. Sumoylation also influences various aspects of the neuronal function including

neurotransmitter release^{27,28}, spinogenesis^{29,30}, and synaptic communication^{31–33}.

Here, we report that FMRP is a novel sumoylation substrate in neurons. We demonstrate that FMRP sumoylation is absolutely essential to maintaining the shape of mRNA granules in dendrites and to controlling both the spine density and maturation. We identify the active SUMO sites on FMRP and show that activation of mGlu5R rapidly induces FMRP sumoylation triggering the dissociation of FMRP from dendritic RNA granules to allow for local translation. Altogether, our findings shed light on sumoylation as an essential activity-dependent mechanism that tunes spine elimination and maturation in the mammalian brain.

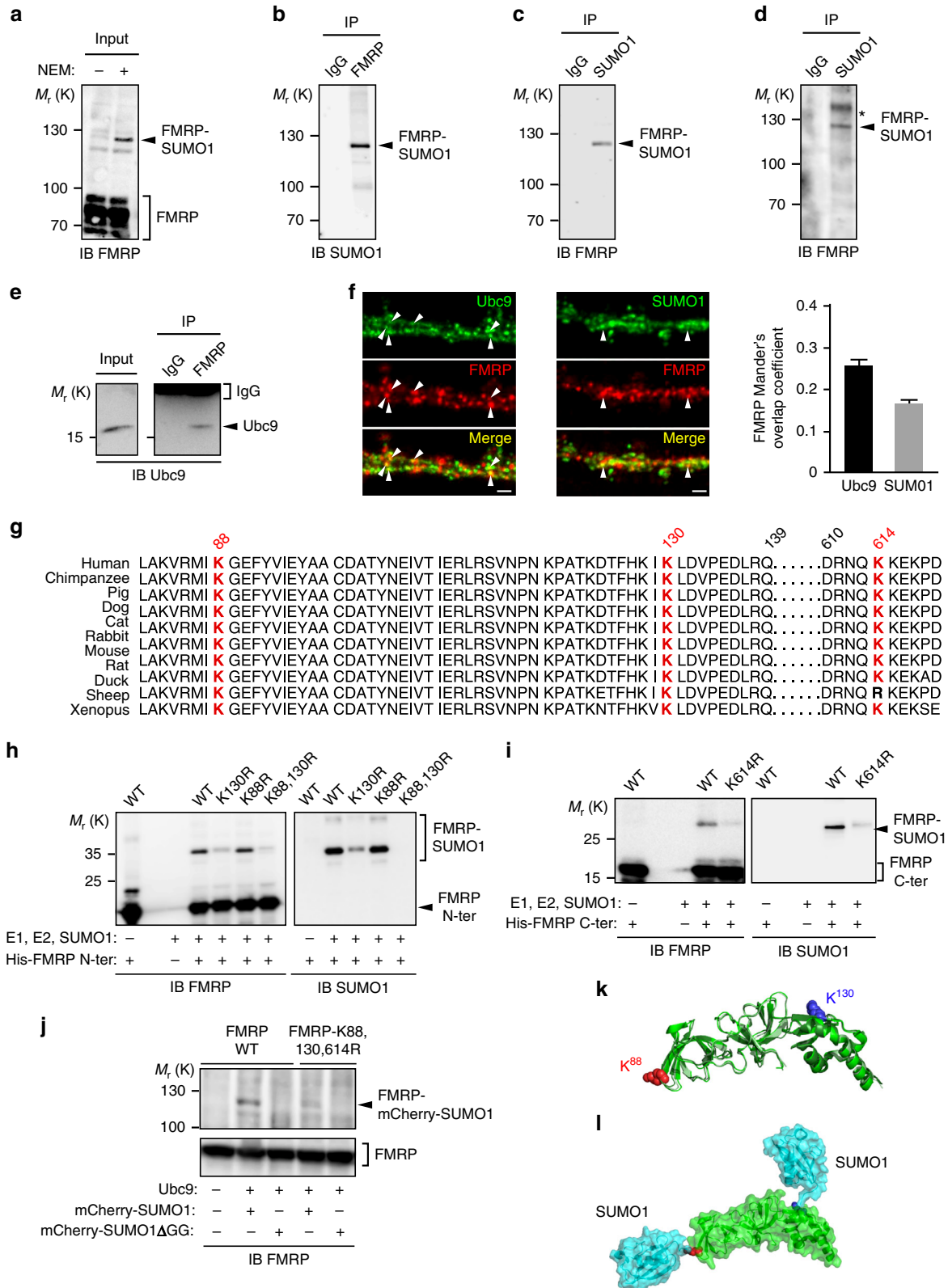
Results

FMRP is sumoylated in vivo. Given the critical importance of FMRP in brain development and maturation, it is of particular interest to understand the molecular mechanisms regulating FMRP function. Thus, we investigated whether FMRP is subjected to sumoylation. To this end, we performed immunoblot analyses and control assays using several commercial as well as in-house anti-FMRP and anti-SUMO1 antibodies on rodent brain homogenates (Fig. 1; Supplementary Fig. 1). We first analyzed rat brain homogenates in absence or presence of NEM (*N*-ethyl maleimide), which protects proteins from desumoylation during the lysis process³¹ (Fig. 1a; Supplementary Fig. 1f). FMRP is detected as isoforms ranging from 70 to 90 kDa. Interestingly, we found a higher molecular weight band at ~120 kDa that was detected only in the presence of NEM (Fig. 1a, total lane). The densitometric analysis of the ratio between the sumoylated form of FMRP and the total level of FMRP in NEM-treated input lanes revealed that there is about 4% of sumoylated FMRP in all the conditions tested (Supplementary Fig. 1c). We confirmed the upper band to be the sumoylated form of FMRP by immunoprecipitation experiments with specific anti-FMRP antibodies and anti-SUMO1 immunoblot (Fig. 1b) or with the converse experiment using anti-SUMO1 immunoprecipitation and anti-FMRP immunoblot (Fig. 1c). We also validated the sumoylation of FMRP in wild-type (WT) mouse brain homogenates (Fig. 1d). Accordingly, we were also able to co-immunoprecipitate the sole SUMO-conjugating enzyme Ubc9 from mouse brain homogenates using anti-FMRP antibodies (Fig. 1e). We further validated the sumoylation of FMRP in vivo using several combinations of FMRP/SUMO1 antibodies (Supplementary Fig. 1d, e, g–j) or in cultured neurons (Supplementary Fig. 1k–n). Immunolabeling experiments (Fig. 1f) showed that FMRP partially co-localizes with Ubc9 and SUMO1 in dendrites of mouse hippocampal neurons, providing further evidence of the interplay between FMRP and the SUMO pathway.

Sumoylation consists in the covalent binding of the SUMO moiety to a lysine residue of the consensus sequence on the substrate protein (Ψ KxD/E, where Ψ is a large hydrophobic residue, K is the target lysine, x can be any residue, and D/E are aspartate or glutamate³⁴). To identify lysine residues in FMRP potentially targeted by the sumoylation system, we used SUMO-prediction softwares to analyze the primary sequence of FMRP and then alignment tools to assess whether these potential sites are evolutionarily conserved across species (Fig. 1g). We identified three conserved residues, two proximal (K88, K130) and one distal (K614) lysines as putative targets of the SUMO system. To validate whether these lysine residues could be sumoylated, we performed site-directed mutagenesis combined with bacterial sumoylation assays^{31,35} (Fig. 1h, i). We demonstrated that FMRP sumoylation occurs at these residues (K88, K130, and K614) and showed that their mutation into arginine residues (K-to-R mutation) abolishes the sumoylation of FMRP (Fig. 1h, i). We

confirmed these data using sumoylation assays in mammalian COS7 cells in which the expression of the FMRP-K88,130,614R mutant prevents the sumoylation of FMRP (Fig. 1j). Consistent with the sumoylation of FMRP in the brain and according to our FMRP-SUMO1 models, which were computed using crystal structures available for the N-terminal part of FMRP, both lysine

residues (K88 and K130) are clearly exposed and accessible to sumoylation with a solvent accessible surface area (ASA) of ~70% and ~45%, respectively (Fig. 1k, l). We therefore conclude that FMRP is a SUMO substrate in vivo and that its sumoylation can occur at its N-terminal K88 and K130 and C-terminal K614 residues.



FMRP sumoylation participates in dendritic spine regulation.

FMRP is essential to proper spine stabilization and maturation^{3,4}. In FXS patients, the lack of functional FMRP leads to an immature neuronal morphology with a characteristic excess of abnormally long and thin filopodia³⁶. Similar morphological defects are also present in *Fmr1*^{-/-} mouse brains³⁷. Thus, we hypothesized that FMRP sumoylation could be critical in maintaining the density and the maturation of dendritic spines. To address this point, we used attenuated Sindbis particles^{38–40} to express either free green fluorescent protein (GFP), the WT GFP-FMRP, the N-terminal K88,130R, C-terminal K614R or non-sumoylatable K88,130,614R GFP-FMRP mutants in cultured *Fmr1*^{-/-} neurons at 17 days in vitro (17 DIV). We then analyzed and compared the morphology of dendritic spines 24 h post transduction (Fig. 2a, b). In GFP-expressing *Fmr1*^{-/-} neurons, ~60% of protrusions showed an immature phenotype (see Methods for the spine characterization; Fig. 2a, b). Conversely, the expression of either FMRP WT or the K614R GFP-FMRP mutant, which behaves as the WT, promoted spine maturation (Fig. 2a, b). In stark contrast, expressing either the N-terminal K88,130R or the non-sumoylatable K88,130,614R GFP-FMRP mutant failed to promote spine maturation (Fig. 2a, b).

The excess of dendritic protrusions in neurons is a hallmark of FXS^{6,7}. Interestingly, the density of the protrusions was considerably decreased upon the expression of the WT or K614R mutant form of GFP-FMRP (Fig. 2c; GFP control, 7.22 ± 0.16 protrusions per 10 μm; GFP-FMRP WT, 5.34 ± 0.13 protrusions per 10 μm; GFP-FMRP-K614R, 5.39 ± 0.13 protrusions per 10 μm), whereas expressing either the N-terminal K130R, the K88,130R GFP-FMRP mutants, or the non-sumoylatable GFP-FMRP-K88,130,614R did not affect the spine density with measured values almost identical to control neurons expressing free GFP (Fig. 2c). Furthermore, re-expressing WT GFP-FMRP in *Fmr1*^{-/-} neurons not only affected the spine number but also drastically reduced the mean length of immature spines from ~3.7 μm to <2.6 μm (Fig. 2d).

To individually assess the role of the N-terminal lysine residue, we quantified the morphological changes occurring in *Fmr1*^{-/-} neurons expressing GFP-FMRP with a single mutated lysine residue (K88R or K130R; Supplementary Fig. 2). While the expression of both mutants promoted spine maturation similarly to GFP-FMRP WT (Supplementary Fig. 2b, d), the K130R mutant failed to reduce the density of the protrusions (Supplementary Fig. 2c; GFP control, 7.22 ± 0.16 protrusions per 10 μm; WT, 5.34 ± 0.13 protrusions per 10 μm; K130R, 6.48 ± 0.15 protrusions per 10 μm) indicating that the integrity of the K130 residue is essential to maintain spine density. Altogether, the data above

indicate that the integrity of both N-terminal lysine residues is critical for the regulation of spine density and maturation since the expression of the K-to-R mutant forms failed to restore the density and the maturity of dendritic spines in *Fmr1*^{-/-} neurons. Our initial findings therefore support the role of the N-terminal sumoylation of FMRP in the regulation of spine elimination and maturation events.

To start assessing the functional effect of FMRP sumoylation, we compared synaptic transmission by measuring spontaneous miniature excitatory post-synaptic currents (mEPSCs) in *Fmr1*^{-/-} neurons expressing either GFP-FMRP WT or its non-sumoylatable K88,130,614R mutant (Supplementary Fig. 3). The comparison of cumulative distributions indicated that the amplitude of mEPSCs (from 20 to 40 pA) was significantly increased in neurons expressing the mutant form of GFP-FMRP (Supplementary Fig. 3a, b). Moreover, intervals between mEPSC events (between 300 ms and 1 s) were slightly but significantly increased upon expression of GFP-FMRP-K88,130,614R when compared to GFP-FMRP WT indicating that the mEPSC frequency is decreased in mutant-expressing cells (Supplementary Fig. 3a, c). Data comparing mEPSC properties in WT and *Fmr1*^{-/-} brain slices have been described in the literature with either a decrease, an increase or no changes in their amplitudes or frequencies, depending on the brain area recorded, the age of the animals, and/or the associated genetic background^{41–43}. To our knowledge, there are no available data on mEPSCs recorded from FMRP WT-expressing *Fmr1*^{-/-} cultured hippocampal neurons and the results from Supplementary fig. 3 indicate that restoring the expression of FMRP in *Fmr1*^{-/-} neurons leads to changes in basal synaptic transmission, occurring most probably via both pre- and post-synaptic modifications. Additional experiments are now needed to precisely define the associated mechanisms and to address the electrophysiological consequences of FMRP sumoylation in synaptic plasticity in vivo.

Preventing FMRP sumoylation alters the size of mRNA granules.

Since FMRP is an RNA-binding protein, we also examined whether the mutation of the sumoylation sites interferes with the RNA-binding capacity of FMRP by performing cross-linking and immunoprecipitation (CLIP) assays (Fig. 2e, f). FMRP-CLIPed mRNAs from *Fmr1*^{-/-} neurons expressing either the WT or K88,130,614R forms of GFP-FMRP were analyzed by quantitative PCR to compare the abundance of some known FMRP target mRNAs (Fig. 2e). Our data showed that either forms of GFP-FMRP are able to bind target RNAs to similar extent (Fig. 2f).

Fig. 1 FMRP is sumoylated in vivo in the rat and mouse brain and the SUMO system targets the conserved residues K88, 130, and 614 of FMRP. **a** Representative immunoblot anti-FMRP (Ab#056) of P7 post-nuclear rat brain extracts prepared or not in the presence of the cysteine protease inhibitor NEM to prevent desumoylation. **b** Immunoblot anti-SUMO1 of NEM-treated P7 post-nuclear rat brain extracts subjected to immunoprecipitation with FMRP (Ab#056) antibody or control IgG. **c** Converse immunoblot with anti-FMRP (Ab#056) antibody of NEM-treated P7 post-nuclear rat brain extracts subjected to immunoprecipitation with SUMO1 antibody or control IgG. **d** Immunoblot anti-SUMO1 of NEM-treated P1 post-nuclear mouse brain extracts subjected to immunoprecipitation with FMRP (Ab#056) antibody or control IgG. *Non-specific band. **e** Immunoblot of post-nuclear mouse brain extracts (input) subjected to immunoprecipitation with FMRP antibody or control IgG and probed with anti-Ubc9 antibody. **f** Co-localization assays performed on cultured mouse neurons (20 DIV) with antibodies directed against Ubc9, FMRP (Ab#4317), SUMO1. Bar, 2 μm. Degree of co-localization (Manders' coefficient) between FMRP and Ubc9 or SUMO1. *N* = 3 independent primary cultures with 60 dendrites analyzed for each condition. **g** Sequence alignments showing the evolutionary conservation of the potential SUMO-targeted lysine residues (stars) within the consensus sumoylation sites of FMRP. **h, i** Bacterial sumoylation assay. Representative immunoblots of purified fractions of N- and C-terminal WT or mutated parts of His-FMRP in a recombinant bacterial system and probed with anti-FMRP (**h**, Ab#1C3) or (**i**, #17722) and anti-SUMO1 antibodies as indicated. **j** COS7 sumoylation assay. Immunoblots with anti-FMRP (Ab#056) antibody of full-length WT or lysine-mutated FMRP expressed in COS7 cells with mcherry-SUMO1 WT or mutated (ΔGG) to prevent its conjugation. **k** Original X-ray structures fitted of three human N-terminal FMRP (PDB: 4OVA in green, 4QVZ in light green, 4QW2 in dark green) shown in cartoon representation. K88 and K130 are shown in sphere representation in red and blue, respectively. **l** Original model of FMRP (PDB: 4OVA) and SUMO1 (PDB: 4WJQ) structural links in cartoon and surface representation (with transparency), respectively, in green and light blue. Lysine residues 88 and 130 of FMRP are shown in sphere representation in red and blue, respectively

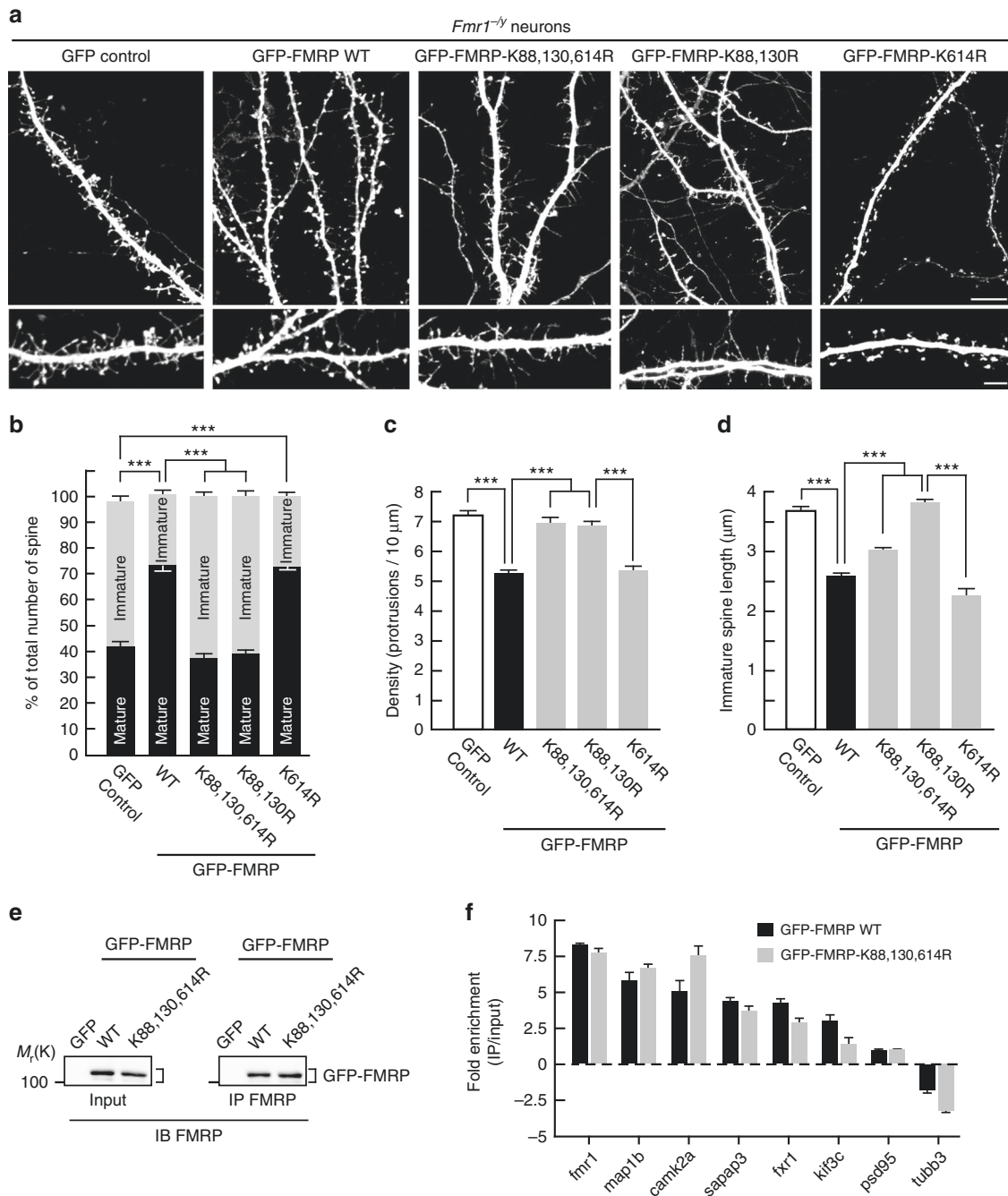


Fig. 2 The N-terminal sumoylation of FMRP is involved in the regulation of the spine density and maturation. **a** Representative confocal images of dendrites from transduced *Fmr1*^{-/-} neurons expressing free GFP, the WT or the non-sumoylatable K88,130,614R, K88,130R, or K614R forms of GFP-FMRP for 24 h. Bar, 10 μm. Enlargements of dendrites are also shown. Bar, 5 μm. Histograms show the relative proportion of mature and immature dendritic spines **b** and the density of the protrusions **c** in GFP, in WT, and mutated GFP-FMRP-expressing cells as shown in **a**. **d** Histograms of immature spine length measured from *Fmr1*^{-/-} neurons expressing the indicated constructs. Data shown in **b–d** are the mean ± s.e.m. and statistical significance determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) with a Bonferonni post-test. *N* = ~4500 protrusions per condition from four independent experiments. ****p* < 0.001. **e, f** CLIP analysis from transduced *Fmr1*^{-/-} cortical neurons expressing the WT or the K88,130,614R form of GFP-FMRP revealed that they bind the same RNA repertoire. **e** Representative immunoblots anti-FMRP of the indicated neuronal extracts subjected or not (Input) to immunoprecipitation (IP) with FMRP antibodies. GFP-expressing *Fmr1*^{-/-} neurons were used as a negative control. **f** Enrichment (CLIPed/Input) of a set of FMRP-target RNA fragments in the indicated conditions. Several known RNA targets of FMRP (*fmr1*, *map1b*, *camk2a*, *sapap3*, *fxr1*, *kif3c*, and *psd95*) as well as a non-targeted RNA (*tubb3*) were detected by quantitative PCR. Fold enrichment were calculated as described in the Methods section and did not show any statistical differences

Since preventing FMRP sumoylation with the K-to-R mutations does not affect the ability of FMRP to interact with its target RNAs, we hypothesized that FMRP sumoylation is involved in the transport of mRNAs along dendrites. To this purpose, we first examined the FMRP-containing granules along dendrites. We

transfected *Fmr1*^{-/-} neurons to express either the WT or K88,130R form of GFP-FMRP and performed smFISH experiments using Stellaris probes complementary to three known FMRP mRNA targets: GFP (for GFP-FMRP), PSD-95⁴⁴, and CaMKII mRNAs (Fig. 3a–c). Interestingly, the fluorescence of all

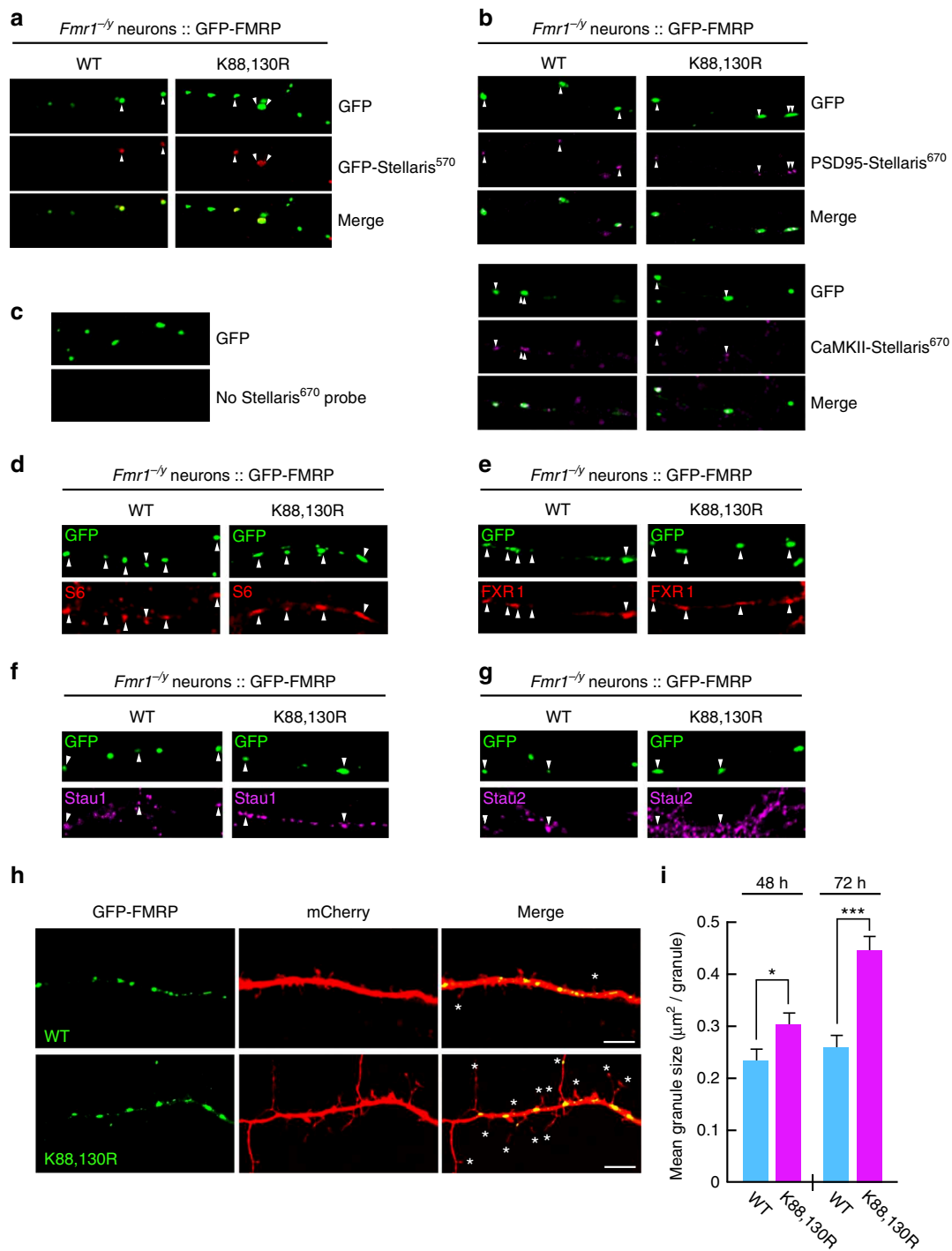


Fig. 3 Preventing FMRP sumoylation drastically impacts on the size of dendritic FMRP-containing mRNA granules. **a–c** Representative images of WT and K88,130R GFP-FMRP-expressing *Fmr1*^{-/-} dendrites were hybridized with GFP **a**, PSD-95 **b**, or CaMKII mRNA **b**, using Stellaris probes. Arrowheads show the co-localization between the indicated Stellaris signals and the GFP-FMRP granules. **c** GFP-FMRP-transfected neurons with no Stellaris probes were used as FISH controls. **d–g** Co-localization assays performed on WT and K88,130R GFP-FMRP-expressing *Fmr1*^{-/-} neurons with antibodies directed against the S6 ribosomal protein **d**, FXR1 **e**, and the RNA-binding proteins Stau1 **f** and Stau2 **g**. Arrowheads indicate the co-localization with the GFP-FMRP positive mRNA granules. **h** Representative confocal images of dendrites from co-transfected *Fmr1*^{-/-} neurons co-expressing free mCherry with either the WT or the K88,130R form of GFP-FMRP for 72 h. Bar, 5 μm . **i** Histograms show the mean size of dendritic GFP-FMRP granules after 48 and 72 h of expression. $N = 190$ –460 granules per condition from three to four separate experiments. Data shown in **i** are the mean \pm s.e.m. and statistical significance was determined using unpaired *t* test. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$

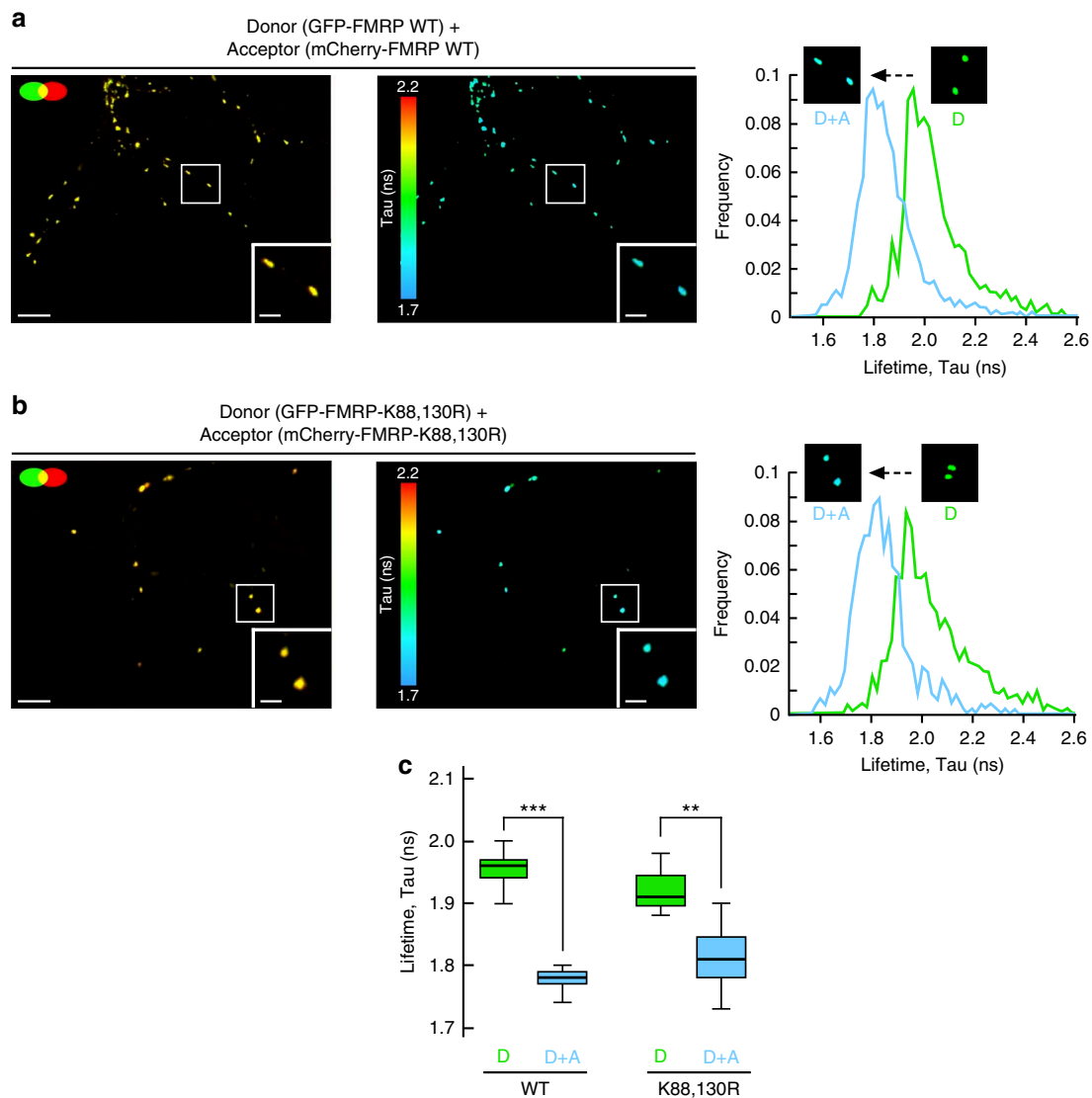


Fig. 4 Preventing the N-terminal sumoylation of FMRP by the K88,130R mutation does not alter the homomeric FMRP-FMRP interaction within dendritic mRNA granules. **a, b** Analysis of GFP-FMRP/mCherry-FMRP interaction within dendritic mRNA granules by fluorescence lifetime imaging (FLIM). Representative confocal images showing the co-localization of the WT **a** or the K88,130R **b** forms of GFP-FMRP and mCherry-FMRP (left images) in dendritic granules; bar, 4 μm . FLIM images of the same field are shown on the right images **a, b** where fluorescence lifetime is represented using a pseudo-color scale ranging from 1.7 to 2.2 ns. Insets show representative clusters for each condition; bar, 1 μm . The third row represents the distribution histograms of GFP-FMRP fluorescence lifetime of the donor (D) alone in green and the donor + acceptor (D + A) in blue. FLIM images corresponding to the donor alone condition are displayed in Supplementary Fig. 3b. **c** Box and whiskers plots show the variation of the lifetime determined from FLIM curves. This representation displays upper and lower quartiles, maximum and minimum values in addition to median. $N = 114\text{--}189$ granules per condition from three separate experiments. Statistical significance in **c** was determined by a non-parametric Mann-Whitney test. $**p < 0.01$; $***p < 0.0001$

three probe sets was detectable in GFP-positive granules from secondary dendrites containing either the WT or mutant K88,130R form of GFP-FMRP (Fig. 3a–c). Together with the CLIP experiments (Fig. 2e, f), this reveals that both WT and K88,130R GFP-FMRP-containing granules can travel along dendrites, carrying their mRNA cargoes.

We further characterized these mRNA granules using co-localization assays to investigate whether known components of such granules^{45,46} are also present in WT and K88,130R-GFP-FMRP positive granules. As clearly depicted in Fig. 3d–g, both the WT and K88,130R GFP-FMRP granules co-localize with the ribosomal protein S6 (Fig. 3d) and the RNA-binding proteins FXR1 (Fig. 3e), Staufen 1 (Fig. 3f), and Staufen 2 (Fig. 3g), indicating that these granules contain not only some of the target

mRNAs of FMRP (Fig. 3a–c) but also several described components of such dendritic mRNA granules^{45,46}.

We then measured the surface of dendritic GFP-FMRP-positive mRNA granules at different time points post transfection (Fig. 3h, i). Interestingly, the expression of the K88,130R GFP-FMRP for 48 h significantly increased the size of FMRP-containing granules compared to the WT GFP-FMRP-positive granules (Fig. 3i; WT 48 h, $0.236 \pm 0.017 \mu\text{m}^2$; K88,130R 48 h, $0.305 \pm 0.020 \mu\text{m}^2$). The difference in granule size between the WT and the K88,130R form of GFP-FMRP was further enhanced after 72 h of transfection (Fig. 3i; WT 72 h, $0.265 \pm 0.020 \mu\text{m}^2$; K88,130R 72 h, $0.440 \pm 0.030 \mu\text{m}^2$). All these data reveal that the expression of GFP-FMRP K88,130R results in larger FMRP-containing dendritic mRNA granules suggesting that FMRP

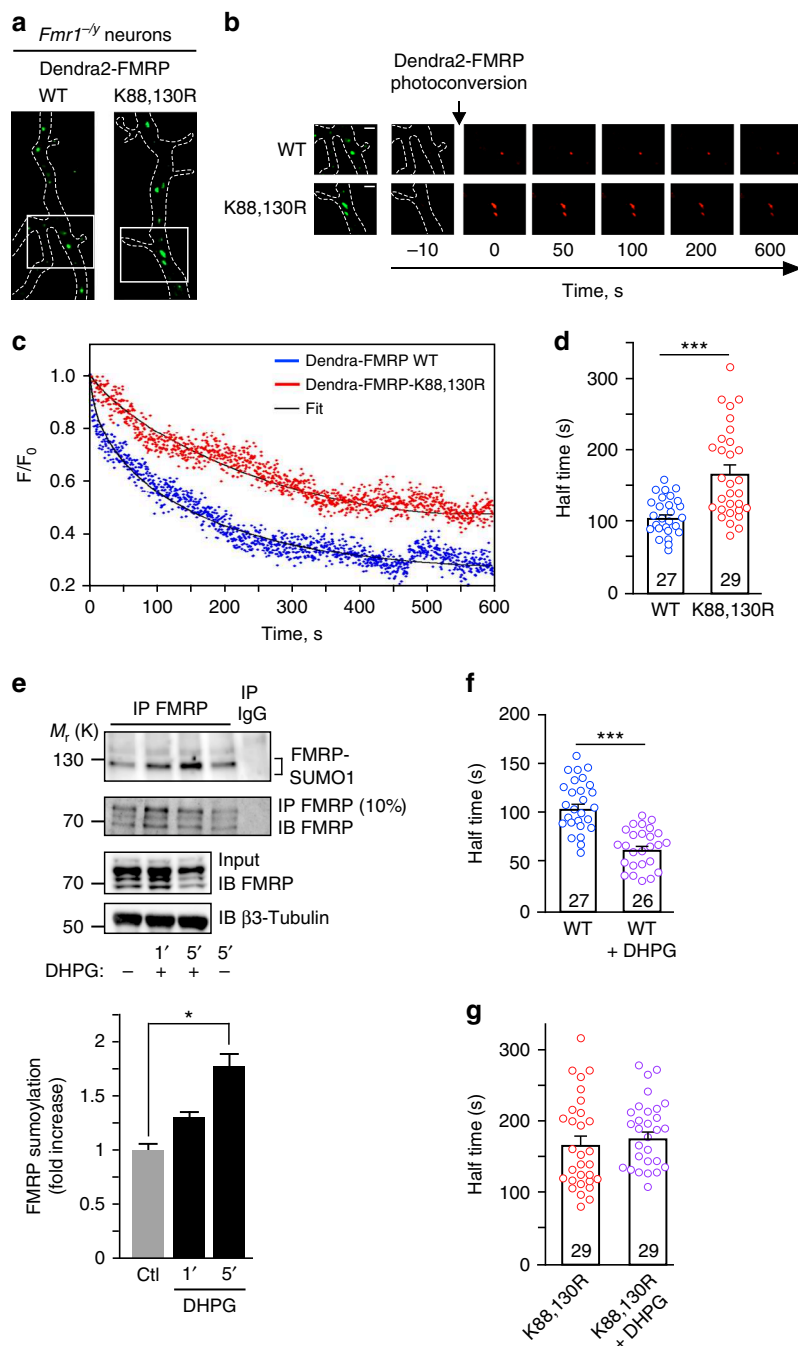


Fig. 5 Activation of mGlu5 receptors promotes FMRP sumoylation and leads to the release of FMRP from dendritic mRNA granules. **a** Images of transfected *Fmr1*^{-/-} dendrites expressing the WT or the non-sumoylatable K88,130R forms of GFP-FMRP before Dendra2-FMRP photoconversion are shown. **b** Time lapse series of confocal images of photoconverted Dendra2-FMRP red fluorescence in dendritic granules in basal unstimulated conditions. Enlargement of dendritic granules from the boxed area in **a** is also shown on the left. The decrease in red photoconverted Dendra2-FMRP fluorescence was then monitored over time. Scale bar, 1 μ m. **c** Representative sample recording traces of normalized fluorescence from photoconverted WT or mutated Dendra2-FMRP in individual granules in basal unstimulated conditions. The thin traces (black) represent the corresponding fits. **d** Histograms with scatter plots of computed half-time of photoconverted WT and K88,130R Dendra2-FMRP fluorescence diffusion in granules in basal conditions. The number of photoconverted granules is indicated on the bars. **e** Immunoprecipitation of FMRP (Ab#046) and immunoblotting for SUMO1. Control for the immunoprecipitated FMRP fractions is also depicted. Input lanes for FMRP and β -tubulin are also shown. Quantification for DHPG-induced endogenous FMRP sumoylation in neurons over time is also indicated. The data are from three separate experiments and show the mean \pm s.e.m. * p = 0.0213. **f** Histograms with scatter plots of half-time of photoconverted Dendra2-FMRP WT fluorescence diffusion in granules from *Fmr1*^{-/-} neurons stimulated with DHPG. The number of photoconverted granules is indicated on the bars and the histogram/scatter plot in absence of stimulation is taken from **d**. **g** Histograms with scatter plots of half-time of photoconverted Dendra2-FMRP-K88,130R fluorescence diffusion in granules in basal and DHPG-stimulated conditions. The histogram/scatter plot in absence of stimulation is taken from **d**. The number of photoconverted granules is indicated on the bars. Data shown in **d-f** and **g** are the mean \pm s.e.m. Statistical significance in **d**, **f**, and **g** was determined using a non-parametric Mann-Whitney test. Statistical significance in **e** was determined by an ANOVA with a Bonferroni post-test. * p < 0.05; *** p < 0.0001

sumoylation could participate in the regulation of FMRP interactions within these granules.

FMRP has been reported to form homodimers via its N-terminal 1–134 domain⁴⁷, where the sumoylatable K88 and K130 residues are localized. Thus, to assess whether the difference in granule size measured in Fig. 3i results from abnormal interaction properties of FMRP homodimers directly inside dendritic granules, we performed fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) experiments on neurons co-expressing WT or K88,130R GFP-FMRP with their respective WT or K88,130R mCherry-tagged constructs (Fig. 4; Supplementary Fig. 4). We observed a clear co-localization of the mCherry/GFP-FMRP constructs in dendritic granules confirming the incorporation of the proteins into granules (Fig. 4a, b). The energy transfer known as fluorescence resonance energy transfer from donor green fluorescent protein (GFP) toward the acceptor mCherry is

quantified by the reduction of the donor fluorescence lifetime (Fig. 4c). We measured a significant reduction of the donor GFP-FMRP fluorescence lifetime in presence of mCherry-FMRP indicating that FMRP/FMRP interaction occurs in dendritic granules. Interestingly, we also found that this homomeric interaction is not affected by the K88,130R mutations (Fig. 4c).

Sumoylation triggers FMRP dissociation from mRNA granules. Our results so far indicate that preventing FMRP sumoylation directly impacts on the morphology of mRNA granules in dendrites (Fig. 3h, i) without altering the intrinsic FMRP/FMRP interacting properties within the granules (Fig. 4). Therefore, we investigated whether the absence of FMRP sumoylation affects the dissociation of FMRP from dendritic granules. To assess the diffusion properties of FMRP in dendritic granules, we performed

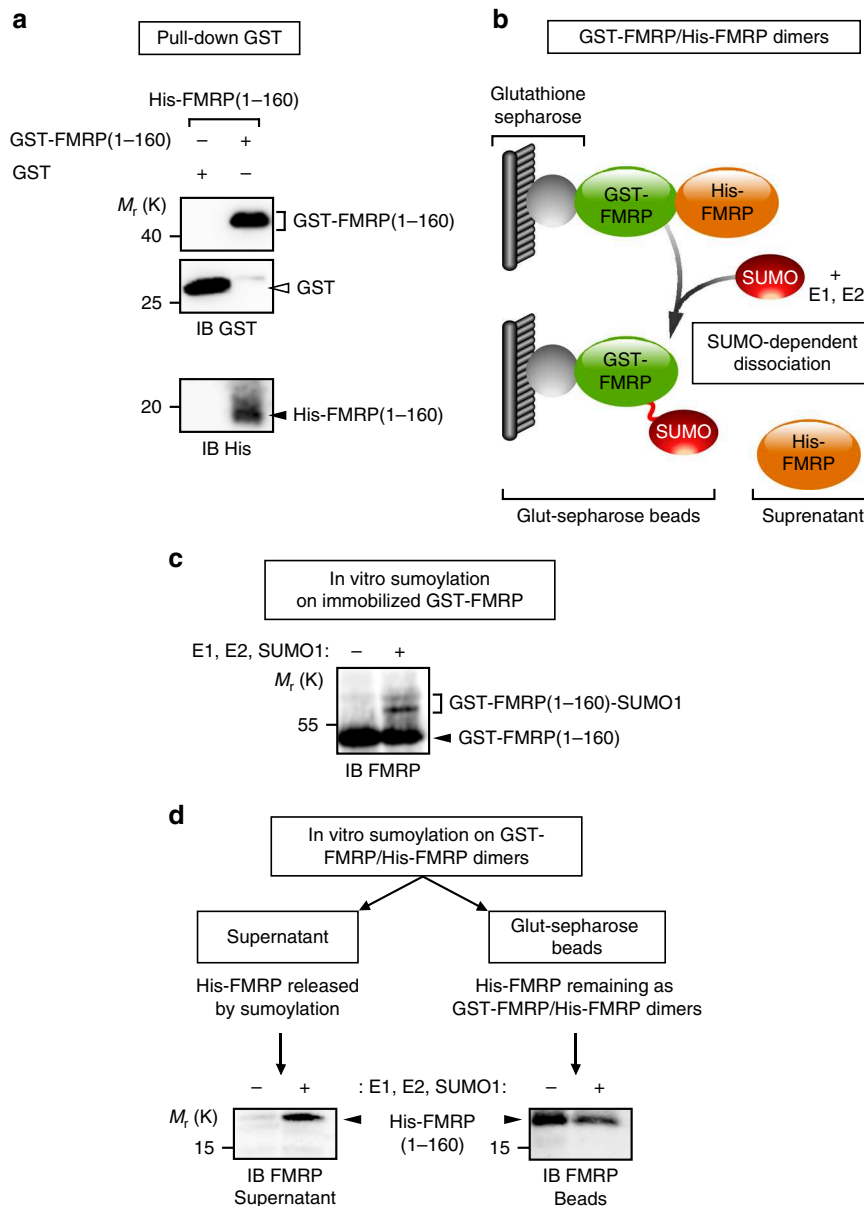


Fig. 6 The N-terminal sumoylation of FMRP dissociates FMRP homomers. **a** GST pull-down of purified His-FMRP (1–160 aa) with the N-terminal (1–160 amino acids) domain of FMRP fused to the GST protein. Free GST is used as a negative control. **b** Schematic diagram of the SUMO-dependent dissociation assay showing the release into the supernatant of His-FMRP from the immobilized sumoylated GST-FMRP fraction. **c** In vitro sumoylation assay on immobilized GST-FMRP (1–160 aa). **d** In vitro sumoylation assay on GST-FMRP/His-FMRP dimers. Representative immunoblots anti-FMRP (Ab#2F5-1) following the SUMO-dependent dissociation of His-FMRP

live-time restricted photoconversion experiments⁴⁸ in *Fmr1*^{-/-} neurons expressing the photoswitchable WT or K88,130R Dendra2-FMRP constructs (Fig. 5a, b). Dendra2 is a green-to-red photoactivatable fluorescent protein that allows the real-time tracking of a photoconverted protein^{49,50}. We measured and compared the half-times of the decrease in red photoconverted fluorescence, which corresponds to the real-time diffusion of WT and K88,130R Dendra2-FMRP out of dendritic granules (Fig. 5b–d). In basal conditions, the mean half-time of Dendra2-FMRP WT fluorescence dissociation from dendritic granules was significantly shorter than the value measured for the Dendra2-FMRP K88,130R mutant (Fig. 5d; half-time WT = 101.8 ± 4.5 s vs half-time K88,130R = 165.3 ± 12.1 s) indicating that the dissociation of WT FMRP from the granules is much faster than for

the K88,130R mutant. These data strongly support the involvement of FMRP sumoylation in controlling the dissociation of the protein from dendritic mRNA granules.

Activation of mGlu5R regulates FMRP-mediated mRNA transport^{51,52} and also modulates its phosphorylation and ubiquitination^{13,14}. Interestingly, we previously showed that activation of these receptors also evokes sumoylation in cultured neurons²⁶. This prompted us to assess whether the application of the mGluR agonist DHPG triggers FMRP sumoylation in neurons (Fig. 5e). We first confirmed that the activation of mGlu5R with DHPG is effective in our neuronal cultures and evokes an intracellular calcium increase (Supplementary Fig. 5). Then, FMRP-immunoprecipitates were probed with specific anti-SUMO1 antibodies and revealed that the sumoylation of FMRP

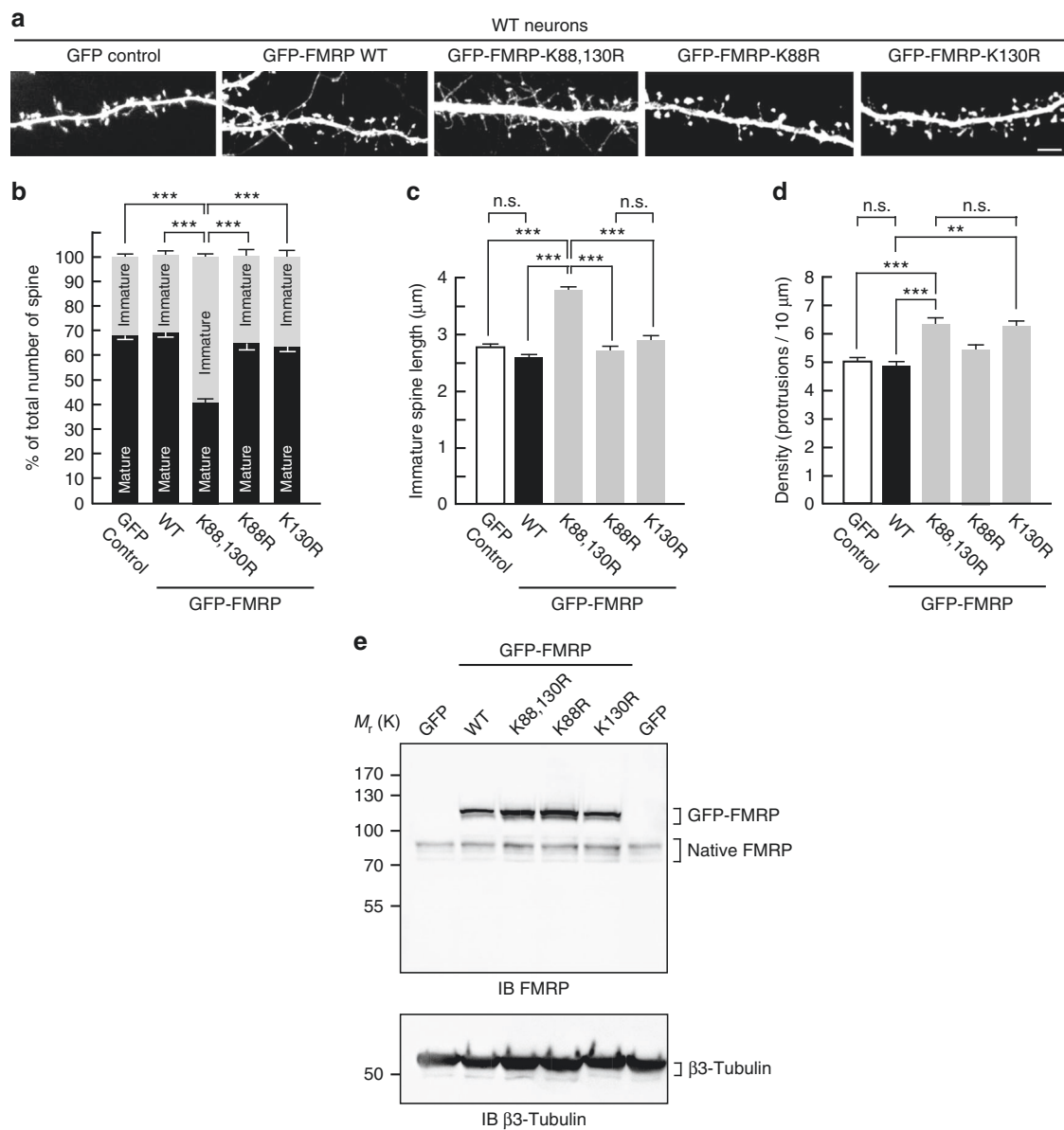


Fig. 7 Spine density and maturation processes are intrinsically linked to the ability of FMRP to be sumoylated. **a** Representative confocal images of dendrites from transduced WT neurons expressing free GFP, the WT, K88R, K130R, or K88,130R mutant forms of GFP-FMRP for 30 h. Bar, 5 μm. Histograms show the relative proportion of mature and immature spines **b** and the density of the protrusions **d** in the indicated conditions shown in **a**. **c** Histograms of immature spine length measured from WT neurons expressing the indicated constructs. **e** Relative protein expression levels of the WT and mutant forms of GFP-FMRP in WT transduced neurons as in **a** showing an approximate threefold increase in the levels of exogenous GFP-FMRP expression. Data shown in **b–d** are the mean ± s.e.m. Statistical significance in **b–d** was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) with a Bonferroni post-test. *N* = ~3000 spines per condition from four independent experiments. ****p* < 0.001; n.s. not significant

is low in basal unstimulated conditions but rapidly increases after 1 and 5 min of DHPG treatment (DHPG 1 min, 1.28 ± 0.12 fold/control; DHPG 5 min, 1.73 ± 0.2 fold/control; Fig. 5e) indicating that FMRP sumoylation is rapidly triggered by the mGlu5R activation.

These results led us to hypothesize that the activity-dependent sumoylation of FMRP controls FMRP dissociation from dendritic mRNA granules. To address this point, we pharmacologically stimulated mGlu5R in *Fmr1*^{-/-} neurons expressing either Dendra2-FMRP WT or K88,130R and measured the dissociation properties of FMRP from dendritic granules using the photo-conversion assay (Fig. 5f, g). Interestingly, mGlu5R stimulation enhanced the exit rate of the red photoconverted Dendra2-FMRP WT fluorescence from granules by ~40% (Fig. 5f). By contrast, mGlu5R activation had no effect on the dissociation of Dendra2-FMRP-K88,130R positive granules (Fig. 5g). These findings strongly support that the mGlu5R-dependent sumoylation of FMRP regulates the dissociation of FMRP from dendritic mRNA granules.

Sumoylation regulates homomeric FMRP–FMRP interaction.

Our data demonstrate that FMRP sumoylation controls FMRP release from dendritic granules. To further assess the role of sumoylation in the regulation of FMRP–FMRP interaction, we combined pull-down assays with in vitro SUMO reactions and analyzed the impact of sumoylation on the dissociation of FMRP homomers (Fig. 6).

We purified GST- and His-tagged FMRP (1–160 aa) fusion proteins and found that GST-FMRP (1–160) specifically interacts with His-FMRP (1–160 aa) and forms N-terminal FMRP homodimers in vitro (Fig. 6a). We then performed an in vitro sumoylation assay³¹ on purified FMRP (1–160 aa) dimers to assess whether sumoylation promotes their dissociation (Fig. 6b–d). First, we verified that the immobilization of GST-FMRP (1–160 aa) on the glutathione matrix did not prevent the in vitro sumoylation of the protein (Fig. 6c). Incubation of immobilized GST-FMRP (1–160 aa) with the sumoylation reaction mix gave rise to higher molecular weight bands corresponding to the sumoylated forms of GST-FMRP (1–160 aa). These bands were absent in control conditions (Fig. 6c).

Next, we performed in vitro sumoylation assays on immobilized GST-FMRP–His-FMRP dimers (Fig. 6d). The pool of His-FMRP (1–160 aa) released by sumoylation was separated from the remaining immobilized dimers by centrifugation of the glutathione beads. Proteins either in the supernatant or bound to the beads were both analyzed by immunoblotting with anti-FMRP antibodies. As seen in Fig. 6d, the release of His-FMRP

(1–160 aa) from the immobilized dimers was only promoted upon sumoylation with the concurrent decrease of the remaining His-FMRP (1–160 aa) in the pelleted FMRP fraction. This particular set of data demonstrates that sumoylation promotes the dissociation of FMRP–FMRP dimers.

SUMO-deficient FMRP-expressing WT neurons show FXS phenotype.

Collectively, our data clearly demonstrate that sumoylation of the N-terminal part of FMRP is essential to allow for the dissociation of the protein from dendritic mRNA granules and to promote spine elimination and maturation. To confirm the key involvement of FMRP sumoylation in neuronal maturation events, we hypothesized that the expression of the non-sumoylatable FMRP mutant could reverse the spine density and maturation of WT neurons. Thus, we expressed either the WT or the K88,130R mutant form of GFP-FMRP into WT mouse neurons (Fig. 7). WT neurons expressing GFP-FMRP-K88,130R resembled the GFP-expressing *Fmr1*^{-/-} neurons (Fig. 2) with >67% of protrusions characterized by an immature phenotype (Fig. 7a, b). Similarly, the length of dendritic spines in WT neurons expressing GFP-FMRP-K88,130R was also significantly increased (Fig. 7c; K88,130R, 3.77 ± 0.08 μm) comparable to the values measured in *Fmr1*^{-/-} neurons (Fig. 2d).

Importantly, the density of dendritic spines was dramatically increased upon the expression of the K88,130R mutant (Fig. 7a, d; GFP control, 5.03 ± 0.17 protrusions per 10 μm; K88,130R, 6.33 ± 0.24 protrusions per 10 μm), comparable to the values obtained in *Fmr1*^{-/-} neurons (Fig. 2c). Interestingly, the expression of the single K130R mutant in WT mouse neurons also leads to a significant increase in the density of the protrusions (Fig. 7a, d; GFP control, 5.03 ± 0.17 protrusions per 10 μm; K130R, 6.29 ± 0.41 protrusions per 10 μm) without altering the maturity of dendritic spines (Fig. 7b, c). As expected, expressing the WT form of GFP-FMRP in WT neurons did not affect any of the spine characteristics confirming the essential role of FMRP sumoylation in spine elimination and maturation processes.

Discussion

Here, we report for the first time that FMRP is a sumoylation target in vivo. We identify three sumoylatable residues, two of which lay within the N-terminal domain of FMRP and are the active SUMO sites. We further find that the activation of metabotropic mGlu5R promotes the sumoylation of FMRP and rapidly leads to the dissociation of FMRP from dendritic mRNA granules allowing for the regulation of spine elimination and maturation (Fig. 8). Thus, our work uncovers a novel activity-

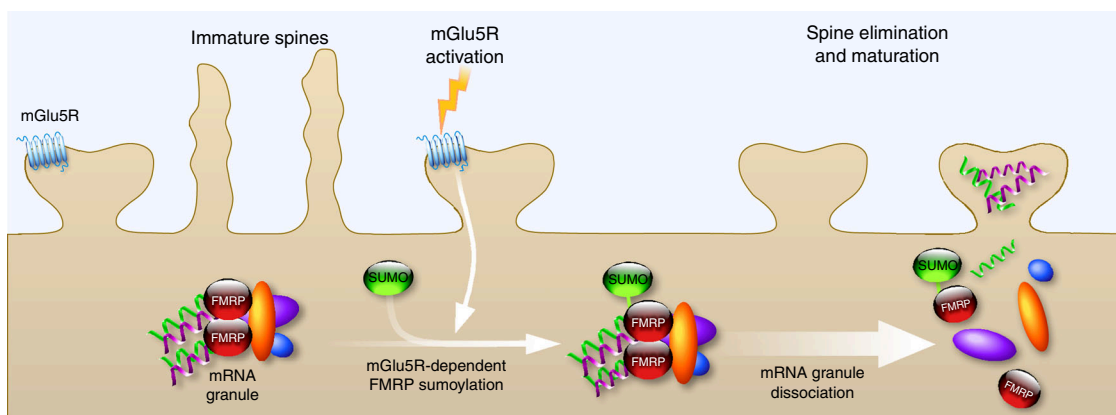


Fig. 8 Schematic model for the mGlu5R-dependent regulation of FMRP function via the sumoylation process. The activity-dependent sumoylation of FMRP is a key step to dissociate FMRP from dendritic mRNA granules and consequently to regulate spine elimination and maturation

dependent role of sumoylation in the regulation of FMRP neuronal function.

We provide the first evidence that FMRP sumoylation is required for spine elimination and proper maturation. The initial step of spine formation is the emergence of immature long thin protrusions, which are later on eliminated or matured with enlargement of spine head⁸. A tight balance between these processes is thus required for the development of a functional neuronal network. This is in line with our data showing a decrease in the density of protrusions when expressing FMRP in *Fmr1*^{-/-} neurons, and an increased density in WT neurons expressing the SUMO-deficient form of FMRP. Such compensatory and deleterious effects support the idea that immature spines are over-produced and/or less efficiently eliminated when FMRP sumoylation is perturbed.

In correlation with our findings, the role of sumoylation at the post-synaptic compartment has already been described for several proteins¹⁹. For instance, sumoylation of the scaffolding calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) reduces CASK interaction with protein 4.1, a protein that connects spectrin to the actin cytoskeleton in dendritic spines. Mimicking CASK sumoylation dramatically impairs spine formation⁵³. According to the importance of sumoylation in the post-synaptic formation and maturation, our findings demonstrate a role of sumoylation in spine elimination and maturation by tuning FMRP dimerization within dendritic mRNA granules. Altogether, these data shed light on the role of sumoylation as a critical molecular regulator in neuronal development and maturation.

Interestingly, we demonstrate that the sumoylation of FMRP is triggered upon mGlu5R activation. mGlu5R has been previously reported to differentially regulate FMRP function depending on its subcellular localization. For instance, a direct involvement of FMRP was shown in targeting and transport of several mRNAs from the soma along dendrites upon mGlu5R activation⁵². Furthermore, the repression of mRNA translation exerted by FMRP in dendrites is counteracted by the activation of mGlu5R⁵¹. Here, we unravel a novel activity-dependent regulation of the FMRP function. We show that mGlu5R-induced sumoylation of FMRP drives its own dissociation from dendritic mRNA granules to regulate both spine elimination and maturation.

It has been previously described that FMRP is a target of mGluR-dependent PTMs^{11,13,14,54,55}. Activation of mGluRs in neurons induces a rapid dephosphorylation of FMRP C-terminal region as a result of an enhanced protein phosphatase 2A (PP2A) activity¹¹. Conversely, mGluR activation that lasts longer than 5 min results in an mTOR-mediated PP2A suppression followed by rapid rephosphorylation of FMRP C-terminus by the ribosomal protein S6 kinase (S6K1)^{11,55}. Accordingly to the role of phosphorylation in controlling FMRP function, the lack of S6K1-dependent FMRP phosphorylation mimics FMRP loss of function and leads to an increased expression of the FMRP target mRNA SAPAP3⁵⁵. In addition, Nalavadi et al.¹⁴ described a rapid ubiquitination of the C-terminal part of FMRP upon stimulation with the mGlu5R agonist DHPG in rat cultured neurons. FMRP ubiquitination promotes a proteasome-mediated FMRP degradation, which in turn controls FMRP levels at the synapse. Interestingly, these authors showed that FMRP ubiquitination requires a prior FMRP-dephosphorylation carried by PP2A. Taken together, these pieces of evidence suggest a crosstalk between various PTMs in the regulation of FMRP function. Here, we demonstrate that mGlu5R activation triggers a rapid sumoylation of FMRP. This event promotes the release of FMRP from transport mRNA granules. Thus, the present study adds another level of complexity to the post-translational regulation of FMRP and advances our understanding of the activity-dependent control of FMRP function in neurons. It will therefore be of future

interest to examine whether the interplay between these PTMs could take place to orchestrate the mGlu5R-dependent regulation of FMRP.

The present study shows that the activation of mGlu5R directly promotes FMRP sumoylation, regulating its neuronal function in spine elimination and maturation. Our work therefore raises the intriguing possibility that the impairment of FMRP sumoylation could contribute to FXS pathophysiology. Recent publications have reported missense point mutations within the *FMR1* gene in patients affected by FXS. Importantly, these mutations lead to amino-acid changes close to the SUMO active sites of FMRP (F126S⁵⁶ and R138Q⁵⁷). Similarly to our data on the K88,130R FMRP mutant, the FXS R138Q mutation does not modify the expression of FMRP nor its RNA-binding properties, indicating that the pathogenicity is caused independently of the FMRP expression level and the ability of FMRP to bind mRNAs⁵⁸. To date, no data have been reported regarding the functional impairment due to the F126S mutation. Our data report that the reintroduction of the FMRP WT but not the K88,130R mutant in *Fmr1*^{-/-} neurons promotes spine maturation and elimination demonstrating that FMRP sumoylation is critical for these processes. Therefore, an interesting possible explanation could be that the F126S and R138Q FXS mutations, which are very close to the active K130-SUMO site, would directly impact on the mGlu5R-dependent regulation of FMRP sumoylation and consequently, on post-synaptic FMRP-driven regulatory events. Future work will have to be performed aiming at understanding the effect of these FXS mutations on FMRP sumoylation. These next exciting steps will allow assessing whether FMRP sumoylation defects participate in the pathophysiology of FXS patients, raising the possibility to identify new targets and potentially develop novel therapeutic approaches.

Methods

Constructs. GFP-FMRP was obtained by subcloning the isoform 1 of the human *FMR1* sequence into the EcoRI/PstI site of the mammalian expression vector pEGFP-C2 (Clontech). GFP-Dendra2-/GST-/His-FMRP mutant constructs were all made by site-directed mutagenesis using the Quick-change mutagenesis solution (Agilent). pSinRep5 constructs used to produce Sindbis particles were generated using the Gateway recombination technology (Invitrogen). All constructs were then entirely sequenced.

Building model for FMRP-SUMO1. Three X-ray structures of human FMRP are available in Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>; PDB ID: 4OVA residues 1–209 at 3.0 Å resolution⁵⁹, 4QVZ residues 1–213 at 3.2 Å resolution, and 4QW2 residues 1–213 with the mutation R138Q at 3.0 Å resolution⁶⁰). The solvent ASA values for each residue have been calculated using Naccess tool⁶¹ on all monomers of each PDB files (4 for 4OVA, 2 for 4QVZ, and 2 for 4QW2). We calculated the average values for K88 and K130 for each structure. The classical parameters used are 1.4 for the radius of the “solvent” sphere and 25% for the threshold that determines if a residue is considered as buried or exposed. We utilized the X-ray structures of human FMRP PDB ID: 4OVA residues 1–209 at 3.0 Å resolution⁵⁹ and of human SUMO1 PDB ID: 4WJQ at 1.35 Å resolution⁶². To build models of FMRP modified with the SUMO1 protein, we first verified the shape compatibility and then used the Pymol software to manipulate the structures, make and visualize the FMRP-SUMO1 models.

Mouse lines and rat strain. All animals (3–10-month-old pregnant female Wistar rats from Janvier, St Berthevin, France; 3–10 month-old female C57BL/6 WT and *Fmr1* knockout (*Fmr1*^{-/-}) mice¹⁰) were handled in our facility in accordance with the European Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory animals and approved by the Animal Care and Ethics Committee (Comité Institutionnel d’Éthique Pour l’Animal de Laboratoire N°28, Nice, France; project reference NCE/2012-63). All animals had free access to water and food. The light cycle was controlled as 12 h light and dark cycle and the temperature was maintained at 23 ± 1 °C. Protocols to prepare primary neuronal cultures from mouse embryos at E15.5 or at E18 for rats were also approved by the Animal Care and Ethics Committee (Comité Institutionnel d’Éthique Pour l’Animal de Laboratoire N°28, Nice, France; project reference NCE/2012-63). All mice were maintained on a C57BL/6 genetic background, whereas Wistar rats were exclusively from a commercial source (Janvier). The *Fmr1* knockout (*Fmr1*^{-/-}) mouse line¹⁰ was maintained on a C57BL/6 background.

Mouse and rat brain lysate preparation. Brain lysates were prepared as previously described²⁶ from post-natal P1–3 mouse or P5–7 rat brains. Briefly, freshly dissected brains were transferred in 5 volumes (w/v) of ice-cold sucrose buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.32 M sucrose) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma, 1/100), Pefabloc 0.5 mM (Roche), MG132 100 μ M (Enzo), ALLN 100 μ M (Sigma), and 20 mM freshly prepared NEM (Sigma), and homogenized at 4 °C using a Teflon-glass potter and a motor-driven pestle at 500 rpm. Nuclear fraction and cell debris were pelleted by centrifugation at 1000 \times g for 10 min. The post-nuclear S1 fraction (supernatant) was collected and protein concentration measured using the BCA protein assay (Bio-Rad).

Primary neuronal cultures. Hippocampal and cortical neurons were prepared from embryonic (E18) pregnant Wistar rats as previously described²⁶ or from WT or *Fmr1*^{-/-} E15.5 pregnant C57BL/6 mice. Briefly, neurons were plated in Neurobasal medium (Invitrogen, France) supplemented with 2% B27 (Invitrogen), 0.5 mM glutamine and penicillin/streptomycin (Ozyme) on 60-mm dishes or 24-mm glass coverslips (VWR) pre-coated with poly-L-lysine (0.5 mg mL⁻¹; Sigma). Neurons (800,000 cells per 60-mm dish or 110,000 cells per coverslip) were then fed once a week with neurobasal medium supplemented with 2% B27 and penicillin/streptomycin for a maximum of 3 weeks.

Cell transfection. COS7 cells and primary neurons (14–16 DIV) were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and used 48–72 h post transfection.

Sindbis virus production and neuronal transduction. Attenuated Sindbis viral particles (SINrep(nsP2S726)) were prepared and used as previously described^{38–40}. Briefly, cRNAs were generated from the pSINRep5 plasmid containing the sequence coding for WT or mutated GFP-FMRP constructs and from the defective helper (pDH-BB) plasmid using the Mmessage Mmachine SP6 solution (Ambion). cRNAs were then mixed and electroporated into BHK21 cells. Pseudovirions present in the culture medium were collected 48 h after electroporation and concentrated using ultracentrifugation on SW41Ti. Aliquots of resuspended Sindbis particles were then stored at -80 °C until use. Neurons were transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1–2 and returned to the incubator at 37 °C under 5% CO₂ for 24–30 h depending on their subsequent utilization.

Bacterial sumoylation assay in *Escherichia coli*. Bacterial sumoylation assays were performed as previously described^{31,35}. Briefly, competent *E. coli* BL21(DE3) cells (Invitrogen, France) expressing pE1-E2SUMO1 were transformed with 1 μ g of pET-expression plasmid (Novagen) to express the WT or non-sumoylatable forms of His-tagged FMRP were selected on LB-Agar plates containing chloramphenicol (50 μ g mL⁻¹) and ampicillin (50 μ g mL⁻¹). A 10 mL preculture was then used to inoculate 50 mL of LB containing chloramphenicol and ampicillin. After incubation under shaking at 37 °C until OD₆₀₀ reaches 0.7, cells were cooled down to 20 °C and isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added at a concentration of 1 mM. After 4 h at 20 °C, bacteria were pelleted by centrifugation at 4 °C at 7000 \times g and kept at -80 °C until use. Pellets were resuspended in 1 mL lysis buffer (25 mM Tris pH 8, 300 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 5% ethanol, 0.5% NP40, 0.5 M urea, 1 mM DTT) supplemented with proteases inhibitors (leupeptine 1 μ g mL⁻¹, Pepstatine 1 μ g mL⁻¹, Aprotinin 1 μ g mL⁻¹, Pefabloc 0.5 mM, and freshly prepared NEM 20 mM), and incubated under rotation for 30 min at 4 °C in the presence of 5 mg mL⁻¹ lysozyme. Bacterial cytoplasmic membranes were then solubilised by addition of 1 mg mL⁻¹ sodium deoxycholate and released DNA digested by incubation with 50 μ g mL⁻¹ of DNase I and 10 mM MgCl₂ for 30 min at 4 °C. Cellular debris were pelleted by centrifugation at 20,000 \times g for 15 min at 4 °C and supernatants were incubated with 40 μ L of nickel agarose beads (Qiagen) for 2 h at 4 °C under gentle rotation. After three washes (25 mM Tris pH 8, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 0.1% Triton X-100, 0.5 M urea, 1 mM DTT), purified proteins were eluted in 200 μ L of β ME-reducing sample buffer for 5 min at 95 °C.

COS7 sumoylation assay. Mycoplasma-free COS7 cells (ATCC reference CRL-1651, Molsheim, France) at 60% of confluence in six-well plates were co-transfected using 1 μ g of the eukaryotic expression vector pTL1-FMRP plasmid⁶³ or its derived non-sumoylatable mutants with 0.5 μ g of mCherry or mCherry-SUMO1 plasmids²⁶ and 0.5 μ g of plasmid coding for Flag-Ubc9 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 48 h of expression, cells were washed once in PBS containing 20 mM NEM and reduced for 5 min at 95 °C in β ME-containing sample buffer.

CLIP analysis. To isolate neuronal mRNAs associated with WT and SUMO-deficient GFP-FMRP mutant, UV cross-linking, and FMRP immunoprecipitations were performed on 20 DIV *Fmr1*^{-/-} neurons transduced (MOI of 3) at day 19 to express free GFP, the WT, or the non-sumoylatable K88,130,614R form of GFP-FMRP. RNAs and proteins were cross-linked through three rounds of UV irradiation (400 mJ each; 254 nm). Cells were then scraped in ice-cold PBS, collected by centrifugation, and lysed in NP40 buffer as described in ref.⁶⁴ For each assay, 5 μ g of affinity-purified rabbit anti-FMRP antibody (Ab#056) was used to

immunoprecipitate 1 mg of neuronal extracts and 2% of the lysate was used for assessment of relative RNA expression in the input material. IPs were then carried out at 4 °C for 4 h and 2% of the homogenate and 10% of the immunoprecipitates were saved to check for the IP quality using anti-FMRP immunoblots. After three washes in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 10 mM EDTA, 1 mM NaF, 0.5 mM DTT, protease and phosphatase inhibitors (Pierce), proteins were digested with proteinase K (1 μ g mL⁻¹) for 30 min at 56 °C. IP and input RNAs were purified through two successive rounds of phenol/chloroform extraction, then reverse transcribed using a mix of Oligo dT and random primers and Superscript II enzyme (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. RT reactions were diluted two times and 1 μ L of diluted material was used for qPCR analysis. Relative enrichment of the amplified RNA in the IP vs the input in each condition was calculated with the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} (C_{IP}-C_{input}).

Oligonucleotides (5'-3') used in RNA work was as follows:

*Fmr1*_F: GAACAAAAGACAGCATCGCT; *Fmr1*_R: CCAATTTGTCGCAACTGCTC; *Camk2a*_F: TATCCGCATCACTCAGTAC; *Camk2a*_R: GAAGTGGACGATCTGCCATTT; *Sapap3*_F: ACCATGTAACCCCGGCTG; *Sapap3*_R: CCTTGATGTCAGGATCCCC; *Fxr1*_F: GTGCAGGGTCCCGAGGT; *Fxr1*_R: GGTGGTGGTAATCGGACTTC; *Kif3c*_F: GGTCCCATCCAGATACAGA; *Kif3c*_R: CCAGAAAGCTGCAAACCTC; *Tubb3*_F: CGAGACTATGCTACGACA; *Tubb3*_R: CATTGAGCTGACCTAGGAAT; *PP2a*_F: GTCAAGAGCCTCTGCGAGAA; *PP2a*_R: GCCCATGTACATCTCCACAC; β -*actin*_F: ACGGCCAGTCACTATTG; β -*actin*_R: CACAGGATTCATACCCAAGA; *PSD95*_F: GGCGGAGAGGAACCTGTCC; *PSD95*_R: AGAATTGGCCTTGAGGGAGGA; *Map1b*_F: TCCGATCGTGGACACAAACCTG; *Map1b*_R: AGCACCAGCAGTTTATGGCGGG.

Immunoprecipitation. Proteins from rodent brain lysates or cultured neurons were solubilized for 1 h at 4 °C under gentle rotation in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma, 1/100), Pefabloc 0.5 mM (Roche), MG132 100 μ M (Enzo), ALLN 100 μ M (Sigma), and 20 mM freshly prepared NEM (Sigma). Then, NaCl concentration was raised to 400 mM and lysates were sonicated for 10 s, further incubated for 30 min at 4 °C and clarified (for primary neuronal extracts) or not (for brain homogenates) at 20,000 \times g at 4 °C for 15 min. Supernatants were diluted 2.5-fold with lysis buffer devoid of NaCl and pre-cleared for 1 h with a 50/50 mix of untreated and pre-blocked protein G-sepharose beads (Sigma) with a blocking buffer (PBS containing 5 mg mL⁻¹ BSA, 5 mg mL⁻¹ Dextran (40 kDa), 1 mg mL⁻¹ gelatin, yeast t-RNA 0.1 mg mL⁻¹, and glycogen 0.1 mg mL⁻¹) for 1 h at 4 °C. Proteins (800 μ g) from pre-cleared lysates were incubated with either 8 μ g of mouse monoclonal anti-SUMO1 antibody (Ab#D11, Santa-Cruz), 4 μ g of custom rabbit anti-FMRP (Ab#056, Supplementary Fig. 1), or 12 μ g commercially available rabbit anti-FMRP (#Ab17722, Abcam; Supplementary Fig. 1) antibodies (or their corresponding IgG as IP control) for 1 h at 4 °C and then overnight at 4 °C with 30 μ L of pre-blocked protein G-sepharose beads (Sigma). Precipitates were washed three times with 1 mL lysis buffer and proteins were eluted by boiling the beads 5 min in β ME-reducing sample buffer before SDS-PAGE.

Immunoblotting. Protein extracts were resolved by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond-C Extra, Amersham or BioTraceNT, PALL), immunoblotted with the indicated concentration of primary antibodies and revealed using the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (GE healthcare) or True Blot (Rockland, Tebu-Bio). Proteins were then identified using Immobilon Western (Millipore) or Western Lightning Ultra (Perkin Helmer) chemiluminescent solutions and images acquired on a Fusion FX7 system (Vilber Lourmat). Full-size blots for cropped gels can be found in Supplementary figures 6, 7.

Immunocytochemistry. Neurons (18–21 DIV) were fixed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 3.7% formaldehyde and 5% sucrose for 1 h at room temperature (RT). Neurons were then permeabilized for 20 min in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 10% horse serum (HS) at RT and immunostained with either a rabbit monoclonal anti-S6 (1/200; Cell Signaling), a goat anti-Staufen1 (1/100; Santa-Cruz), a goat anti-Staufen2 (1/100; Santa-Cruz), a rabbit anti-FXR1 (1/100⁶⁵), a mouse monoclonal anti-Ubc9 (1/50; BD Bioscience, France), a mouse anti-SUMO1 (1/50; Ab#D11, Santa-Cruz; 1/50 Ab#2F5-1, DSHB) or rabbit anti-FMRP (1/200; Custom Ab#056 or 1/50; Ab#4317s, Cell Signaling) antibodies in PBS containing 0.05% Triton X-100 and 5% HS. Cells were washed three times in PBS and incubated with the appropriate secondary antibodies (1/400) conjugated to Alexa488 or Alexa594, and mounted with Mowiol (Sigma) until confocal examination.

Ratiometric calcium imaging. Mouse cortical/hippocampal neurons (19–23 DIV) were loaded in neurobasal containing 20 μ M Fura-2AM (Invitrogen) for 30 min. After two washes in physiological 1.6 mM calcium-containing buffer (139 mM NaCl, 1.25 mM glucose, 15 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM MgSO₄, 1.6 mM CaCl₂, 3 mM

KCl, 10 mM HEPES), Fura-2AM-loaded neurons were imaged at 37 °C on an inverted AxioObserver microscope (Carl Zeiss) equipped with a 300 W Xenon lamp (Suttler instruments) and a Fluor 40× (numerical aperture (NA) 1.4) oil immersion objective. Fura-2AM was sequentially excited at 340 and 380 nm and the emission monitored at 510 nm. Images were acquired with a cascade 512 EMCCD camera every 2 s and digitized using Metafluor software (Roper scientific). The intracellular calcium concentration was estimated by measuring the F340/380 nm ratio of fluorescence. Neurons were treated for 40 s with 100 μM DHPG in 1.6 mM calcium-containing buffer.

GFP-FMRP-associated granules analysis. *Fmr1*^{-/-} neurons were co-transfected to express mCherry with the WT or the non-sumoylatable mutant form of GFP-FMRP either for 48 or 72 h. Cells were then rinse twice in PBS and fixed in PBS containing 3.7% formaldehyde and 5% sucrose for 1 h at RT and mounted with Mowiol until use.

smFISH assays. smFISH assays were performed as described previously in ref. 44. Briefly, *Fmr1*^{-/-} neurons grown on glass coverslips were transfected as above at 12 DIV to express the WT or the K88,130R mutant form of GFP-FMRP for 48–60 h. Cells were then fixed in PBS containing 4% formaldehyde for 10 min at RT. smFISH assays were performed as described previously in ref. 44 with the following modified prehybridization buffer: formamide 10%, NaCl 68.5 mM, KCl 1.35 mM, KH₂PO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, SSC 2× (Euromedex), dextran sulfate 10% (Sigma), ribonucleoside vanadyl complexes 10 mM (Sigma), BSA 2 mg mL⁻¹, salmon sperm DNA 0.67 mg mL⁻¹ (Sigma), yeast tRNA 0.67 mg mL⁻¹ (Sigma). Neurons were incubated overnight at 37 °C in the presence of GFP Quasar 570-labeled, PSD-95 or CamKII Quasar 670-labeled Stellaris probes (12.5 picomoles in 100 μL of prehybridization buffer), washed 2 times with pre-warmed 10% formamide in 2× SSC for 20 min at 37 °C, three times 1 min with 2× SSC, and twice for 5 min with 2× SSC under mild agitation prior to coverslip mounting in Vectashield (Clinisciences).

GFP Stellaris probes (used to detect GFP-FMRP mRNA) labeled with Quasar 570 dye were (5′–3′) as follows: tctcgccttctgctccat, atggccaccaccgggtgaa, gtcgcccagctcagca, cgctgaactgtggcctgtt, gcgccctgcctcgcggga, ggtcagcttccgtaggtg, cgggtgctcagatgaactc, ggccagggcagggcagctt, taggtcaggtggtcagcag, tagcggctgaagcagctcag, gtcgctctcagtggtcgg, gcatggcggactgaagaag, cgctcctggacagctcctc, gtcgcttgaagaagatg, tccggccgggtctgtgatt, ggtgctcctcgaactca, ttcagctcagctcgggttac, gtcctcctgaagctcagc, agctgtgccccagatgtt, gttgctgtttagttgact, ttgtcggcatgatagac, caccttgatcggcttctt, atgttggggcagctttaa, gactgacagctgcctcct, tggctctggttagtgctg, agcagggggcctcggat, caggtatggttgcgggca, ttgctcagggcggactggg, atgcgctctcgttgggt, cgaactcagcaggacatg, agatgatcccggcggcgtt, cttagcagctcctcagc.

PSD-95 Stellaris probes, labeled with Quasar 670 dye were (5′–3′) as follows: ctctatgatctcagctg, tagccctttgataagctt, tgcagctgtaagccaagct, ctattatcaggatggt, ccttcgatgatctgttacc, aggatctgttccagatctg, tcatgatgatcactcctag, atagtgttctcaggcgtg, ccacttttagtacaacaag, catagctcactcaggtg, tatgaggttgtgatctgg, tagctcgtatgactgactc, tcaacaccattgaccagcag, tttctgactggcattgctg, tactgagcagatcgtgac, cgaactcgtactactctt, ataagctgttcccgaagatc, tgatataagaaccccgctt, ttgtcgtatgcaaacagggc, tcaagaacccagctcctt, gctggcgtcaattacatgaa, catcgctcactgtcagag, ttgctgggaatgaagcaaa, tctcatagctcagaaccag, aagatgatgatggggcag, agaagatcatcgttggcagc, aaactgtcggggaactcgg, tctgatgagggacagggat, tatctatattcccgttag, cgggagagacaaagtggta, tgaatgtccttccatttt, cagcctcaatgaactgtg, tagaggtgctgttgtactg, gacttgctgaagatcaag, ggatgaagatggcagatagg, cgttatgatctcagc.

CamKII Stellaris probes, labeled with Quasar 670 dye were (5′–3′) as follows: tactctctgtaacgggt, taactctggcagcactc, cttaacaagcggcagatg, tcatggagctcagcagatatt, accagtaacagatcgaaga, gccacaatgtctcaaacag, ggatcagctcactgtaatt, tccaagatcctggtgata, catctggtgacagctgtagca, ttacagcagcggccttgg, tatcaccagctgacagcag, ctctcagcacttctgggg, aggtccacgggtctccgta, agatatacaggtatgaccca, ctggtctcactcccagaagc, ctttgatctcgttaccag, gatgggaatcattagcacc, ggtgacgggttcccattctg, tgcagatcctgcttctt, ggttgatgctcagcactt, tcagcggcgtgagctgtt, agatccatgggtcctgaga, tctcctgctgctcagcag, ctccggagaagtctcgtg, gtcgctcagaagatcctt, tctcctcctcaatggtg, ttctgtttgcgacttgg, gctcctcagcacttggata, cacttgctatggcctg, ctctgctgagactcaaatg, ctgctcactcagggctcagc, cccagggcctcgttcaaa, gaatcagatgaagctcagggc, gggaccacaggttttcaaaa, tgactcgtcaccatcaggt, atcggatataagggcagc, gctgctcaggtactgag, cagacgggtctcctcga, atctgtggaagtgagcagc, cgagtacataggtggcaatg, aaatacaggaagttggct, agatgtcgttaaacgcaaa, acagcattcacaagaagc, tatatcctcagatgagcga, ctgagcctatgaagaagc, ggatgtgatcctcagctg, catggagctcagatgag, ttgagcaggtgcttcaaa.

Analysis of spine morphology. *Fmr1*^{-/-} or WT neurons were transduced at 18 DIV with Sindbis virus (MOI of 1) expressing free GFP, the WT or mutated forms of GFP-FMRP for either 24 h (*Fmr1*^{-/-} neurons), or 30 h (WT neurons) before use.

Cells were then fixed using PBS containing 3.7% formaldehyde and 5% sucrose for 1 h at RT and mounted in Mowiol before confocal examination.

Confocal imaging. For fixed cells, confocal images (1024 × 1024) were acquired with a ×63 oil immersion lens (numerical aperture NA 1.4) on an inverted TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France). Z-series of 6–8 images of randomly selected secondary dendrites were compressed into two dimensions using the maximum projection of the LASAF acquisition software (Leica). Manders' co-localization parameters were computed using the JaCoP plug-in from the ImageJ software⁶⁶ when required.

For GFP-FMRP-containing granule measurements, two Z-series were acquired. The first was acquired at low laser intensity to clearly identify large granules without any pixel saturation and the second series was recorded at a higher laser intensity to detect smaller granules. These two Z-series were then averaged and compressed into two dimensions by a maximal projection. Measurements of the surface of GFP-FMRP-containing granules along dendrites were determined automatically using a home-made ImageJ macro program. Briefly, granules and dendrites were segmented in each image, and the length of the dendritic tree was measured after a step of skeletonization. The data were then imported in GraphPad Prism software for statistical analysis.

For dendritic spine imaging, Z-series of six to eight images of secondary dendrites from GFP-expressing neurons were compressed into two dimensions by a maximal projection using the LASAF software. About 3000–4500 spines were analyzed per condition (two to four dendrites per neuron and from 20 to 30 neurons per condition from four independent experiments, which were done blind for two of them). At the time of acquisition, laser power was adjusted so that all spines were below the saturation threshold. To analyze dendritic protrusions, projection images were imported into NeuronStudio software⁶⁷, which allows for the automated detection of immature and mature dendritic spines. The length of individual spines was automatically measured and data were imported in GraphPad Prism software for statistical analysis. Mature spines were characterized by a head diameter ranging from 0.3 to 1 μm and a spine length between 0.4 and 3 μm. Immature spines corresponded to protrusions with a head diameter below 0.3 μm and a spine length ranging from 0.5 to 6 μm.

Fluorescence lifetime imaging experiments. *Fmr1*^{-/-} neurons co-expressing mCherry with the WT or the non-sumoylatable mutant form of GFP-FMRP for 72 h were fixed in PBS containing 3.7% formaldehyde and 5% sucrose for 1 h at RT and mounted using Mowiol. FLIM was then performed on a Nikon A1R confocal laser-scanning microscope equipped with time-correlated single-photon counting electronics (PicoHarp 300; PicoQuant). Excitation was obtained using a pulsed laser LDH-D-C-485 (PicoQuant) at a repetition rate of 40 MHz allowing the acquisition of the full intensity decay. Fluorescence emission was collected by a hybrid photomultiplier detector (PicoQuant) through a 60 × λS, NA 1.4, oil objective (Nikon Instruments) and band-pass filter (520/35). The following parameters were kept constant for all acquisition: pixel size (70 nm, 512 × 512), pixel dwell time (4.8 μs), and acquisition time (5 min per image). So as to limit pile-up and to accumulate enough photons within the 5 min acquisition time, laser excitation power was adjusted to obtain a count rate between 0.4 and 2 MHz⁶⁸. In these conditions, there was no measurable photobleaching. Each field of view was also acquired in conventional confocal mode. EGFP and mCherry channels were, respectively, acquired using the 488-nm excitation with the 525/50-nm band-pass detection and the 561-nm excitation with the 595/50-nm band-pass detection.

Fluorescence lifetime was measured by fitting the intensity decays with a monoexponential decay model deconvolved with experimental IRF (instrument response function) using the software SymPhoTime (PicoQuant). Intensity decays were fitted pixel by pixel to provide FLIM images and calculated lifetimes represented using a pseudo-color scale ranging from 1.7 to 2.2 ns. To improve robustness of the fit, IRF parameters were fixed as the IRF is expected to be invariant over the acquisition field. The robustness of the fit was assessed by the calculated standard weighted least square (χ^2) and the residual⁶⁹. Values of the reduced χ^2 should be close to 1 and residue should be randomly distributed around zero. The average lifetime of the FLIM image (Tau, ns) was determined from the barycentre of the frequency histogram associated with the FLIM image. To calculate the fluorescence lifetime of individual granules, the intensity decay resulting from all the photons of the granule was fitted using a monoexponential model deconvolved with IRF.

To get enough photons at each pixel for an accurate intensity decay fit, only granules with >10,000 photons (integrated number of photons over the decay) were analyzed, with a minimum pixel threshold of 500 counts for background rejection. To reach 10,000 photons per granules and to reject granules, which were largely out of focus, only granules >0.35 μm² were analyzed (segmentation using ImageJ). To avoid pulse pile-up and to collect photons fast enough to meet the above criteria, count rate was kept between 0.4 and 4 MHz. Clusters with higher count rate were excluded from the analysis. In those conditions, the fluorescent lifetime was invariant.

Dendra2-FMRP-containing granule photoconversion experiments. Experiments were performed as previously described^{26,48}. Briefly, live *Fmr1*^{-/-} neurons

expressing the WT or mutated Dendra2-FMRP from were kept in Earle's buffer (25 mM HEPES-Tris, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 0.9 g L⁻¹ glucose) on the heated stage (set at 37 °C) of a Nikon Ti inverted microscope and imaged using an ultraviolet spinning disk confocal system (Perkin Elmer, France). Cells were then stimulated or not with 50 μM DHPG in Earle's buffer. After a 10-min incubation time in either control or DHPG solution, Dendra2-FMRP-granules were photoconverted through a ×100/ NA 1.4 oil immersion objective for 30 ms using 405-nm laser light (50 mW, 15%). The red photoconverted Dendra2-FMRP was excited using a 561-nm laser light (50 mW, 17%) and two-dimensional-time series (2 Hz) were collected for 10 min. The decrease in red fluorescence from the Dendra2-FMRP photoconverted granules was measured over time using Volocity 6.3 software and data expressed as the percentage of the initial red photoconverted fluorescence (F/F_0). Curves were fitted using a monoexponential decay equation and data analyzed using GraphPad Prism.

GST- and His-FMRP production and purification. GST- or His-FMRP (1–160) proteins were produced in *E. coli* BL21(DE3) cells (Invitrogen, France). A single colony was picked and used to inoculate 25 mL of LB broth supplemented with 50 μg mL⁻¹ ampicillin. This was used to inoculate 500 mL of LB and was shaken at 37 °C until OD₆₀₀ reached 0.8. Cells were then transferred at 20 °C and protein synthesis induced by addition of 1 mM IPTG (Sigma, France). After 4 h at 20 °C, cells were pelleted by centrifugation at 7000×g for 5 min and then gently resuspended in ice-cold PBS and frozen at –80 °C until use. Pellets were then resuspended in 5 mL lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 5% ETOH, 0.5% NP40, 0.5 M urea) supplemented with 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, France). Cells were disrupted by incubation with 1% lysozyme (Sigma, France) for 30 min at 4 °C followed by another 30 min in the presence of 0.1% deoxycholic acid, 10 mM MgCl₂ and 200 ng μL⁻¹ DNase. Lysates were then clarified by centrifugation at 10,000×g for 15 min. GST- or His-tagged proteins were purified using either glutathione gel (GE Healthcare) for GST- and GST-FMRP or Nickel resin (Qiagen) for His-fusion proteins. Proteins were then concentrated on Amicon 3-kDa cutoff filters (Millipore) by centrifugation and resuspended in PBS. Concentrations of purified proteins were determined using the BCA protein assay (Bio-Rad) and protein quality assessed by SDS-PAGE and Coomassie Blue protein staining (Clinisciences).

GST-FMRP/His-FMRP dimerization. GST- (control) or GST-FMRP (1–160) fusion proteins (1 μg) were incubated with an excess of 2 μg His-FMRP (1–160) for 2 h at 4 °C in dimerization buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5% NP40, 0.5 mM DTT, 1% protease inhibitor cocktail) to allow for GST-FMRP/His-FMRP dimerization. Then, 50 μL of glutathione beads (GE Healthcare) were added to the dimerization mix and incubated at 4 °C for 2 h. After five washes in dimerization buffer at 4 °C, immobilized GST-FMRP (1–160)—His-FMRP (1–160) dimers were processed for in vitro sumoylation assays.

In vitro SUMO assays. Immobilized GST-FMRP/His-FMRP dimers were incubated with 0.15 μg of E1-activating complex (Enzo Life science), 0.1 μg of E2 Ubc9 (Enzo Life science), 3 μg of SUMO1-GG in 20 μL of in vitro SUMO reaction mix (20 mM HEPES pH 7.3, 110 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.05% Tween 20, 0.2 mg mL⁻¹ ovalbumin) including the ATP regenerating system (20 mM ATP, 10 mM creatine phosphate, 3.5 U mL⁻¹ of creatine kinase, and 0.6 U mL⁻¹ of inorganic pyrophosphatase (Sigma-Aldrich) for 2 h at 30 °C). After centrifugation for 5 min at 3000×g at 4 °C, the supernatant containing the released His-FMRP (1–160) and the pellet containing the remaining immobilized GST-FMRP/His-FMRP dimers were denatured at 95 °C for 10 min in 5× Laemmli buffer containing 7.5% β-mercaptoethanol and analyzed by immunoblotting with FMRP #2F5-1 antibodies.

Electrophysiological recordings. Patch clamp experiments were carried out at RT (22–25 °C) on mixed cultured cortical/hippocampal neurons obtained from *FMRP*^{-/-} mice (four different cultures). *FMRP*^{-/-} neurons (18 DIV) were transfected for 24–26 h with attenuated Sindbis virus to express GFP-FMRP WT or the non-sumoylatable GFP-FMRP-K88,130,614R. Patch pipettes displayed a resistance of 4–7 MΩ and filled with a solution containing (in mM): 2 Na₂-ATP, 130 CsMeSO₄, 5 CsCl, 2.5 MgCl₂, 1 Na-GTP, 5 EGTA, and 10 HEPES (pH adjusted to 7.2 with CsOH). The extracellular bathing solution contained (in mM): 145 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, 0.02 bicuculline, and 0.00025 TTX (pH adjusted to 7.4 with NaOH). We used the whole-cell configuration to record mEPSCs from GFP-positive neurons that were voltage-clamped at –70 mV, i.e., the estimated reversal potential for chloride. mEPSCs were recorded for 10 min, starting 1–2 min after the whole-cell mode was achieved and series resistances were monitored every 50 s by injecting a 5 mV hyperpolarizing current for 10 ms. Data were sampled at 20 kHz, low-pass filtered at 5 kHz (Axopatch 200B Molecular Devices), digitalized (Digidata 1440, Molecular Devices) and recorded using Clampex software (pClamp 10, Molecular Devices). Analysis of series resistances and mEPSCs were performed offline using Clampfit software (pClamp 10, Molecular Devices). mEPSCs were analyzed over periods of 200 s for which series resistances were stable, i.e., did not vary for >25%.

Data and statistical analysis. Statistical analyses were calculated using GraphPad Prism (GraphPad software, Inc). All data are expressed as mean ± s.e.m. Unpaired *t* test (Fig. 3i) or non-parametric Mann-Whitney test (Figs. 4c and 5d, f, g) were used to compare medians of two data sets. For spine morphogenesis experiments, values represent means ± s.e.m. Statistical significance for multiple comparison data sets was computed using a one-way analysis of variance with a Bonferroni post-test (Figs. 2b–d, 5e, 7b–d, and Supplementary Fig. 2b–d). Normality for all groups was verified using the Shapiro–Wilk test. According to the Levene variance test, variances were homogenous for the percentage of immature and mature spines (Figs. 2b–d, 7b–d, and Supplementary Fig. 2b–d). For FLIM, data distributions were represented as box and whiskers plots displaying upper and lower quartiles, and maximum and minimum values in addition to median. For electrophysiological data, distributions were analyzed by a Kolmogorov–Smirnov test (Supplementary Fig. 3b, c). **p* < 0.05 was considered significant.

Data availability. All relevant data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 25 July 2017 Accepted: 28 January 2018

Published online: 22 February 2018

References

1. Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J. E. & Woolfrey, K. M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* **14**, 285–293 (2011).
2. Grant, S. G. Synaptopathies: diseases of the synaptome. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 522–529 (2012).
3. Bassell, G. J. Fragile balance: RNA editing tunes the synapse. *Nat. Neurosci.* **14**, 1492–1494 (2011).
4. Darnell, J. C. & Klann, E. The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat. Neurosci.* **16**, 1530–1536 (2013).
5. Maurin, T., Zongaro, S. & Bardoni, B. Fragile X syndrome: from molecular pathology to therapy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **46**, 242–255 (2014).
6. Grossman, A. W., Elisseou, N. M., McKinney, B. C. & Greenough, W. T. Hippocampal pyramidal cells in adult *Fmr1* knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brain Res.* **1084**, 158–164 (2006).
7. Patel, A. B., Loerwald, K. W., Huber, K. M. & Gibson, J. R. Postsynaptic FMRP promotes the pruning of cell-to-cell connections among pyramidal neurons in the L5A neocortical network. *J. Neurosci.* **34**, 3413–3418 (2014).
8. Yan, Z., Kim, E., Datta, D., Lewis, D. A. & Soderling, S. H. Synaptic actin dysregulation, a convergent mechanism of mental disorders? *J. Neurosci.* **36**, 11411–11417 (2016).
9. Bakker, C. E. *Fmr1* knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. *Cell* **78**, 23–33 (1994).
10. Mientjes, E. J. et al. The generation of a conditional *Fmr1* knock out mouse model to study *Fmrp* function in vivo. *Neurobiol. Dis.* **21**, 549–555 (2006).
11. Narayanan, U. et al. FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. *J. Neurosci.* **27**, 14349–14357 (2007).
12. Niere, F., Wilkerson, J. R. & Huber, K. M. Evidence for a fragile X mental retardation protein-mediated translational switch in metabotropic glutamate receptor-triggered Arc translation and long-term depression. *J. Neurosci.* **32**, 5924–5936 (2012).
13. Hou, L. et al. Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron* **51**, 441–454 (2006).
14. Nalavadi, V. C., Muddashetty, R. S., Gross, C. & Bassell, G. J. Dephosphorylation-induced ubiquitination and degradation of FMRP in dendrites: a role in immediate early mGluR-stimulated translation. *J. Neurosci.* **32**, 2582–2587 (2012).
15. Matunis, M. J., Coutavas, E. & Blobel, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **135**, 1457–1470 (1996).
16. Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. & Melchior, F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**, 97–107 (1997).
17. Flotho, A. & Melchior, F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 357–385 (2013).
18. Henley, J. M., Craig, T. J. & Wilkinson, K. A. Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction. *Physiol. Rev.* **94**, 1249–1285 (2014).
19. Schorova, L. & Martin, S. Sumoylation in synaptic function and dysfunction. *Front. Synaptic Neurosci.* **8**, 9 (2016).

20. Hickey, C. M., Wilson, N. R. & Hochstrasser, M. Function and regulation of SUMO proteases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 755–766 (2012).
21. Kerscher, O. SUMO junction—what’s your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep.* **8**, 550–555 (2007).
22. Meulmeester, E. & Melchior, F. Cell biology: SUMO. *Nature* **452**, 709–711 (2008).
23. Gwizdek, C., Casse, F. & Martin, S. Protein sumoylation in brain development, neuronal morphology and spinogenesis. *Neuromol. Med.* **15**, 677–691 (2013).
24. Loriol, C., Parisot, J., Poupon, G., Gwizdek, C. & Martin, S. Developmental regulation and spatiotemporal redistribution of the sumoylation machinery in the rat central nervous system. *PLoS ONE* **7**, e33757 (2012).
25. Loriol, C., Khayachi, A., Poupon, G., Gwizdek, C. & Martin, S. Activity-dependent regulation of the sumoylation machinery in rat hippocampal neurons. *Biol. Cell* **105**, 30–45 (2013).
26. Loriol, C. et al. mGlu5 receptors regulate synaptic sumoylation via a transient PKC-dependent diffusional trapping of Ubc9 into spines. *Nat. Commun.* **5**, 5113 (2014).
27. Girach, F., Craig, T. J., Rocca, D. L. & Henley, J. M. RIM1 α SUMOylation is required for fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell Rep.* **5**, 1294–1301 (2013).
28. Craig, T. J., Anderson, D., Evans, A. J., Girach, F. & Henley, J. M. SUMOylation of Syntaxin1A regulates presynaptic endocytosis. *Sci. Rep.* **5**, 17669 (2015).
29. Shalizi, A. et al. A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* **311**, 1012–1017 (2006).
30. Shalizi, A. et al. PIASx is a MEF2 SUMO E3 ligase that promotes postsynaptic dendritic morphogenesis. *J. Neurosci.* **27**, 10037–10046 (2007).
31. Martin, S., Nishimune, A., Mellor, J. R. & Henley, J. M. SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* **447**, 321–325 (2007).
32. Chamberlain, S. E. et al. SUMOylation and phosphorylation of GluK2 regulate kainate receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* **15**, 845–852 (2012).
33. Craig, T. J. et al. Homeostatic synaptic scaling is regulated by protein SUMOylation. *J. Biol. Chem.* **287**, 22781–22788 (2012).
34. Sampson, D. A., Wang, M. & Matunis, M. J. The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* **276**, 21664–21669 (2001).
35. Uchimura, Y., Nakao, M. & Saitoh, H. Generation of SUMO-1 modified proteins in *E. coli*: towards understanding the biochemistry/structural biology of the SUMO-1 pathway. *FEBS Lett.* **564**, 85–90 (2004).
36. Comery, T. A. et al. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 5401–5404 (1997).
37. Zeier, Z. et al. Fragile X mental retardation protein replacement restores hippocampal synaptic function in a mouse model of fragile X syndrome. *Gene Ther.* **16**, 1122–1129 (2009).
38. Martin, S., Bouschet, T., Jenkins, E. L., Nishimune, A. & Henley, J. M. Bidirectional regulation of kainate receptor surface expression in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **283**, 36435–36440 (2008).
39. Xiong, H. et al. mTOR is essential for corticosteroid effects on hippocampal AMPA receptor function and fear memory. *Learn. Mem.* **22**, 577–583 (2015).
40. Xiong, H. et al. Interactions between N-ethylmaleimide-sensitive factor and GluA2 contribute to effects of glucocorticoid hormones on AMPA receptor function in the rodent hippocampus. *Hippocampus* **26**, 848–856 (2016).
41. Suvrathan, A., Hoeffler, C. A., Wong, H., Klann, E. & Chattarji, S. Characterization and reversal of synaptic defects in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 11591–11596 (2010).
42. Scharkowski, F., Frotscher, M., Lutz, D., Korte, M., & Michaelsen-Preusse, K. Altered connectivity and synapse maturation of the hippocampal mossy fiber pathway in a mouse model of the fragile X syndrome. *Cereb. Cortex* <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw408> (2017).
43. Gocel, J. & Larson, J. Synaptic NMDA receptor-mediated currents in anterior piriform cortex are reduced in the adult fragile X mouse. *Neuroscience* **221**, 170–181 (2012).
44. Ifrim, M. F., Williams, K. R. & Bassell, G. J. Single-molecule imaging of PSD-95 mRNA translation in dendrites and its dysregulation in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci.* **35**, 7116–7130 (2015).
45. Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**, 513–525 (2004).
46. Elvira, G. et al. Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol. Cell. Proteom.* **5**, 635–651 (2006).
47. Adinolfi, S. et al. The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding. *Biochemistry* **42**, 10437–10444 (2003).
48. Casse, F. & Martin, S. Tracking the activity-dependent diffusion of synaptic proteins using restricted photoconversion of Dendra2. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 367 (2015).
49. Gurskaya, N. G. et al. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat. Biotechnol.* **24**, 461–465 (2006).
50. Chudakov, D. M., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2. *Nat. Protoc.* **2**, 2024–2032 (2007).
51. Antar, L. N., Afroz, R., Dichtenberg, J. B., Carroll, R. C. & Bassell, G. J. Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile X mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J. Neurosci.* **24**, 2648–2655 (2004).
52. Dichtenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H. & Bassell, G. J. A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev. Cell* **14**, 926–939 (2008).
53. Chao, H. W., Hong, C. J., Huang, T. N., Lin, Y. L. & Hsueh, Y. P. SUMOylation of the MAGUK protein CASK regulates dendritic spinogenesis. *J. Cell. Biol.* **182**, 141–155 (2008).
54. Ceman, S. et al. Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 3295–3305 (2003).
55. Narayanan, U. et al. S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **283**, 18478–18482 (2008).
56. Quartier, A. et al. Intragenic FMR1 disease-causing variants: a significant mutational mechanism leading to fragile-X syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **25**, 423–431 (2017).
57. Myrick, L. K. et al. Fragile X syndrome due to a missense mutation. *Eur. J. Hum. Genet.* **22**, 1185–1189 (2014).
58. Myrick, L. K. et al. Independent role for presynaptic FMRP revealed by an FMR1 missense mutation associated with intellectual disability and seizures. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 949–956 (2015).
59. Hu, Y. et al. The amino-terminal structure of human fragile X mental retardation protein obtained using precipitant-immobilized imprinted polymers. *Nat. Commun.* **6**, 6634 (2015).
60. Myrick, L. K., Hashimoto, H., Cheng, X. & Warren, S. T. Human FMRP contains an integral tandem Agenet (Tudor) and KH motif in the amino terminal domain. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 1733–1740 (2015).
61. Richmond, T. J. Solvent accessible surface area and excluded volume in proteins. Analytical equations for overlapping spheres and implications for the hydrophobic effect. *J. Mol. Biol.* **178**, 63–89 (1984).
62. Cappadocia, L. et al. Structural and functional characterization of the phosphorylation-dependent interaction between PML and SUMO1. *Structure* **23**, 126–138 (2015).
63. Sittler, A., Devys, D., Weber, C. & Mandel, J. L. Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 95–102 (1996).
64. Hafner, M. et al. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129–141 (2010).
65. Khandjian, E. W. et al. Novel isoforms of the fragile X related protein FXR1P are expressed during myogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 2121–2128 (1998).
66. Bolte, S. & Cordelières, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224**, 213–232 (2006).
67. Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dickstein, D. L., Hof, P. R. & Wearne, S. L. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS ONE* **3**, e1997 (2008).
68. Becker, W. et al. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microsc. Res. Tech.* **63**, 58–66 (2004).
69. Lakowicz, J. R. Principles of frequency-domain fluorescence spectroscopy and applications to cell membranes. *Subcell. Biochem.* **13**, 89–126 (1988).

Acknowledgements

We thank J. Henley, F. Melchior, G. Bossis, Y. Uchimura, and H. Saitoh for sharing DNA plasmids and H. Leonhardt for the generous gift of mCherry antibodies. We gratefully acknowledge R. Willemsen (Rotterdam, NL) for the gift of *Fmr1*^{-/-} mice. We also thank L. Davidovic and S. Zongaro for helpful discussion in the initial step of the work and F. Aguila for excellent artwork. We gratefully acknowledge the “Fondation pour la Recherche Médicale” (Equipe labellisée #DEQ20111223747 to S.M.; #DEQ20140329490 to B.B.; #DEQ20110421309 to E.D.), the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-15-CE16-0015-01 to S.M., ANR-12-BSV4-0020, ANR-12-SVSE8-0022, and ANR-15-CE16-0015-02 to B.B., ANR-13-BVS4-0009 to E.D.), the FRAXA foundation to T.M., the French Muscular Dystrophy Association AFM-Téléthon to E.D., the “Jérôme Lejeune” (S.M. and B.B.), and “Bettencourt-Schueller” (S.M.) foundations for financial support. We also thank the French Government for the “Investments for the Future” LabEx “SIGNALIFE” (ANR-11-LABX-0028-01), LabEx “ICST” (ANR-11-LABX-0015-01), the CNRS LIA “Neogenex” and the CG06 (AAP santé), GIS IBIISA (AO 2014) and Région PACA for the Microscopy and Imaging Côte d’Azur (MICA) platform funding. M.P., L.S., and S.C. are fellows from the international PhD “Signalife” LabEx program.

Author contributions

A.K. performed the majority of fixed granule work and all the neuronal architecture imaging experiments and some biochemistry. C.G. performed most of the molecular cloning, bacterial sumoylation assays, some of the bioinformatic analyses, and some of the endogenous SUMO-protein work. A.K., C.L., F.C., L.S., A.F., M.P., M.Pro., and G.P. prepared neuronal cultures and biochemical tools. M.C. and E.D. performed and analyzed electrophysiology experiments. G.P. prepared viral particles and achieved the FMRP dimerization/sumoylation experiments. T.M. and A.K. performed and analyzed CLIP experiments. S.C. and T.M. performed calcium imaging. F.D.G. and F.B. performed and analyzed smFISH experiments. R.G. performed FMRP structural analysis with help from C.G., F.C., and S.M. performed live-cell imaging experiments. F.Br. provided computational tools to analyze imaging data. D.A. performed and analyzed FLIM experiments. B. B. provided some FMRP coding complementary DNAs and antibodies as well as input for the mRNA work. A.K., C.G., and S.M. contributed to hypothesis development, experimental design, and data interpretation. S.M. provided the overall supervision, the funding, and wrote the article. All authors discussed the data and commented on the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03222-y>.

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Annexe 2

The synaptic balance between sumoylation and desumoylation is maintained by the activation of metabotropic mGlu5 receptors

(Publié dans Cellular and Molecular Life Sciences, Mars 2019)

Schorova L¹, Pronot M¹, Poupon G¹, Prieto M¹, Folci A¹, Khayachi A¹, Brau F¹, Cassé F¹, Gwizdek C¹ & Martin S².

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, 06560, France.

² Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, 06560 France.

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle réversible essentielle à la modulation de la fonction neuronale. Un équilibre étroitement régulé entre SUMOylation et désSUMOylation est donc essentiel au bon fonctionnement cérébral et sa perturbation a été associée à différents troubles neurologiques. Cet équilibre entre SUMOylation et désSUMOylation est régi par l'activité de l'unique enzyme de conjugaison Ubc9, et des enzymes de désSUMOylation SENPs. Le laboratoire a démontré que l'activation brève des mGlu5R déclenche le piégeage transitoire de Ubc9 dans les épines dendritiques, conduisant à une augmentation rapide de la SUMOylation synaptique globale (Loriol *et al.*, 2012). En utilisant une combinaison d'approches d'imagerie en temps réel, de biochimie et de biologie cellulaire, nous montrons ici que l'activation prolongée des mGlu5R conduit à une accumulation de SENP1 à la postsynapse. Ceci entraîne une diminution des niveaux de SUMOylation synaptique, les ramenant ainsi à leurs niveaux initiaux. Dans l'ensemble, nos résultats révèlent que la signalisation des mGlu5R est un mécanisme central pour le maintien de l'homéostasie de la SUMOylation au niveau de la synapse des mammifères.

J'ai participé à ce projet en préparant les cultures primaires de neurones de rat et en réalisant une partie des expériences de FRAP et de biochimie synaptique. J'ai également analysé les données que j'ai obtenues et activement contribué au processus d'écriture du manuscrit.



The synaptic balance between sumoylation and desumoylation is maintained by the activation of metabotropic mGlu5 receptors

Lenka Schorova¹ · Marie Pronot¹ · Gwénola Poupon¹ · Marta Prieto¹ · Alessandra Folci¹ · Anouar Khayachi¹ · Frédéric Brau¹ · Frédéric Cassé¹ · Carole Gwizdek¹ · Stéphane Martin²

Received: 16 January 2019 / Revised: 1 March 2019 / Accepted: 18 March 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

Sumoylation is a reversible post-translational modification essential to the modulation of neuronal function, including neurotransmitter release and synaptic plasticity. A tightly regulated equilibrium between the sumoylation and desumoylation processes is critical to the brain function and its disruption has been associated with several neurological disorders. This sumoylation/desumoylation balance is governed by the activity of the sole SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and a group of desumoylases called SENPs, respectively. We previously demonstrated that the activation of type 5 metabotropic glutamate receptors (mGlu5R) triggers the transient trapping of Ubc9 in dendritic spines, leading to a rapid increase in the overall synaptic sumoylation. However, the mechanisms balancing this increased synaptic sumoylation are still not known. Here, we examined the diffusion properties of the SENP1 enzyme using a combination of advanced biochemical approaches and restricted photobleaching/photoconversion of individual hippocampal spines. We demonstrated that the activation of mGlu5R leads to a time-dependent decrease in the exit rate of SENP1 from dendritic spines. The resulting post-synaptic accumulation of SENP1 restores synaptic sumoylation to initial levels. Altogether, our findings reveal the mGlu5R system as a central activity-dependent mechanism to maintaining the homeostasis of sumoylation at the mammalian synapse.

Keywords Sumoylation · Desumoylation · SENP1 · Synapse · mGlu5 receptor

Introduction

Synapses are highly specialized structures where neuronal transmission takes place. The efficacy of neuronal communication depends on complex protein–protein interactions that need to be tightly regulated in a spatiotemporal manner both

at the pre- and post-synaptic compartments. In this context, post-translational modifications (PTMs) play an essential role [1]. Among them, sumoylation has emerged as a key regulator of the neuronal function [2, 3]. Sumoylation was initially described as a PTM restricted to the nucleus and controlling the nuclear homeostasis. However, in the last decade, sumoylation has also been identified as a crucial regulator of extra-nuclear proteins playing important roles in neuronal excitability [4–6], post-synaptic differentiation [7] as well as in synaptic transmission and plasticity [8–10]. Dysregulation in protein sumoylation is directly correlated with the development of several neurological disorders, including Parkinson's and Alzheimer's diseases [2, 3].

At the molecular level, sumoylation consists in the covalent enzymatic conjugation of the Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) protein (~ 100 amino acids; ~ 11 kDa) to specific lysine residues of substrate proteins [11, 12]. Three functional SUMO paralogs (SUMO1, SUMO2 and SUMO3) are expressed in the mammalian brain. The sumoylation process requires a dedicated enzymatic pathway. SUMO proteins are conjugated to their substrates via the sole E2-conjugating

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03075-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Stéphane Martin
martin@ipmc.cnrs.fr

¹ Université Côte d'Azur, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7275, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France

² Université Côte d'Azur, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7275, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France

enzyme Ubc9 with or without the help of an E3-ligase. Sumoylation is a reversible process due to the activity of specific desumoylation enzymes called Sentrin-specific proteases (SENPs) that are responsible for the removal of SUMO moieties from their substrate proteins [13]. In mammals, SENPs form a family of six paralogs characterized by their specific subcellular localizations and selectivity for different SUMO molecules [13]. Importantly, in neurons, SENP1 is partly localized to dendritic spines [14, 15] and can actively remove SUMO from target proteins [3, 13].

Sumoylation modulates the dynamics of multi-protein complexes by preventing protein–protein interactions or creating new binding sites for specific interactors [16, 17]. Therefore, the extent and duration of sumoylation of a specific target protein, which is directly linked to the dynamic equilibrium between its SUMO conjugation and deconjugation, is critical to shape a functional protein network. Consistent with this view, we previously demonstrated the existence of a spatiotemporal and activity-dependent regulation of the sumoylation process in the brain [5, 15]. In particular, we showed that the activation of the type 5 metabotropic glutamate receptor (mGlu5R) promotes the transient trapping of Ubc9 in dendritic spines leading to an overall increase in synaptic sumoylation [5]. Since the homeostasis of protein sumoylation must be preserved to maintain the neuronal function [2, 3], the mGlu5R-dependent increase in synaptic sumoylation has to be balanced by the desumoylation process. However, the activity-dependent mechanisms driving the spatiotemporal targeting and removal of the SENP enzymes at synapses remain to be elucidated. Investigating such mechanisms is of critical importance to understand how the steady-state level of synaptic sumoylation is locally maintained.

Here, we characterize the activity-dependent diffusion of the desumoylating enzyme SENP1 in dendritic spines of rat cultured neurons using a combination of biochemical and live-imaging approaches. We show that SENP1 is highly mobile in neurons and demonstrate that its synapto-dendritic diffusion is regulated by the activation of mGlu5R. The sustained activation of these receptors leads to an increased synaptic localization of SENP1 independently of its enzymatic activity. The pharmacological activation of the mGlu5R pathway strongly decreases the exit rate of SENP1 from dendritic spines, resulting in a time-dependent accumulation of SENP1 at post-synaptic sites. Altogether, our data clearly demonstrate that the mGlu5R-dependent accumulation of SENP1 at the synapse is essential to counteract the earlier Ubc9-driven increase of synaptic sumoylation [5]. Thus, we uncover a novel activity-dependent regulatory pathway to dynamically maintain the homeostasis of sumoylation at the mammalian synapse.

Results

The diffusion of SENP1 is regulated by neuronal activity

To assess the mobility of SENP1 at synapses and its potential involvement in the homeostasis of synaptic sumoylation, we expressed GFP-tagged SENP1 in rat hippocampal neurons and verified its subcellular localization (Supplementary figure 1). As expected from the literature [13, 18], we observed the majority of GFP-SENP1 within the nucleus, indicating that the GFP tag does not impair the nucleocytoplasmic transport of the desumoylation enzyme (Supplementary figure 1a, b). GFP-SENP1 was also detected as a diffused fluorescence along the dendritic shaft as well as in puncta partly overlapping with PSD95-positive clusters, indicating that GFP-SENP1 localizes to post-synaptic sites (~17% of GFP-SENP1 fluorescence within PSD95 clusters; Supplementary figure 1c, d). A similar distribution was measured for the endogenous SENP1 enzyme with ~13% of the SENP1 immunoreactivity in PSD95 clusters (Supplementary figure 1e, f).

To further examine that the GFP tag does not affect SENP1 activity, we expressed GFP-SENP1-WT in COS7 cells to monitor its ability to promote desumoylation. As expected, the expression of GFP-SENP1 significantly decreased SUMO1-modified protein levels (Supplementary figure 1g–i). Altogether, these findings indicated that GFP-SENP1 is functional and has a subcellular localization similar to the one reported for the endogenous SENP1 enzyme [14, 15].

We previously demonstrated that the synapto-dendritic diffusion of the sole SUMO-conjugating enzyme Ubc9 is regulated by synaptic activity [5]. Since the homeostasis of synaptic sumoylation must be maintained, we examined whether neuronal activity also impacts the synaptic diffusion of the desumoylation enzyme SENP1. To this end, we combined time-lapse microscopy with the use of pharmacological drugs to potentiate synaptic activity. We incubated GFP-SENP1-expressing hippocampal neurons with the GABA_A receptor inhibitor bicuculline [5], leading to an overall potentiation of the neuronal network activity. Using live-cell imaging, we recorded the redistribution of GFP-SENP1 in real time during neuronal stimulation (Fig. 1a–c). Synaptic activation induced by bicuculline led to a time-dependent increase in GFP-SENP1 fluorescence in dendritic spines, peaking at 25 min after the beginning of the treatment (Fig. 1a–c; Supplementary video 1). The gradual increase in GFP-SENP1 fluorescence in spines was associated with a concomitant decrease in GFP-SENP1 fluorescence along the dendritic shaft (Fig. 1a–c). Interestingly, GFP-SENP1 fluorescence from the activated spines

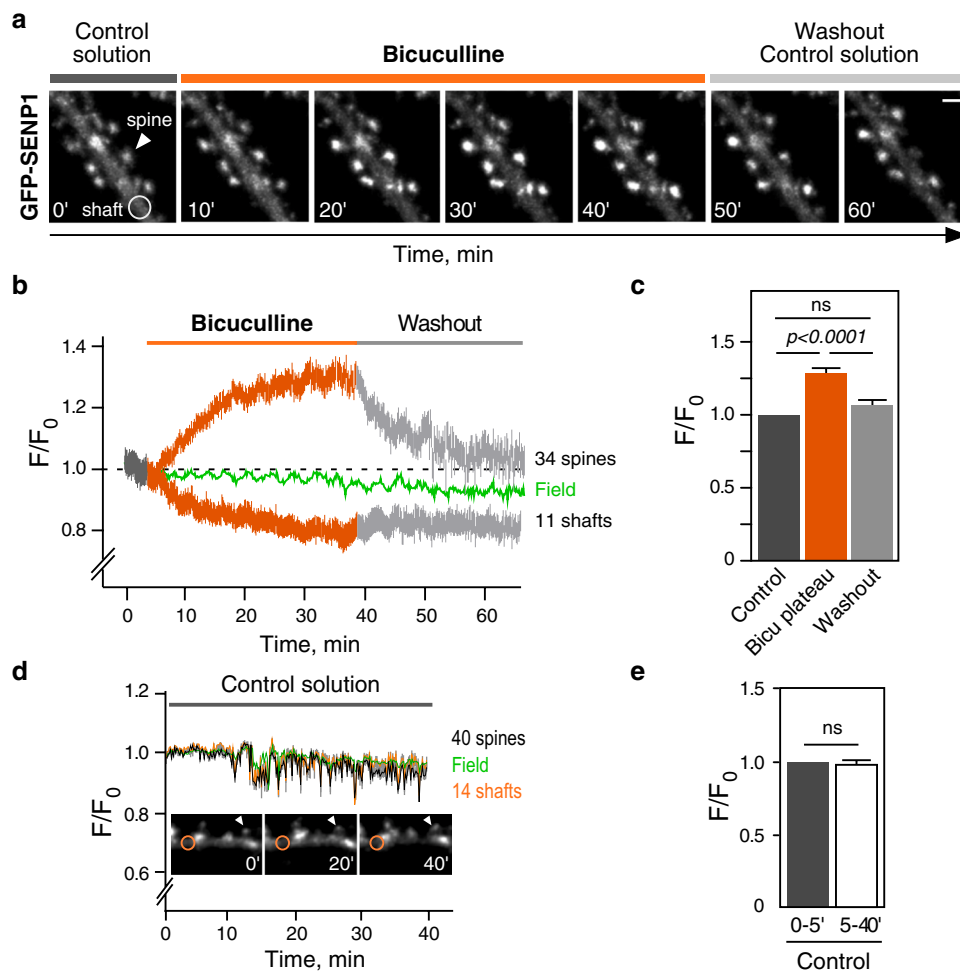


Fig. 1 Activity-dependent redistribution of GFP-SEN1 into spines. **a** Representative confocal images of a time-lapse recording of a GFP-SEN1 expressing rat hippocampal secondary dendrite in control and bicuculline (10 μ M)-treated conditions as indicated on the top bars. **b** Quantification of time-lapse experiments showing the variation of normalized fluorescence intensity \pm SEM in spines ($n=34$), shafts ($n=11$) and whole dendritic area. **c** Histograms showing the mean GFP-SEN1 fluorescence intensity \pm SEM in spines in control, bicuculline plateau (1.29 ± 0.03) and washout (1.07 ± 0.04). Statistics: paired, non-parametric one-way ANOVA with Tukey post hoc test.

p values are indicated on the bars. *ns* non-significant. **d** Graphical representation and corresponding confocal images of control time-lapse recording of a GFP-SEN1-expressing hippocampal dendrite. Curves represent the mean variation \pm SEM of GFP-SEN1 fluorescence in spines, shafts and whole dendritic field in control solution. **e** Bar graph shows mean fluorescence intensity \pm SEM in spines during the 0–5-min and 5–40-min incubation periods with control solution. $N=40$ spines. Statistics: paired, non-parametric t test. *ns* not significant

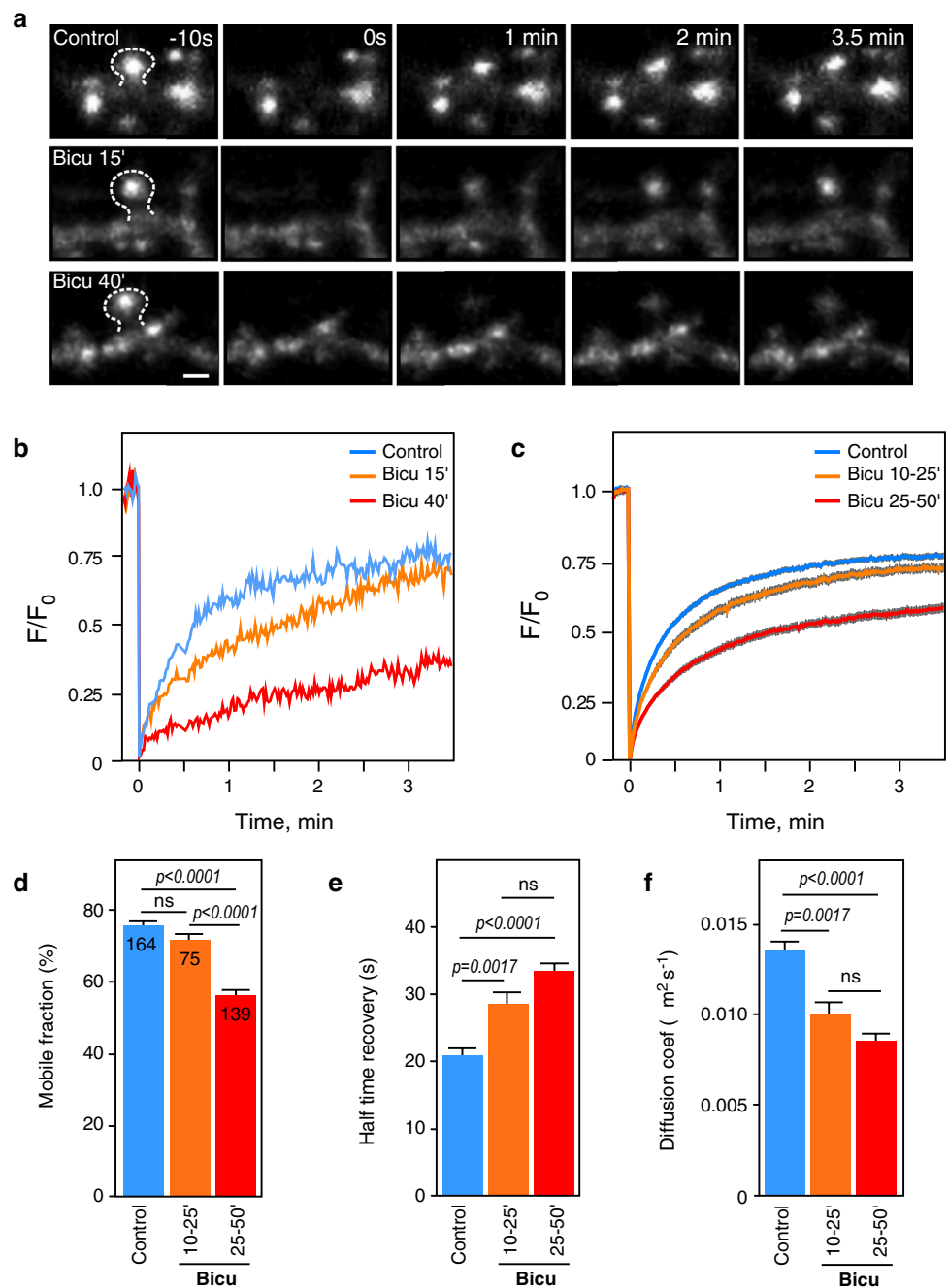
returned to initial levels when bicuculline was exchanged for the control solution indicating that the activity-dependent targeting of GFP-SEN1 into dendritic spines is a fully reversible process (Fig. 1a–c; Supplementary video 1). We also verified that the overall distribution of GFP-SEN1 remained unchanged in basal unstimulated conditions over the time course of these experiments (Fig. 1d, e).

Activity-dependent trapping of SEN1 into spines

The synaptic GFP-SEN1 enrichment measured upon the bicuculline treatment may depend on an increased entry to and/or a decreased exit of GFP-SEN1 from dendritic

spines. To unravel this point, we first measured the diffusion properties of GFP-SEN1 using spine restricted Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP [5]; Fig. 2; Supplementary video 2). To quantitatively measure the synapto-dendritic diffusion of GFP-SEN1, FRAP curves were individually fitted to obtain the values of the mobile fractions and the rates of GFP-SEN1 fluorescence recovery in basal and bicuculline-activated conditions. The mobile fraction refers to the percentage of GFP-SEN1 that moves from the shaft to the bleached spine area over the time course of the experiment. The half-time of recovery refers to the time necessary for the fluorescence to reach the half of the final recovered intensity. In unstimulated basal conditions, we

Fig. 2 SENP1 post-synaptic entry is regulated by synaptic activity in a time-dependent manner. **a** Representative FRAP recordings of GFP-SENP1-expressing spines in control and bicuculline (15 and 40 min of treatment) conditions. Scale bar 1 μm . **b** FRAP curves corresponding to images in **a**. **c** Normalized FRAP curves showing mean values \pm SEM of GFP-SENP1 fluorescence recovery in spines upon control and bicuculline (sustained treatments of 10–25 min and 25–50 min) conditions. **d** Bars represent mobile fraction [ctrl ($74.5 \pm 1.1\%$); bicu 10–25 min ($71.2 \pm 1.7\%$); bicu 25–50 min ($56.2 \pm 1.8\%$)]; **e** half-time recovery [ctrl (20.79 ± 1 s); bicu 10–25 min (28.25 ± 2 s); bicu 25–50 min (33.58 ± 1.6 s)]; **f** diffusion coefficient [ctrl ($0.0135 \pm 0.0007 \mu\text{m}^2/\text{s}$); bicu 10–25 min ($0.010 \pm 0.0008 \mu\text{m}^2/\text{s}$); bicu 25–50 min ($0.0087 \pm 0.0007 \mu\text{m}^2/\text{s}$)] from the number of bleached spines indicated on the bars ($N=5$ independent cultures). Statistics: $T_{1/2}$ and diff. coef. were analyzed by Kruskal–Wallis ANOVA and Fm by parametric ANOVA with Tukey post hoc test. p values are indicated on the bars. *ns* not significant



measured a $\sim 75\%$ recovery of the initial fluorescence, indicating that the majority of the bleached GFP-SENP1 fluorescence was dynamically replaced with non-bleached GFP-SENP1 from the shaft (Fig. 2a, d). Upon a 10- to 25-min of bicuculline treatment, the mobile fraction of GFP-SENP1 remained unchanged ($\sim 71\%$). Conversely, the half-time of GFP-SENP1 fluorescence recovery increased from ~ 21 s in basal conditions (diffusion coefficient: $0.0135 \mu\text{m}^2/\text{s}$) to 28 s upon the 10–25 min bicuculline stimulation (diffusion coefficient: $0.010 \mu\text{m}^2/\text{s}$; Fig. 2e, f). The delayed synapto-dendritic entry of GFP-SENP1 with unchanged mobile fraction

suggests that there is an increase in the synaptic residency time of GFP-SENP1 in bicuculline-activated neurons.

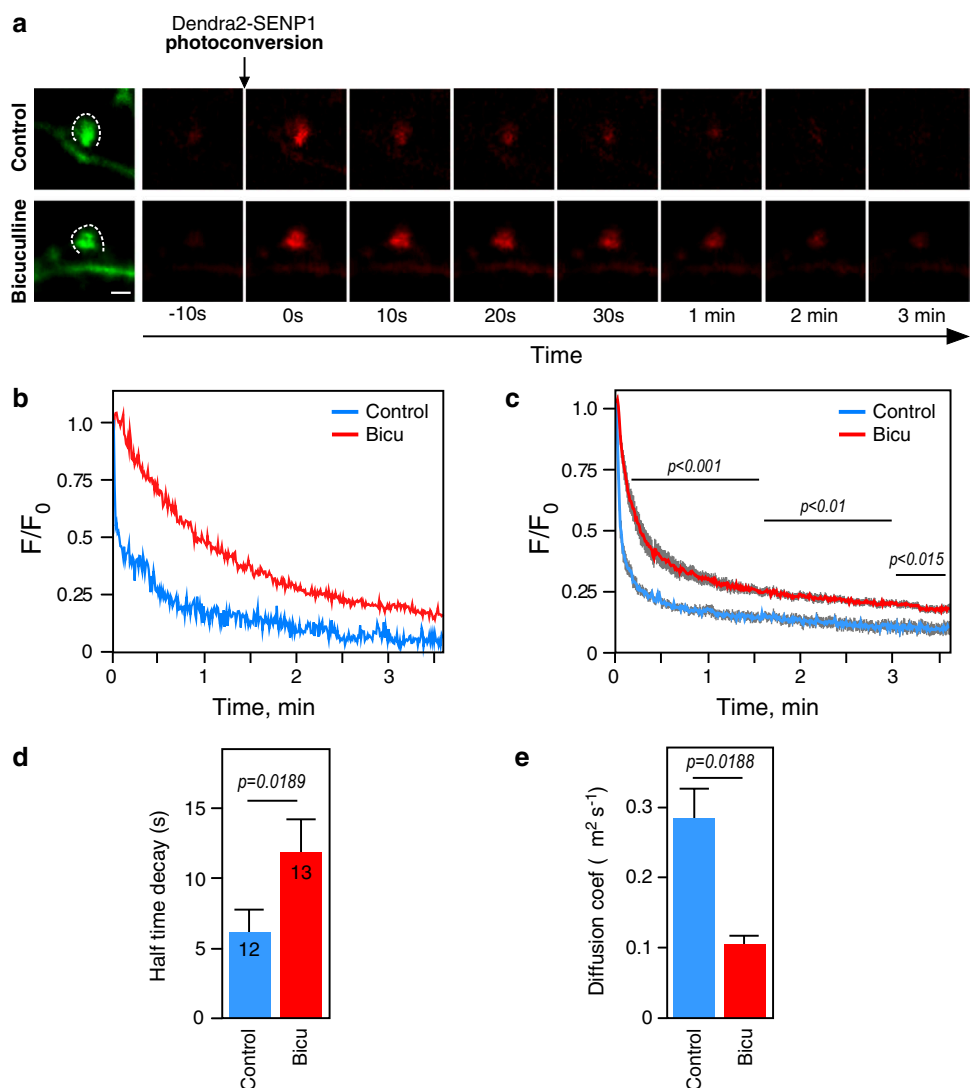
Upon sustained bicuculline stimulation (> 25 min; Supplementary video 2), the synaptic half-time of GFP-SENP1 fluorescence recovery and the resulting diffusion coefficient were not significantly different to the values measured upon shorter bicuculline treatment (Fig. 2e, f) but the mobile fraction of GFP-SENP1 in spines was significantly decreased to $\sim 57\%$ (Fig. 2d). Altogether, our data suggest that the sustained neuronal activation leads to the post-synaptic accumulation of GFP-SENP1, likely due to a reduced

exit of SENP1 from the dendritic spines. Interestingly, this post-synaptic accumulation is independent of the desumoylation activity of SENP1 since its catalytically inactive GFP-SENP1-C603S mutant, which is unable to promote protein desumoylation (Supplementary figure 1g–i), shows activity-dependent diffusion properties similar to the WT form of GFP-SENP1 (Supplementary figure 2). It should be noted that the GFP-SENP1-C603S diffusion coefficient is decreased in unstimulated conditions. This is not surprising since the desumoylation-defective GFP-SENP1-C603S mutant is still able to recognize and bind sumoylated substrates but cannot remove the SUMO moiety from its target proteins. Due to the persisting interaction between GFP-SENP1-C603S and its substrates, an apparent decreased diffusion coefficient is observed (Supplementary figure 2d).

As a complementary approach, we then monitored the exit properties of SENP1 from dendritic spines using a

green-to-red photoswitchable fluorescent Dendra2-tagged version of SENP1 (Dendra2-SENP1; Fig. 3; Supplementary video 3). Using restricted Dendra2 photoconversion time-lapse microscopy [5, 19–21], we measured the diffusion properties of the red photoconverted Dendra2-SENP1 molecules as they exit from dendritic spines in control and bicuculline-treated conditions (Fig. 3). As hypothesized, a sustained bicuculline stimulation led to a significant decrease in the exit rate of the red Dendra2-SENP1 photoconverted fluorescence from spines (control half-time decay, 6.10 ± 1.8 s; Bicuculline, 11.90 ± 2.6 s, mean \pm SEM; Fig. 3d) and in its diffusion coefficient (control, $0.289 \pm 0.065 \mu\text{m}^2/\text{s}$; Bicuculline, $0.105 \pm 0.020 \mu\text{m}^2/\text{s}$, mean \pm SEM; Fig. 3e). These data further confirm that neuronal activation regulates the synapto-dendritic exchange of SENP1 leading to synaptic accumulation of the enzyme by reducing its exit rate from dendritic spines.

Fig. 3 The synaptic exit of SENP1 is regulated by synaptic activity. **a** Representative confocal images of Dendra2-SENP1-expressing rat hippocampal neurons (19 DIV) during a Dendra2 photoconversion experiment in control and bicuculline conditions. Scale bar 1 μm . **b** Fluorescence decay curves showing the decrease in red fluorescence as photoconverted Dendra2-SENP1 molecules exit from spines. The curves correspond to the images in **a**. **c** Normalized fluorescence decay curves are shown as mean values \pm SEM from 12 spines in control and 13 spines in bicuculline (25–50 min) conditions. Statistics: multiple *t* tests. **d** Summary histogram of fluorescence decay curves from **c** showing half-time decay [ctrl (6.1 ± 1.8 s) and bicu (11.9 ± 2.6 s)]. **e** Diffusion coefficient of fluorescence decay [ctrl ($0.289 \pm 0.065 \mu\text{m}^2/\text{s}$) and bicu ($0.105 \pm 0.020 \mu\text{m}^2/\text{s}$)]. *N* = 3 independent cultures. Statistics: Mann–Whitney *t* test. *p* values are indicated

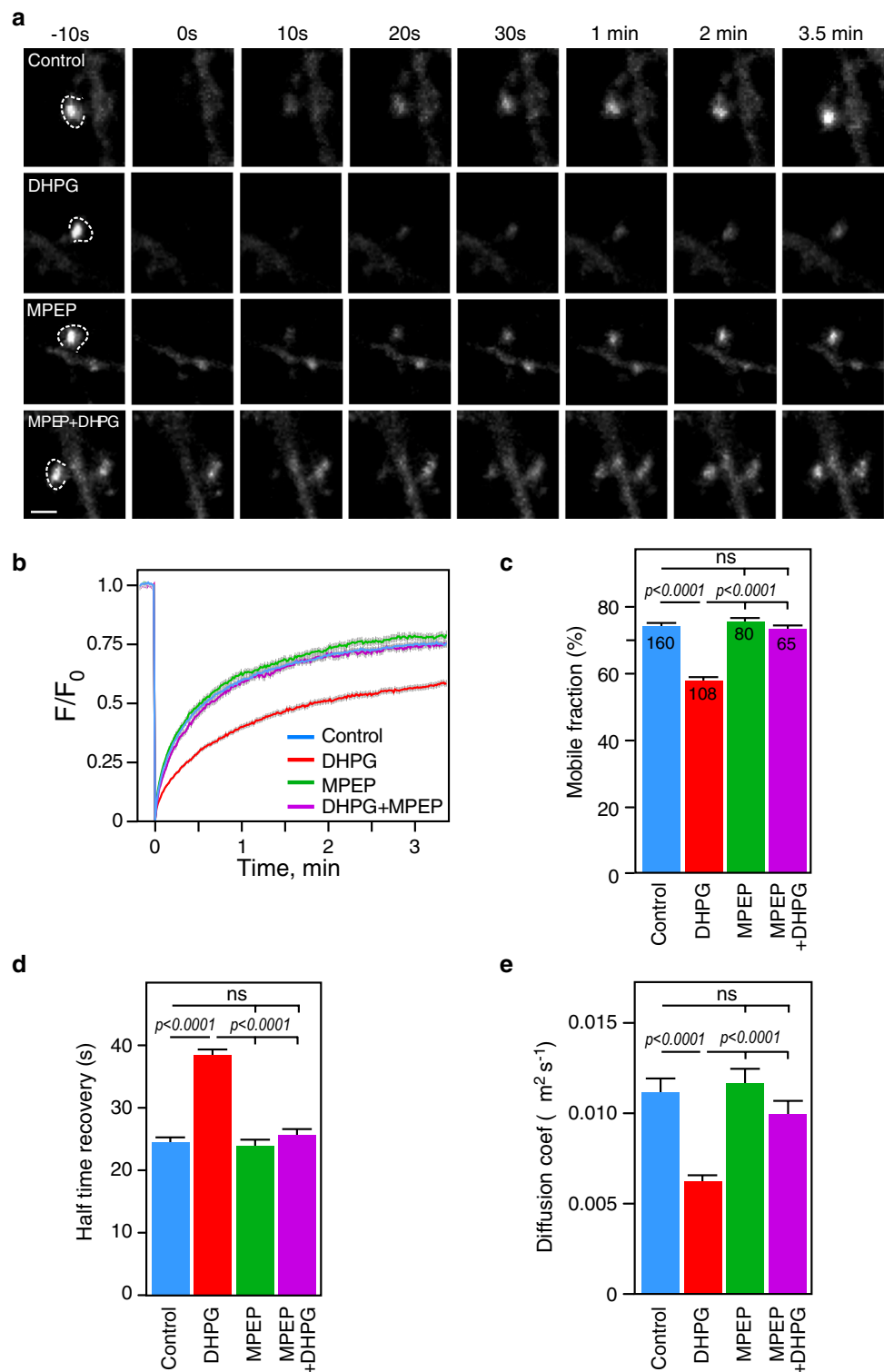


The synaptic retention of SENP1 is regulated by the activation of mGlu5 receptors

We previously demonstrated that the activation of mGlu5 receptors leads to the transient synaptic trapping of the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 [5]. To investigate

whether the activation of mGlu5R also regulates the synaptic diffusion of SENP1, we performed FRAP experiments in the presence of the group 1 mGluR agonist dihydroxyphenylglycine (DHPG; Fig. 4). GFP-SENP1-expressing hippocampal neurons were stimulated with DHPG (50 μ M) and dendritic spines were photobleached at distinct time

Fig. 4 SENP1 synaptic diffusion is mGlu5 dependent. **a** Representative FRAP recordings of WT GFP-SENP1-expressing spines in control, DHPG (25–50 min), MPEP and MPEP+DHPG (25–50 min) conditions. Scale bar 1 μ m. **b** Mean FRAP curves showing values \pm SEM of GFP-SENP1 fluorescence recovery in bleached spines in control, DHPG, MPEP and MPEP+DHPG conditions. **c** Mobile fraction [ctrl ($74.1 \pm 1.12\%$), DHPG ($58.1 \pm 1.46\%$), MPEP ($76.7 \pm 1.63\%$) and MPEP + DHPG ($73.2 \pm 1.44\%$)]; **d** half-time recovery \pm SEM [ctrl (24.27 ± 0.99 s), DHPG (38.16 ± 1.54 s), MPEP (23.6 ± 1.32 s) and MPEP + DHPG (25.33 ± 1.31 s)]; and **e** diffusion coefficient [ctrl ($0.0115 \pm 0.0007 \mu\text{m}^2/\text{s}$), DHPG ($0.0064 \pm 0.0004 \mu\text{m}^2/\text{s}$), MPEP ($0.0118 \pm 0.0012 \mu\text{m}^2/\text{s}$) and MPEP + DHPG ($0.0099 \pm 0.0008 \mu\text{m}^2/\text{s}$)]. Spine numbers are indicated on the bars ($N=3$ independent cultures). Statistics: $T_{1/2}$ and diffusion coefficients were analyzed by Kruskal–Wallis ANOVA test and the mobile fraction by a parametric ANOVA with a Tukey post hoc test. p values are indicated. *ns* not significant



points of the treatment. The mobile fraction of GFP-SENPI decreased from 74 to 58% upon sustained DHPG stimulation (Fig. 4a–c), similar to the values measured in bicuculline-treated conditions (Fig. 2). In addition, the half-time of GFP-SENPI fluorescence recovery upon DHPG stimulation was dramatically increased as observed upon the bicuculline treatment (Fig. 4d; control, 24.27 ± 0.99 s; DHPG, 38.16 ± 1.54 s; mean \pm SEM). This indicates that the activation of mGlu1/5 receptors is essential to regulate the diffusion and trapping of SENPI in dendritic spines. Interestingly, the decrease in GFP-SENPI synaptic diffusion upon DHPG treatment was fully prevented when neurons were pre-incubated with the specific mGlu5R antagonist MPEP (Fig. 4), revealing the specific involvement of mGlu5Rs in the process. Together, these findings demonstrate that the activation of mGlu5Rs is central to the dynamic regulation of SENPI at synapses.

The synaptic level of endogenous SENPI is regulated upon mGlu5R activation

To further confirm the central role of mGlu5R in the homeostatic regulation of synaptic sumoylation, we measured the extent of colocalisation between the endogenous SENPI and the post-synaptic marker PSD95 in basal and DHPG-treated conditions (Fig. 5). Consistent with the live-imaging data (Figs. 1, 2, 3, 4), the extent of SENPI immunoreactivity in PSD95-positive clusters was significantly increased in activated neurons (Fig. 5a, b). We also verified that there were no significant alterations of PSD95 and total SENPI immunoreactivities upon the DHPG treatment (Fig. 5c, d). These findings further support that the mGlu5R activation drives the activity-dependent targeting of SENPI into dendritic spines.

The post-synaptic regulation of protein sumoylation is maintained by SENPI levels

Given the desumoylating activity of SENPI, we finally assessed whether the post-synaptic enrichment of endogenous SENPI upon sustained mGlu5R activation could regulate the synaptic levels of protein sumoylation (Fig. 6). We thus purified Triton X-insoluble post-synaptic density fractions (TiF [22, 23]; Fig. 6a, b) from control and DHPG-treated rat cortical-cultured neurons. TiF fractions were specifically enriched in post-synaptic proteins such as PSD95 and Homer1, and importantly, depleted in the nuclear protein NOPP140, showing the absence of nuclear contaminants (Fig. 6b).

Interestingly, the DHPG treatment led to a significant increase in the endogenous levels of SENPI in TiF (Fig. 6c, d), further confirming the activity-dependent targeting of the enzyme to post-synaptic compartments. In line with

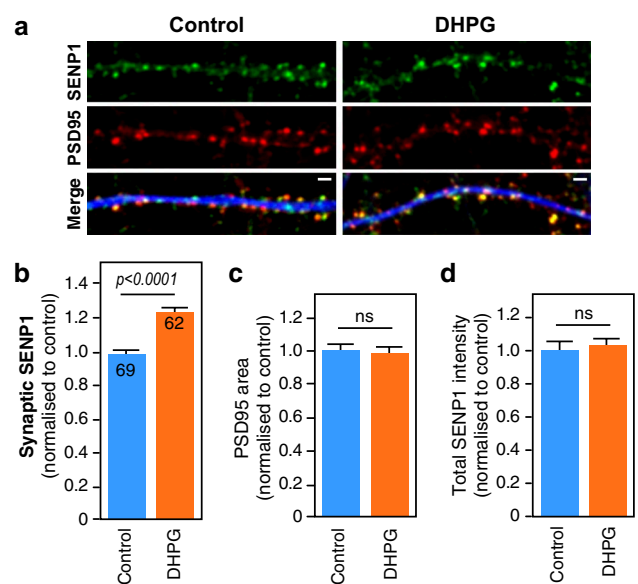


Fig. 5 Activity-dependent targeting of endogenous SENPI to spines. **a** Immunolabelling of fixed primary hippocampal neurons for SENPI and PSD95 in control and DHPG (40 min) conditions. Scale bar 1 μ m. **b** Quantitative representation \pm SEM of control-normalized fluorescence intensity of SENPI within PSD-95 area [ctrl (1 ± 0.026), DHPG (1.236 ± 0.032)]; **c** size of PSD-95 area [ctrl (1 ± 0.045), DHPG (0.933 ± 0.052)]; **d** total SENPI staining [ctrl (1 ± 0.064), DHPG (1.053 ± 0.058)] from three independent cultures with at least six neurons/condition/culture. The number of secondary dendrites is indicated on the bars. Statistics: one-way ANOVA with a Tukey post hoc test. *ns* not significant

our previous work [5], the synaptic levels of SUMO1-modified proteins were increased upon a 10-min mGlu5R activation, and this increase was prevented in the presence of the mGlu5R antagonist MPEP (Fig. 6e, f). By contrast, the post-synaptic enrichment of SENPI upon sustained DHPG stimulation (Fig. 6c, d) restored synaptic sumoylation to initial levels (Fig. 6e, f). These results strongly support the mGlu5R-driven homeostatic regulation of synaptic sumoylation.

Discussion

The synaptic targeting of several cytosolic enzymes important for the synaptic function is controlled by neuronal activity [5, 15, 24, 25]. Here, we uncover a novel regulatory pathway involved in the targeting of the desumoylation enzyme SENPI to post-synaptic sites. We demonstrate that the sustained activation of mGlu5Rs leads to the enrichment of SENPI in dendritic spines. In particular, we show that the activity-dependent accumulation of SENPI is due to a decreased exit rate of SENPI from spines. The direct consequence of such a post-synaptic enrichment of SENPI is the restoration of basal sumoylation levels (Fig. 7).

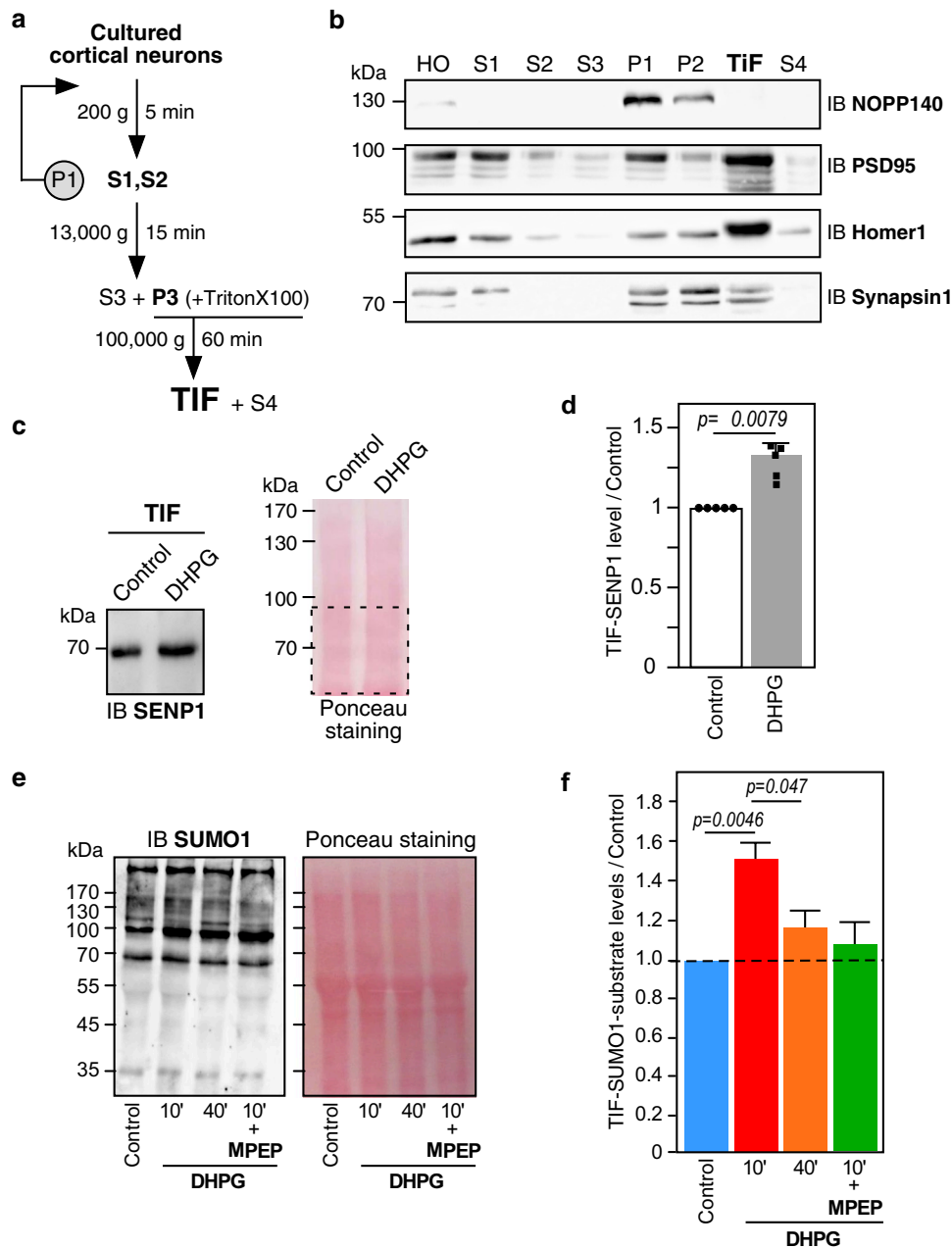


Fig. 6 Sustained mGlu5R activation triggers the synaptic trapping of SENP1 and the regulation of sumoylation in PSD fractions. **a** Step-by-step scheme of TiF (TritonX100-insoluble fraction) isolation. **b** Immunoblot analysis of the different TiF purification steps with specific markers for the nucleus (NOPP140), post-synaptic compartments (PSD-95 and Homer1) and presynaptic terminals (synapsin1a/b). Lane labels were as follows: total homogenate (HO), supernatants 1–4 (S1–4), pellets 1 and 2 (P1–2), Triton-X100 insoluble Fraction (TiF). Each lane was loaded with 10 μ g of proteins. **c** Representative SENP1 immunoblot performed on TiF from control and 40-min DHPG-treated cortical neurons (19 DIV). 15 μ g of protein was loaded per lane. Ponceau S staining was used as a loading/

normalization control. **d** Mean histogram \pm SEM of SENP1 levels in TiF [DHPG (1.31 ± 0.07) vs control] obtained from five independent experiments. Statistics: Mann–Whitney t test. p value is indicated on the bars. **e** Representative SUMO1 immunoblot of TiF proteins purified from control and 10' or 40' DHPG-treated cortical neurons (19 DIV). Ponceau S staining was used as a loading/normalization control. **f** Summary histogram shows the mean \pm SEM of SUMO1-modified proteins [DHPG 10' (1.51 ± 0.087); DHPG 40' (1.18 ± 0.11)]. Statistics: one-way ANOVA with a Tukey post hoc test. p value is indicated on the bars. Control experiments at 10 min using DHPG in the presence of the mGlu5R specific antagonist MPEP prevented sumoylation of TiF proteins [DHPG+MPEP 10' (1.08 ± 0.12)]

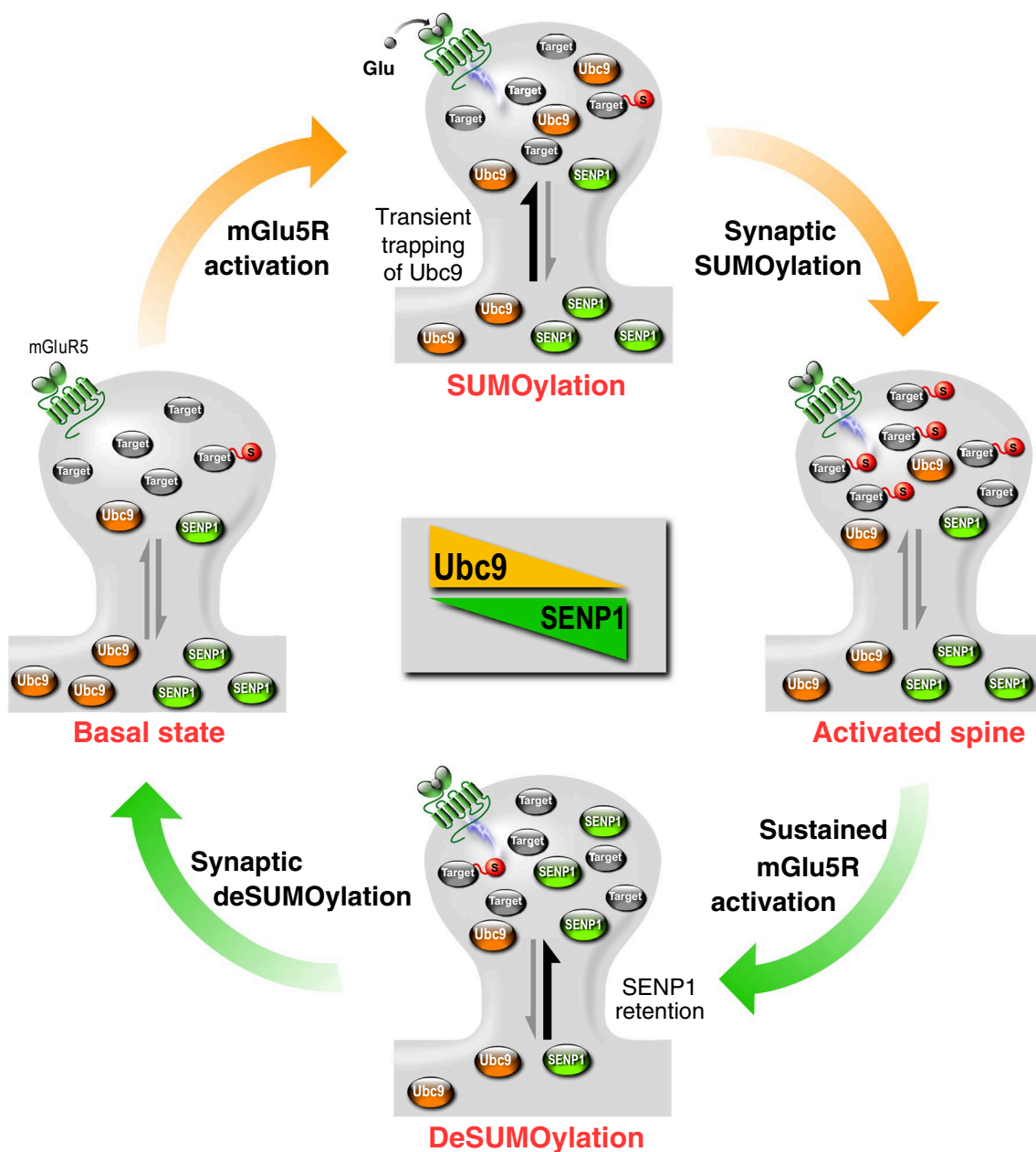


Fig. 7 Schematic model of the synaptic regulation of the sumoylation/desumoylation balance

Interestingly, we previously reported that Ubc9 is also recruited to spines upon mGlu5R activation [5]. Although Ubc9 and SENP1 are both targeted to spines in an mGlu5R-dependent manner, their regulations occur on very different timescales. A short mGlu5R activation is sufficient to transiently trap Ubc9 at the post-synapse, resulting in a rapid increase in the overall synaptic sumoylation and changes of neuronal excitability [5]. Conversely, the post-synaptic accumulation of SENP1 requires a sustained activation of mGlu5R, leading to a decrease in synaptic sumoylation. Thus, our data reveal that sumoylation and desumoylation

occur sequentially to balance synaptic sumoylation levels. First, the activation of mGlu5Rs triggers an increase in synaptic sumoylation, and then an increased desumoylation activity follows to restore the initial levels of protein sumoylation (Fig. 7). Altogether, our findings provide novel insights into the regulatory mechanisms and dynamics driving the homeostasis of protein sumoylation at the mammalian synapse.

Given that both the sumoylation and desumoylation processes are controlled by the activation of mGlu5Rs, although on different timescales, it is likely that other

post-translational modifications also play a role in the spatiotemporal regulation of synaptic function. For instance, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) phosphorylates many synaptic proteins essential to synaptic communication and plasticity. Importantly, the targeting of CaMKII to dendritic spines is also triggered by synaptic activity [24] but, this targeting is rather linked to the activation of an NMDA receptor-mediated pathway involving calcium mobilization and microtubule dynamics [25]. However, whether the activity-dependent targeting of CaMKII to dendritic spines of excitatory neurons is additionally regulated by the activation of mGlu5R remains unexplored.

Our initial work also revealed that the phosphorylation of synaptic proteins is a prerequisite to maintain the sumoylation/desumoylation equilibrium at synapses [5]. We reported that the protein kinase C (PKC)-dependent phosphorylation of the synaptic protein content is required for the transient trapping of Ubc9 and the subsequent increase in synaptic sumoylation. Interestingly, PKC is also a target of the sumoylation system and its SENP1-mediated desumoylation has been reported to inhibit its kinase activity [26]. Moreover, SENP1 has been suggested as a potential phosphorylation substrate based on high predictive values [27]. It was also reported that SENP3, a paralog of SENP1, is phosphorylated in HeLa cells [28], resulting in the suppression of its desumoylation activity [29]. Thus, the direct phosphorylation of SENP1 may have a dual role. Its phosphorylation may inhibit its desumoylase activity, allowing the rapid increase in synaptic sumoylation, and/or act as a synaptic retention cue leading to the accumulation of SENP1 upon mGlu5R activation. Nevertheless, the activity-dependent regulation of the SENP1 dynamics and desumoylase activity by phosphorylation remains to be elucidated. Together, this suggests a potential interplay between these two post-translational systems for the spatiotemporal control of the sumoylation/desumoylation equilibrium at synapses.

Despite the recent advances in the field of neuronal sumoylation, a better understanding of the regulatory mechanisms driving the equilibrium between sumoylation and desumoylation at synapses is essential since its deregulation may have important implications in neurological disorders, especially those involving mitochondrial alteration. Indeed, SENP distribution and activity are clearly linked to mitochondria, which are inherent components of the mammalian synapses. For instance, it has been shown that preventing SENP2-driven desumoylation of dynamin-related protein 1 (Drp1) in neurons leads to increased levels of sumoylated Drp1 and to the deregulation of mitochondrial fission [30]. The direct consequence of the SENP2 deficiency in mice is an early post-natal neurodegeneration, followed by the paralysis and premature death of the animals. Furthermore, SENP3-driven desumoylation of Drp1 has been reported to promote the targeting of Drp1 to mitochondria, which in

turn, is essential to protect the neurons from death during cell reoxygenation after ischemia [31]. To date, however, the role of SENP1 in neuronal and synaptic mitochondria is still poorly understood.

The current work also raises intriguing questions as to whether a deregulated mGlu5R-signaling impairs the sumoylation/desumoylation equilibrium. Since mGlu5Rs contribute to essential synaptic functions as well as in the etiology of several neurological disorders, including schizophrenia, Fragile X syndrome and chronic pain [32], it is likely that alterations of the mGlu5R-signaling pathway in such pathological conditions could alter both the Ubc9-induced synaptic sumoylation and the post-synaptic targeting and desumoylation activity of SENP1. Consequently, the synaptic levels of protein sumoylation could be dramatically unbalanced, resulting in alterations in synaptic transmission and/or plasticity. Future work will now have to assess whether the synaptic enrichment of SENP1 enzymes upon sustained synaptic activation, as in epilepsy or stroke, evokes protective or detrimental effects to the brain.

It is well accepted that the sumoylation process is a key pathway in the regulation of the synaptic function [2, 3]. However, the repertoire of identified SUMO substrates at synapses is still very limited since very few of them have been reported so far. Nevertheless, the recent technical advances in mass spectrometry and proteomic analyses will soon allow the identification of sumoylated proteins from synapses. This would be of great interest to the neuroscience field to further assess the role of sumoylation in synaptic function and unravel potential alterations in synaptic transmission and plasticity that may be linked to an impaired sumoylation/desumoylation balance.

Materials and methods

Constructs

GFP-tagged full length WT human SENP1 in pEGFP-C2 is a generous gift from Dr Wang Min [33]. GFP-SENP1-C603S mutant construct was made by site-directed mutagenesis using Quick-change mutagenesis (Agilent). The constructs were entirely sequenced.

Rat strain

Wistar rats were exclusively from a commercial source (Janvier, St Berthevin, France). All animals were handled and treated in accordance with the European Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory animals in our facility. Animals had free access to water and food. Lighting was controlled as a 12-h light and dark cycle and the temperature maintained at 23 ± 1 °C. Protocol to prepare primary

neuronal cultures from rat embryos at E17 was approved by our local Animal Care and Ethics Committee (Comité Institutionnel d'Ethique Pour l'Animal de Laboratoire No 28, Nice, France; Project reference NCE/2012-63).

Cell culture

Hippocampal neurons were prepared from E17 pregnant rats as previously described [5, 21]. Briefly, neurons were plated in Neurobasal medium (Invitrogen, France) supplemented with 2% B27 (Invitrogen), 0.5 mM glutamine and penicillin/streptomycin (Ozyme) on 100-mm dishes or 24-mm glass coverslips (VWR) pre-coated with poly-L-lysine (0.5 mg/mL; Sigma). Neurons (3.10^6 cells per 100-mm dish or 110,000 cells per coverslip) were then fed once a week with Neurobasal medium supplemented with 2% B27 and penicillin/streptomycin for a maximum of 3 weeks.

Cell transfection

Mycoplasma-free COS7 cells (ATCC reference CRL-1651, Molsheim, France) were transfected with the indicated constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and used 48–72 h post-transfection.

Sindbis virus production and neuronal transduction

Attenuated Sindbis viral particles [SINrep(nsP2S726)] were prepared and used as previously described [7, 34, 35]. Briefly, cRNAs were generated from the pSinRep5 plasmid containing the sequence coding for the indicated GFP-SENPI constructs and from the defective helper (pDH-BB) plasmid using the Mmessage Mmachine SP6 solution (Ambion). cRNAs were then electroporated into BHK21 cells. Pseudovirions present in the culture medium were harvested 72 h after electroporation and concentrated using ultracentrifugation on SW41Ti. Aliquots of resuspended Sindbis particles were then stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Neurons were transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1–1 and returned to the incubator at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ under 5% CO_2 for 18 to 24 h until use.

Immunocytochemistry

Hippocampal neurons (19 DIV) treated or not for 40 min with 50 μM DHPG or 10 μM Bicuculline at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ were fixed with methanol for 20 min at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and washed three times 5 min in PBS. Cells were then permeabilized for 1 h in PBS containing 0.2% Triton X-100, 0.2% of BSA and 5% horse serum (HS) at RT. Neurons were stained with a rabbit anti-SENPI (1/200; Sigma-Aldrich), a mouse anti-PSD95 (1/500; Neuromab) and a guinea pig anti-MAP2 (1/1000; Synaptic System) overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in PBS containing 0.2%

Triton X-100, 0.2% of BSA. Cells were washed three times in PBS and incubated with the appropriate secondary antibodies conjugated to Alexa488, Alexa594 or Alexa 647 as indicated and mounted with Mowiol (Sigma). Confocal images (1024×1024 pixels) were acquired with a $63 \times$ oil-immersion lens (Numerical Aperture NA 1.4) on a confocal LSM780 microscope (Zeiss, Germany). Z-series of five images of randomly selected dendrites were compressed into two dimensions using the maximum projection algorithm of the Zeiss software. Quantification was performed using the ImageJ software and the synaptic enzymatic staining was measured with the use of an in-house ImageJ macro [5]. Briefly, confocal image of the synaptic marker was used to produce a mask after an automated intensity threshold. Masks were then applied to the corresponding images and the fluorescence intensity within the synaptic area was measured.

Live-cell imaging

Protocols were performed as previously described [5, 7, 21]. Briefly, live GFP-SENPI expressing neurons were kept on a heated stage (set at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) on a Nikon Ti inverted microscope. GFP fluorescence was excited through a $60 \times$ oil-immersion lens (Numerical Aperture, 1.4) using a 488-nm laser light (50 mW, 3%) and time series (15 Hz) were collected for 210 s as a single image slice using a Perkin Elmer Ultra-View spinning disk microscope.

Neurons were treated or not with 10 μM bicuculline or 50 μM DHPG in Earle's buffer (25 mM HEPES-Tris, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgCl_2 , 0.9 g/L glucose) for 10–40 min in Earle's buffer. A 10 min preincubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ was applied when specific inhibitors were used. Pharmacological drugs (30 μM MPEP, 10 μM bicuculline or 50 μM DHPG) were all diluted in Earle's buffer.

FRAP measurements

Fluorescence intensity variations in spines were analyzed using the FRAP module of the Volocity 6.3 software. Fluorescence recovery curve in FRAP allows the direct determination of two parameters. First the difference between the basal level of fluorescence and the recovered plateau level after photobleaching reflects the immobile fraction of a protein and conversely the mobile diffusible fraction. Immobile fractions reflect the direct or indirect binding of a protein of interest to cytoskeleton constituents. Second, the half-time of recovery specifies the mobility of the diffusible fraction of a protein of interest. Fluorescence data were collected from regions of interest expressing GFP-SENPI. FRAP data were expressed as a percentage of initial fluorescence (average fluorescence value

from the ten second imaging period immediately before photobleaching) over time and fitted with a single-phase exponential function ($f(t) = y + A e^{-kt}$) using the Volocity 6.3 software from Perkin Elmer. Mobile fraction (in %), half-time of recovery (in seconds) and diffusion coefficient (in $\mu\text{m}^2/\text{s}$; $D = \text{photobleached spine area}/4t_{1/2}$) values were extracted for each experiment using the FRAP module of the Volocity 6.3 software. Curves were fitted using a one phase exponential association and data statistically analyzed with Prism 7 (GraphPad, Inc).

Dendra2-SENP1 photoconversion measurements [21]

The GFP tag from the GFP-SENP1 construct was exchanged for the photoswitchable Dendra2 protein [19, 20] (Evrogen JSC, Russia). Individual Dendra2-SENP1-expressing spines were photoconverted for 30 ms using a 405 nm laser light (50 mW, 18%). The red photoconverted Dendra2-SENP1 was excited using a 561-nm laser light (50 mW, 20%) and time series (10 Hz) were collected for 210 s as a single image slice using a Perkin Elmer Ultra-View spinning disk microscope. The decrease in red fluorescence from Dendra2-SENP1 photoconverted spines was measured over time using the Volocity 6.3 software and data expressed as a percentage of the initial red photoconverted fluorescence (F/F_0).

Triton X-insoluble fraction (TiF) isolation

TiF were prepared according to established protocols [22, 23] using 18–20 DIV rat cortical neurons ($5 \times 100\text{-mm}$ dishes per condition with 2.5×10^6 cells) treated for 40 min in control, bicuculline (10 μM) or DHPG (50 μM) containing Earle's buffer solution. Neurons were immediately cooled down on ice and homogenized in ice-cold sucrose buffer (1 mM HEPES, pH 7.4, 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM NaHCO_3 , mammalian protease inhibitors (Roche) and 20 mM NEM (Sigma-Aldrich) to protect proteins from desumoylation). Nuclear proteins were removed from the synaptosomal preparation by centrifugation at 500g for 5 min. Post-nuclear fractions were further centrifuged at 13,000g for 15 min to isolate crude synaptosomal fractions. The crude fractions were then resuspended in lysis buffer (75 mM KCl, 1% Triton X-100, 20 mM NEM). TiF were finally purified by centrifugation at 100,000g for 1 h and resuspended in urea-containing lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol and 8 M urea).

Protein concentrations were determined (BioRad) and samples were boiled in Laemmli buffer for 10 min.

Immunoblotting

Transfected COS7 cells and primary neurons were homogenized in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) in the presence of a mammalian protease inhibitor tablet (Roche), proteasome inhibitor MG132 (20 μM) and 20 mM NEM. Protein extracts were resolved by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with the following primary antibodies: mouse anti-SUMO1 (clone 21C7, DSHB) 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$; rabbit anti-SENP1 1/250 (Sigma Prestige); mouse anti-GFP 1/1000 (Roche, Germany); mouse anti-PSD95 1/10000 (NeuroMab); mouse anti-Homer1 1/1000 (Synaptic System); mouse anti-Synapsin Ia/b 1/1000 (Santa-Cruz); mouse anti-NOP140 1/700 (Santa-Cruz); standard loading controls were included using a mouse anti- β -actin antibody 1/1000 (Sigma) or a rabbit anti-tubulin 1/10000 (Synaptic System) as indicated. Full-size blots for cropped gels can be found in Supplementary figure 3.

Statistical analysis

Statistical analyses were calculated using GraphPad Prism 7 (GraphPad software, Inc). Data were expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA was performed with the indicated post-test for multiple comparison data sets. All data were tested for normal distribution. $*p < 0.05$ was considered significant.

Acknowledgements We thank Dr Wang Min for sharing the GFP-SENP1 construct. We gratefully acknowledge the 'Agence Nationale de la Recherche (Fr)' (ANR-15-CE16-0015-01) and the Bettencourt-Schueller foundation for financial support. We also thank the French Government for the 'Investments for the Future' Laboratory of Excellence 'SIGNALIFE' (ANR-11-LABX-0028-01) and the 'Conseil Régional Provence-Alpes-Côte d'Azur' for the 'Microscopy and Imaging Côte d'Azur' platform funding. LS and MPri are fellows from the international Ph.D. 'SIGNALIFE' program.

Author contributions LS and MP performed all the live-imaging experiments. LS, MP and AK performed biochemical experiments. GP and MPri prepared viral particles. AF, MP and LS performed the immunocytochemistry. LS, MP, AF and GP prepared neuronal cultures. FC performed initial FRAP experiments. FBr provided computational tools to analyze imaging data. LS, MP, CG and SM contributed to hypothesis development, experimental design and data interpretation. SM provided the overall supervision, the funding and wrote the original draft. All authors discussed the data and commented on the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no competing financial interests.

References

- Mabb AM, Ehlers MD (2010) Ubiquitination in postsynaptic function and plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:179–210
- Schorova L, Martin S (2016) Sumoylation in synaptic function and dysfunction. *Front Synaptic Neurosci* 8:9
- Henley JM, Carmichael RE, Wilkinson KA (2018) Extranuclear SUMOylation in neurons. *Trends Neurosci* 41(4):198–210
- Girach F, Craig TJ, Rocca DL, Henley JM (2013) RIM1alpha SUMOylation is required for fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell Rep* 5(5):1294–1301
- Loriol C, Casse F, Khayachi A, Poupon G, Chafai M, Deval E, Gwizdek C, Martin S (2014) mGlu5 receptors regulate synaptic sumoylation via a transient PKC-dependent diffusional trapping of Ubc9 into spines. *Nat Commun* 5:5113
- Craig TJ, Anderson D, Evans AJ, Girach F, Henley JM (2015) SUMOylation of Syntaxin1A regulates presynaptic endocytosis. *Sci Rep* 5:17669
- Khayachi A, Gwizdek C, Poupon G, Alcor D, Chafai M, Casse F, Maurin T, Prieto M, Folci A, De Graeve F, Castagnola S, Gautier R, Schorova L, Loriol C, Pronot M, Besse F, Brau F, Deval E, Bardoni B, Martin S (2018) Sumoylation regulates FMRP-mediated dendritic spine elimination and maturation. *Nat Commun* 9(1):757
- Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM (2007) SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* 447(7142):321–325
- Craig TJ, Jaafari N, Petrovic MM, Rubin PP, Mellor JR, Henley JM (2012) Homeostatic synaptic scaling is regulated by protein SUMOylation. *J Biol Chem* 287(27):22781–22788
- Chamberlain SE, Gonzalez-Gonzalez IM, Wilkinson KA, Konopacki FA, Kantamneni S, Henley JM, Mellor JR (2012) SUMOylation and phosphorylation of GluK2 regulate kainate receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 15(6):845–852
- Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135(6):1457–1470
- Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88(1):97–107
- Nayak A, Muller S (2014) SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. *Genome Biol* 15(7):422
- Loriol C, Parisot J, Poupon G, Gwizdek C, Martin S (2012) Developmental regulation and spatiotemporal redistribution of the sumoylation machinery in the rat central nervous system. *PLoS One* 7(3):e33757
- Loriol C, Khayachi A, Poupon G, Gwizdek C, Martin S (2013) Activity-dependent regulation of the sumoylation machinery in rat hippocampal neurons. *Biol Cell* 105(1):30–45
- Kerscher O (2007) SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* 8(6):550–555
- Meulmeester E, Melchior F (2008) Cell biology: SUMO. *Nature* 452(7188):709–711
- Hickey CM, Wilson NR, Hochstrasser M (2012) Function and regulation of SUMO proteases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(12):755–766
- Gurskaya NG, Verkhusha VV, Shcheglov AS, Staroverov DB, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Lukyanov S, Lukyanov KA (2006) Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat Biotechnol* 24(4):461–465
- Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA (2007) Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *Biotechniques* 42(5):553–557
- Casse F, Martin S (2015) Tracking the activity-dependent diffusion of synaptic proteins using restricted photoconversion of Dendra2. *Front Cell Neurosci* 9:367
- Gardoni F, Mauceri D, Malinverno M, Polli F, Costa C, Tozzi A, Siliquini S, Picconi B, Cattabeni F, Calabresi P, Di Luca M (2009) Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci* 29(3):669–677
- Gardoni F, Pagliardini S, Setola V, Bassanini S, Cattabeni F, Battaglia G, Di Luca M (2003) The NMDA receptor complex is altered in an animal model of human cerebral heterotopia. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(6):662–675
- Thalhammer A, Rudhard Y, Tigaret CM, Volynski KE, Rusakov DA, Schoepfer R (2006) CaMKII translocation requires local NMDA receptor-mediated Ca²⁺ signaling. *EMBO J* 25(24):5873–5883
- Lemieux M, Labrecque S, Tardif C, Labrie-Dion E, Lebel E, De Koninck P (2012) Translocation of CaMKII to dendritic microtubules supports the plasticity of local synapses. *J Cell Biol* 198(6):1055–1073
- Sun H, Lu L, Zuo Y, Wang Y, Jiao Y, Zeng WZ, Huang C, Zhu MX, Zamponi GW, Zhou T, Xu TL, Cheng J, Li Y (2014) Kainate receptor activation induces glycine receptor endocytosis through PKC deSUMOylation. *Nat Commun* 5:4980
- Bailey D, O'Hare P (2004) Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J Biol Chem* 279(1):692–703
- Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(31):10762–10767
- Wei B, Huang C, Liu B, Wang Y, Xia N, Fan Q, Chen GQ, Cheng J (2018) Mitotic phosphorylation of SENP3 regulates DeSUMOylation of chromosome-associated proteins and chromosome stability. *Cancer Res* 78(9):2171–2178
- Fu J, Yu HM, Chiu SY, Mirando AJ, Maruyama EO, Cheng JG, Hsu W (2014) Disruption of SUMO-specific protease 2 induces mitochondria mediated neurodegeneration. *PLoS Genet* 10(10):e1004579
- Guo C, Hildick KL, Luo J, Dearden L, Wilkinson KA, Henley JM (2013) SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. *EMBO J* 32(11):1514–1528
- Wang H, Zhuo M (2012) Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene transcription and implications for synaptic plasticity and diseases. *Front Pharmacol* 3:189
- Li X, Luo Y, Yu L, Lin Y, Luo D, Zhang H, He Y, Kim YO, Kim Y, Tang S, Min W (2008) SENP1 mediates TNF-induced desumoylation and cytoplasmic translocation of HIPK1 to enhance ASK1-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 15(4):739–750
- Xiong H, Casse F, Zhou Y, Zhou M, Xiong ZQ, Joels M, Martin S, Krugers HJ (2015) mTOR is essential for corticosteroid effects on hippocampal AMPA receptor function and fear memory. *Learn Mem* 22(12):577–583
- Xiong H, Casse F, Zhou M, Xiong ZQ, Joels M, Martin S, Krugers HJ (2016) Interactions between *N*-ethylmaleimide-sensitive factor and GluA2 contribute to effects of glucocorticoid hormones on AMPA receptor function in the rodent hippocampus. *Hippocampus* 26(7):848–856

Annexe 3

Abnormal AMPAR-mediated synaptic plasticity, cognitive and autistic-like behaviors in a missense Fmr1 mutant mouse model of Fragile X syndrome

(Publié dans Nature Communications, Mars 2021)

Prieto M^{1#}, Folci A^{1#}, Poupon G¹, Schiavi S⁵, Buzzelli V⁵, **Pronot M¹**, François U³, Pousinha P¹, Lattuada N⁴, Abélanet S¹, , Castagnola S¹, Chafai M¹, Khayachi A¹, Brau F¹, Deval E¹, Francolini M⁴, Bardoni B², Humeau Y³, Trezza V⁵ & Martin S².

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, France.

² Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France.

³ University of Bordeaux, CNRS, IINS, Bordeaux, France.





⁴ University of Milano, Dept of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Milano, Italy. ⁵ Università RomaTre, Dep. Sciences, Roma, Italy.

Equal contribution

Ce projet a visé à étudier les conséquences physiopathologiques d'une mutation faux-sens de *FMR1*. Le SXF est la forme héréditaire la plus fréquente de la DI et la cause monogénique de l'autisme la mieux décrite. Cette maladie génétique est généralement causée par une expansion pathologique du triplet CGG dans le 5'UTR (>200) du gène *FMR1* qui conduit à sa non-transcription. La protéine FMRP n'est donc pas exprimée, ce qui entraîne des défauts synaptiques à l'origine des altérations neurologiques chez les patients atteints de SXF. Plusieurs mutations dites faux-sens de *FMR1* ont été identifiées chez des patients SXF. Parmi elles, la mutation R138Q a été décrite chez trois individus non apparentés. En utilisant un nouveau modèle de souris knock-in exprimant la mutation FMRP-R138Q (R138Q-KI), nous démontrons que la mutation entraîne des modifications de l'ultrastructure de la post-synapse et entraîne une augmentation de la densité des épines dans l'hippocampe des souris KI. Nous démontrons également que l'expression de surface des rAMPAs synaptique est augmentée dans l'hippocampe des souris KI. Nous montrons enfin que la mutation R138Q altère la LTP dans l'hippocampe, entraînant ainsi des déficits socio-cognitifs chez les souris KI adolescentes. Dans l'ensemble, nos résultats révèlent que la mutation FMRP-R138Q a un impact important sur la fonction synaptique et mettent en évidence les mécanismes potentiels par lesquels cette mutation provoque le SXF.

Lors de ce projet, j'ai aidé à la préparation des cultures primaires de neurones de souris. Lors du processus de révision, j'ai réalisé des expériences de biochimie, des expériences de biotinylation et réticulation de surface ainsi que d'immunocytochimie demandées par les reviewers.

Missense mutation of *Fmr1* results in impaired AMPAR-mediated plasticity and socio-cognitive deficits in mice

Marta Prieto^{1,6}, Alessandra Folci^{1,6}, Gwénola Poupon¹, Sara Schiavi², Valeria Buzzelli², Marie Pronot¹, Urielle François ³, Paula Pousinha¹, Norma Lattuada⁴, Sophie Abelanet¹, Sara Castagnola¹, Magda Chafai¹, Anouar Khayachi¹, Carole Gwizdek¹, Frédéric Brau¹, Emmanuel Deval¹, Maura Francolini⁴, Barbara Bardoni ⁵, Yann Humeau ³, Viviana Trezza² & Stéphane Martin ⁵✉

Fragile X syndrome (FXS) is the most frequent form of inherited intellectual disability and the best-described monogenic cause of autism. CGG-repeat expansion in the *FMR1* gene leads to *FMR1* silencing, loss-of-expression of the Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP), and is a common cause of FXS. Missense mutations in the *FMR1* gene were also identified in FXS patients, including the recurrent FMRP-R138Q mutation. To investigate the mechanisms underlying FXS caused by this mutation, we generated a knock-in mouse model (*Fmr1*^{R138Q}) expressing the FMRP-R138Q protein. We demonstrate that, in the hippocampus of the *Fmr1*^{R138Q} mice, neurons show an increased spine density associated with synaptic ultra-structural defects and increased AMPA receptor-surface expression. Combining biochemical assays, high-resolution imaging, electrophysiological recordings, and behavioural testing, we also show that the R138Q mutation results in impaired hippocampal long-term potentiation and socio-cognitive deficits in mice. These findings reveal the functional impact of the FMRP-R138Q mutation in a mouse model of FXS.

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, Valbonne, France. ² RomaTre University, Dept. Science, Rome, Italy. ³ University of Bordeaux, CNRS, IINS, Bordeaux, France. ⁴ Università degli Studi di Milano, Dept. of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Milan, Italy. ⁵ Université Côte d'Azur, Inserm, CNRS, IPMC, Valbonne, France. ⁶ These authors contributed equally: Marta Prieto, Alessandra Folci. ✉email: martin@ipmc.cnrs.fr

The formation of functional synapses in the developing brain is fundamental to establishing efficient neuronal communication and plasticity, which underlie cognitive processes. In the past years, synaptic dysfunction has clearly emerged as a critical factor in the etiology of neurodevelopmental disorders including Autism Spectrum disorder (ASD) and Intellectual Disability (ID). X-linked ID (XLID) accounts for 5–10% of ID patients and is caused by mutations in genes located on the X chromosome. The Fragile X Syndrome (FXS) is the most frequent form of inherited XLID and the first monogenic cause of ASD with a prevalence of 1:4000 males and 1:7000 females¹. The majority of FXS patients exhibit mild-to-severe ID associated with significant learning and memory impairments, Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), and autistic-like features^{2–4}. To date, no effective therapeutic strategies are available.

FXS generally results from a massive expansion of the trinucleotide CGG (> 200 repeats) in the 5'-UTR region of the *FMR1* gene leading to its transcriptional silencing and consequently, the lack of expression of the encoded Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)^{2,5}. FMRP is an RNA-binding protein that binds a large subset of mRNAs in the mammalian brain and is a key component of RNA granules. These granules transport translationally-repressed mRNAs essential for the synaptic function along axons and dendrites^{1,3}. Neuronal activation triggers the local translation of these critical mRNAs at synapses allowing spine maturation and elimination, which are essential processes to shape a functional neuronal network in the developing brain. Accordingly, the lack of FMRP expression in FXS patients and *Fmr1* knockout (*Fmr1*-KO) animal models leads to a pathological increase in immature dendritic protrusions due to a failure in the synapse maturation and/or elimination processes⁶. These defects correlate with significant alterations in glutamatergic α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA)-mediated synaptic plasticity, including Long-Term Depression (LTD) and Potentiation (LTP)^{1,7}. Consequently, these defects lead to learning and memory deficits and underlie the abnormal socio-emotional behaviors in *Fmr1*-KO mice^{1,7}.

While the CGG-repeat expansion is the most frequent cause of FXS, other mutagenic mechanisms have been reported, including deletions, promoter variants, missense, and nonsense mutations. To date, more than 120 sequence variants have been identified in the *FMR1* gene. However, only three missense mutations (I304N, G266E, and R138Q) have been functionally studied and showed an association with the etiology of FXS^{8–13}. Among them, the R138Q mutation is of particular interest since it has been identified in three unrelated individuals presenting clinical traits of FXS. The first male patient sequenced displayed ID, anxiety, and seizures^{11,13}, while the second presented the classical features of FXS including ID, ADHD, seizures, and ASD¹⁴. Interestingly, a female with mild ID and attention deficits was recently identified bearing the R138Q mutation¹⁵.

The R138Q mutation does not affect the ability of FMRP to bind polyribosomes and repress the translation of specific target mRNAs¹³. In addition, the intracellular perfusion of a short N-terminal version of FMRP-R138Q in *Fmr1*-KO CA3 hippocampal neurons failed to rescue the action potential broadening, suggesting a functional alteration of the FMRP-R138Q truncated mutant form¹³. However, the cellular and network alterations underlying the phenotype described in FMRP-R138Q FXS patients remain to be elucidated. Here, we have engineered a knock-in mouse model expressing the recurrent missense R138Q mutation in FMRP (*Fmr1*^{R138Q}). We demonstrate that *Fmr1*^{R138Q} mice exhibit postsynaptic alterations in the hippocampus, including an increased dendritic spine density, AMPAR-mediated synaptic plasticity defects associated with severe impairments in their socio-cognitive performances.

Results

***Fmr1* mRNA and FMRP protein levels in *Fmr1*^{R138Q} mice.** To assess the pathophysiological impact of the recurrent R138Q mutation in vivo, we generated a specific knock-in mouse line expressing the R138Q FXS mutation using classical homologous recombination in murine C57BL/6 embryonic stem (ES) cells (Fig. 1a). The R138Q coding mutation was introduced in exon 5 by changing the CGA arginine codon into a CAA nucleotide triplet coding for a glutamine (R138Q: c.413G > A). The integrity of the FXS mutation in the *Fmr1*^{R138Q} mice was confirmed by genomic DNA sequencing (Fig. 1a). *Fmr1*^{R138Q} mice were viable, showed a standard growth and normal fertility and mortality rates (Supplementary Fig. 1).

The expression pattern of the FMRP protein is developmentally regulated¹⁶. To assess whether the R138Q mutation affects the developmental profile of FMRP, we compared the FMRP protein levels in the brain of WT and *Fmr1*^{R138Q} mice at different postnatal days (PND) (Fig. 1b). As expected from the literature^{2,5}, the FMRP protein level peaked at PND10–15 (WT PND15: 1.330 ± 0.246) and then significantly decreased in the adult brain of WT mice (WT PND90: 0.441 ± 0.078). FMRP-R138Q protein levels showed a similar pattern in the developing *Fmr1*^{R138Q} brain (Fig. 1b; *Fmr1*^{R138Q} PND15: 1.300 ± 0.303; *Fmr1*^{R138Q} PND90: 0.491 ± 0.072), indicating that the R138Q mutation does not alter the protein expression of the pathogenic FMRP.

Since FMRP is an RNA-binding protein regulating the local translation of a large number of mRNAs important to the synaptic function, we compared the total levels of a subset of its target mRNAs in PND90 WT and *Fmr1*^{R138Q} male littermate brains by RT-qPCR (Fig. 1c). We found no significant differences in the total mRNA levels of the FMRP targets tested.

To determine whether the R138Q mutation alters the brain morphology, we next performed a Nissl staining on 20- μ m-thick brain coronal slices from PND90 WT and *Fmr1*^{R138Q} male littermates. There were no apparent macroscopic defects in the *Fmr1*^{R138Q} brain and the structural organization of the hippocampus was preserved (Fig. 1d).

***Fmr1*^{R138Q} mice show an increase in hippocampal spine density.** FMRP is essential to proper spine elimination and maturation³. A hallmark of the classical FXS phenotype is a pathological excess of long thin immature dendritic protrusions¹⁷, resulting from a failure in postsynaptic maturation and/or elimination processes. To understand if the R138Q mutation impacts spine maturation and/or elimination, we analyzed the morphology and density of dendritic spines in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus (Fig. 2). We first used attenuated Sindbis viral particles in WT and *Fmr1*^{R138Q} cultured hippocampal neurons at 13 days in vitro (13 DIV) to express free GFP and outline the morphology of dendritic spines^{18,19}. We then compared the density and morphology of dendritic spines 20 h post transduction (Fig. 2a). Interestingly, while the length of dendritic spines was similar for both genotypes (WT: 1.563 ± 0.0717 μ m; *Fmr1*^{R138Q}: 1.521 ± 0.06193 μ m), *Fmr1*^{R138Q} neurons displayed a significant increase in spine density compared to WT neurons (WT: 6.06 ± 0.126 spines per 10 μ m; *Fmr1*^{R138Q}: 8.16 ± 0.207 spines per 10 μ m).

We also evaluated the characteristics of dendritic spines in the CA1 region of the hippocampus of PND90 WT and *Fmr1*^{R138Q} male littermates using Golgi-Cox staining (Fig. 2b; Supplementary Fig. 2). While there was no difference in spine length and width, *Fmr1*^{R138Q} hippocampal neurons displayed a significant increase in spine density both in basal (Fig. 2b; WT: 8.096 ± 0.232 spines per 10 μ m; *Fmr1*^{R138Q}: 10.62 ± 0.167 spines per 10 μ m) and apical dendrites (Supplementary Fig. 2; WT: 8.996 ±

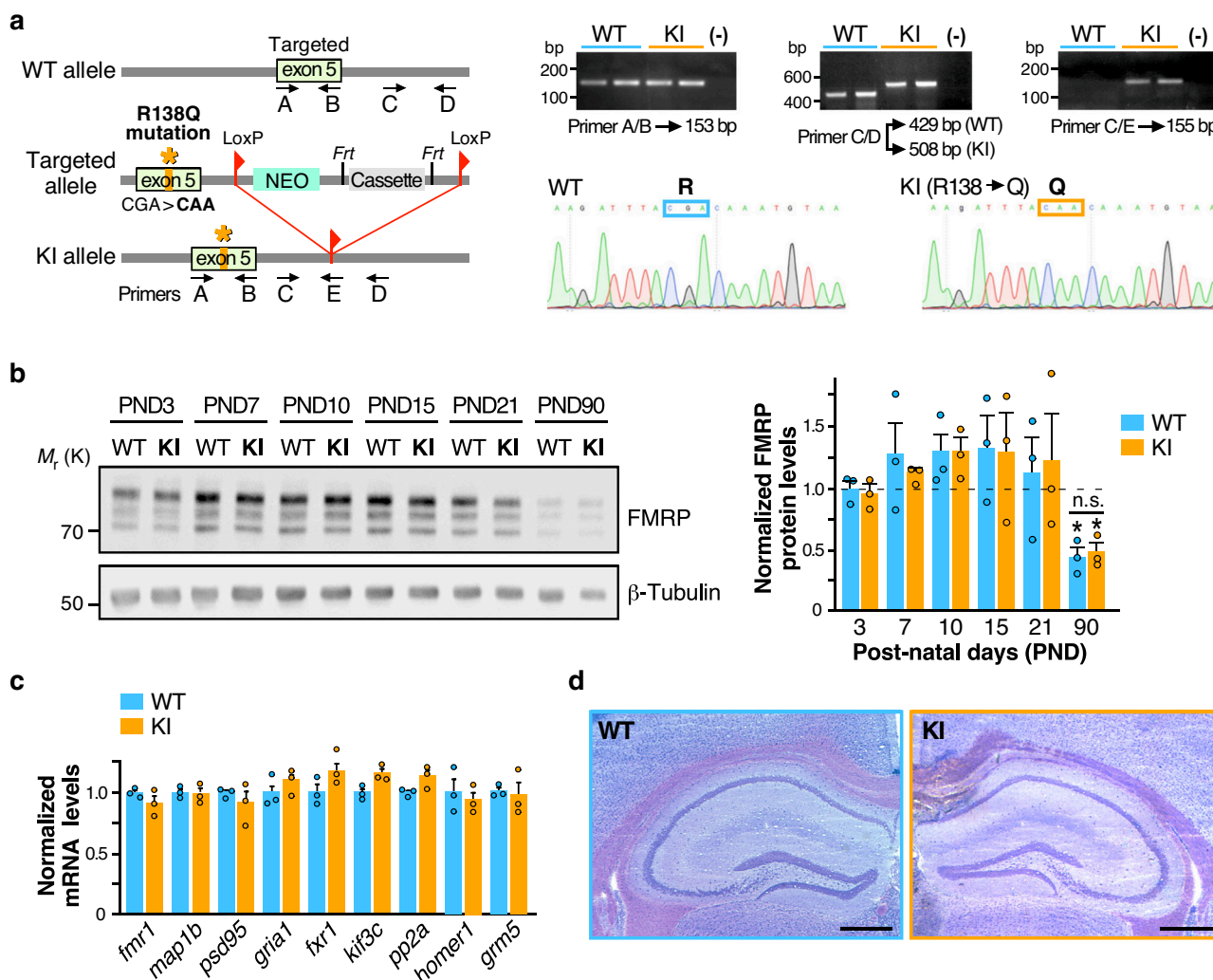


Fig. 1 Generation and characterization of the *Fmr1*^{R138Q} Knock-in (KI) mouse line. **a** Schematic representation of the *Fmr1* WT allele, the targeting vector used and the allele carrying the missense FXS R138Q mutation. Representative PCR profiles and DNA sequences obtained upon genotyping and genomic DNA sequencing of WT and *Fmr1*^{R138Q} littermates. **b** Immunoblots showing FMRP protein levels at the indicated postnatal days (PND) in WT and *Fmr1*^{R138Q} mice. β -tubulin loading control is also shown. Data are presented as mean values \pm s.e.m. of normalized FMRP-WT and FMRP-R138Q protein levels in developing brains of age-matched littermate animals. $N = 3$ biologically independent experiments. Statistical significance determined by Two-way analysis of variance (ANOVA) with Sidak’s post test; * $p = 0.0219$ versus PND3–21; ns not significant. **c** Relative abundance of several mRNA targets of FMRP measured by qPCR in PND90 WT and *Fmr1*^{R138Q} brains. Data are presented as mean values \pm s.e.m. of three biologically independent experiments. No significant differences were observed between the genotypes. **d** Representative images of the hippocampal formation in PND90 WT and *Fmr1*^{R138Q} littermates. Scale bar, 300 μ m. Source data are provided as a Source Data file.

0.189 spines per 10 μ m; *Fmr1*^{R138Q}: 9.96 \pm 0.152 spines per 10 μ m). Taken together, these data indicate that the R138Q mutation rather impairs the elimination of dendritic spines than their maturation given that dendritic spines are morphologically similar in WT and *Fmr1*^{R138Q} brains.

To go deeper into the characterization of dendritic spines, we performed ultrastructural analyses of WT and *Fmr1*^{R138Q} hippocampi using transmission electron microscopy (TEM). Stereological analyses pointed out a significant increase in the density of excitatory synapses in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus (Fig. 2c; WT: 1.371 \pm 0.129 synapses per μ m³; *Fmr1*^{R138Q}: 2.187 \pm 0.161 synapses per μ m³) in agreement with the Golgi-Cox staining data (Fig. 2b, Supplementary Fig. 2). Interestingly, while there was no difference in the length of the postsynaptic densities (PSD; WT: 232.63 \pm 6.26 nm; *Fmr1*^{R138Q}: 222.73 \pm 5.64 nm), the PSD thickness in *Fmr1*^{R138Q} hippocampal neurons was largely reduced (Fig. 2c; WT: 44.70 \pm 0.99 nm; *Fmr1*^{R138Q}: 34.96 \pm 0.76 nm). We also measured a significant increase in the density of

synaptic vesicles in *Fmr1*^{R138Q} hippocampal presynaptic termini (Fig. 2c; WT: 120.48 \pm 4.65 vesicles per μ m²; *Fmr1*^{R138Q}: 148.97 \pm 4.25 vesicles per μ m²). Altogether, these data reveal that the R138Q mutation leads to ultrastructural alterations both in the pre- and postsynaptic compartments.

Increased surface-expressed AMPAR levels in *Fmr1*^{R138Q} mice.

To characterize the effect of the R138Q mutation on the composition of synapses, we compared the total protein levels of several pre- and postsynaptic proteins in brain homogenates prepared from WT and *Fmr1*^{R138Q} male littermates (Fig. 3a; Supplementary Fig. 3). Interestingly, we measured a significant increase in the total amount of the GluA1 AMPAR subunit in the *Fmr1*^{R138Q} brain (GluA1 *Fmr1*^{R138Q}: 1.45 \pm 0.12 vs WT). All the other proteins investigated in the *Fmr1*^{R138Q} brain, including proteins involved in the trafficking of AMPAR, showed levels similar to their WT littermates (Fig. 3a; GluA2 *Fmr1*^{R138Q}: 1.16 \pm 0.18; PSD95 *Fmr1*^{R138Q}: 1.13 \pm 0.12; GRIP1 *Fmr1*^{R138Q}: 1.27 \pm

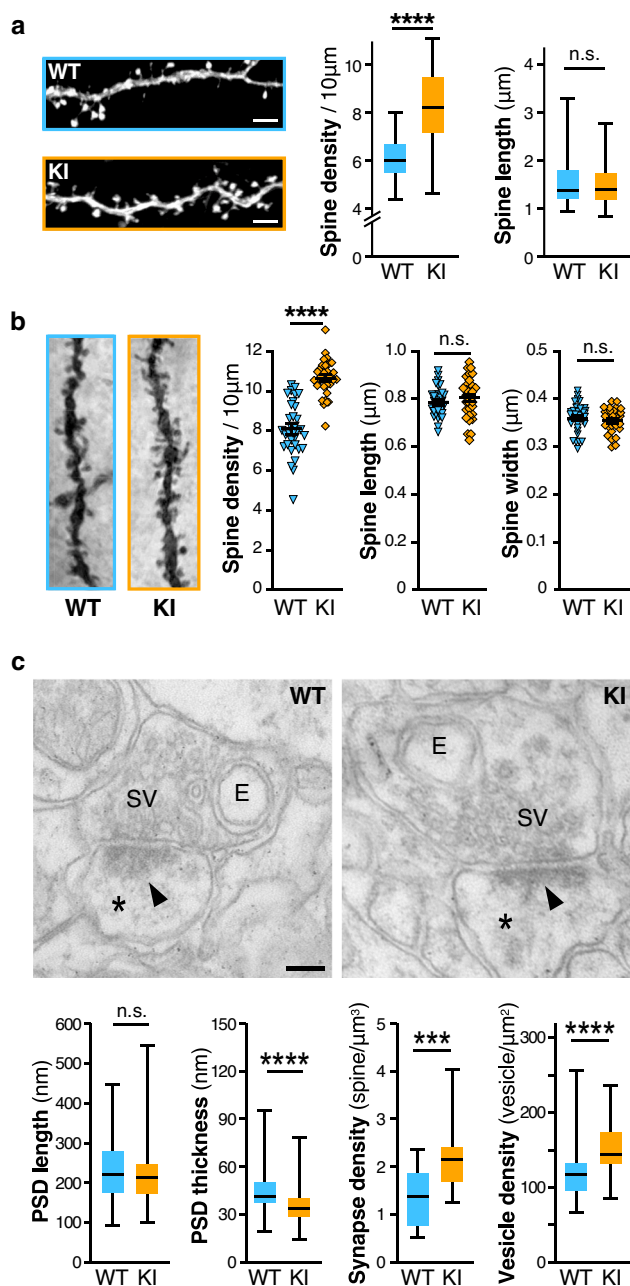


Fig. 2 The *Fmr1^{R138Q}* hippocampus exhibits increased dendritic spine density and ultrastructural alterations. **a** Confocal images of secondary dendrites from GFP-expressing WT and *Fmr1^{R138Q}* KI cultured hippocampal neurons. Scale bar, 5 μm . Box plots indicate median (middle line), 25th, 75th percentile (box), and min to max values (whiskers) obtained for spine density and length in WT and *Fmr1^{R138Q}* neurons. $N = 48\text{--}54$ neurons for $\sim 1400\text{--}2200$ spines analyzed per genotype from six biologically independent experiments. Two-tailed Mann-Whitney test. **** $p < 0.0001$. **b** Representative images of Golgi-stained basal secondary dendrites of CA1 hippocampal neurons from PND90 WT and *Fmr1^{R138Q}* littermates. Histograms show the density of spines, spine length and width from WT and *Fmr1^{R138Q}* CA1 secondary dendrites. Error bars represent the mean \pm s.e.m. $N = 30$ neurons per genotype from three biologically independent experiments (1500–2000 spines analyzed per genotype). Two-sided Mann-Whitney test; **** $p < 0.0001$. **c** Representative EM images of pre- and postsynaptic (*) elements in CA1 synapses of PND90 WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampi. E endosomes, SV synaptic vesicles, Arrowheads, postsynaptic densities (PSD). Scale bar, 100 nm. Box plots indicate median (line), 25th, 75th percentile (box), and min to max values (whiskers) for PSD length and thickness, the density of synapses and synaptic vesicles in WT and *Fmr1^{R138Q}* CA1 hippocampal neurons. Approximately 130 PSD (length and thickness), 60 presynaptic boutons, and 350 μm^2 of total surface area (synapse density) per genotype were analyzed from three independent sets of the experiment. Unpaired t test. ns not significant. *** $p = 0.0003$; **** $p < 0.0001$. Source data are provided as a Source Data file.

(Fig. 3a), the surface expression of GluA2 was significantly higher in cultured *Fmr1^{R138Q}* hippocampal neurons (Fig. 3c; GluA2 *Fmr1^{R138Q}*: 1.50 ± 0.09 vs WT).

We then examined the surface expression of AMPARs in acute hippocampal slices using BS3-crosslinking assays (Fig. 3d). Consistent with the above data, the surface expression of both GluA1 and GluA2 was also significantly increased in the *Fmr1^{R138Q}* hippocampus (Fig. 3d, Lanes +BS3; GluA1 *Fmr1^{R138Q}*: 1.76 ± 0.21 vs WT; Lanes +BS3; GluA2 *Fmr1^{R138Q}*: 1.58 ± 0.17 vs WT). Altogether, these data clearly indicate that the R138Q mutation leads to increased surface levels of both GluA1 and GluA2 in vitro and in vivo.

Altered synaptic transmission in the *Fmr1^{R138Q}* hippocampus.

We showed that the recurrent FXS R138Q missense mutation leads to an increase in AMPAR surface expression. To assess whether this increase occurs at least in part synaptically, we performed super-resolution STimulated Emission Depletion (STED) microscopy on surface-labeled GluA1 or GluA2 in WT and *Fmr1^{R138Q}* cultured hippocampal neurons (Fig. 4a–d). We first measured the mean fluorescence intensity from surface-expressed GluA1 and GluA2 at Homer1-labeled postsynaptic sites (Fig. 4a–c). We found that the mean surface GluA1 fluorescence intensity per synapse is significantly increased in *Fmr1^{R138Q}* neurons (Fig. 4c, WT: 797 ± 28 ; *Fmr1^{R138Q}*: 1013 ± 34), whereas the fluorescence associated with surface-expressed GluA2 is reduced (Fig. 4c, WT: 1373 ± 34 ; *Fmr1^{R138Q}*: 1148 ± 29). At the postsynapse, AMPARs are organized in 80–90 nm nanodomains facing presynaptic glutamate release sites for efficient synaptic transmission²⁰. Thus, we compared the mean number of nanodomains containing surface-expressed GluA1 and GluA2 in WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal neurons (Fig. 4a, b, d). Consistent with the literature²⁰, we measured a density of $\sim 2\text{--}2.1$ nanodomains per spine for both surface-associated GluA1 and GluA2 in WT neurons (Fig. 4d, WT sGluA1: 2.023 ± 0.107 ; WT sGluA2: 2.121 ± 0.099 nanodomains per spine). Interestingly, in *Fmr1^{R138Q}* spines there was a significant increase in the mean

0.19; PICK1 *Fmr1^{R138Q}*: 0.92 ± 0.15 ; Stargazin *Fmr1^{R138Q}*: 1.02 ± 0.03).

To further explore the AMPAR defects in the *Fmr1^{R138Q}* brain, we compared the levels of surface-expressed GluA1 in DIV15 WT and *Fmr1^{R138Q}* cultured hippocampal neurons (Fig. 3b). Using surface-immunolabeling assays with specific anti-GluA1 antibodies, we showed that the surface levels of GluA1 in *Fmr1^{R138Q}* neurons were significantly increased (Fig. 3b; Mean surface GluA1 intensity, WT: 1 ± 0.087 ; *Fmr1^{R138Q}*: 1.42 ± 0.13), with a higher density of surface GluA1-containing clusters (Fig. 3b; Surface cluster density, WT: 1 ± 0.049 ; *Fmr1^{R138Q}*: 1.22 ± 0.06). Since AMPARs are often concentrated in dendritic spines, this finding corroborates the increased number of dendritic spines measured in *Fmr1^{R138Q}* neurons (Fig. 2). We further confirmed the significant increase in GluA1 surface expression in *Fmr1^{R138Q}* neurons using cell surface biotinylation assays (Fig. 3c; GluA1 *Fmr1^{R138Q}*: 1.85 ± 0.19 vs WT). Interestingly, while there was no alteration in the total levels of GluA2 in the *Fmr1^{R138Q}* brain

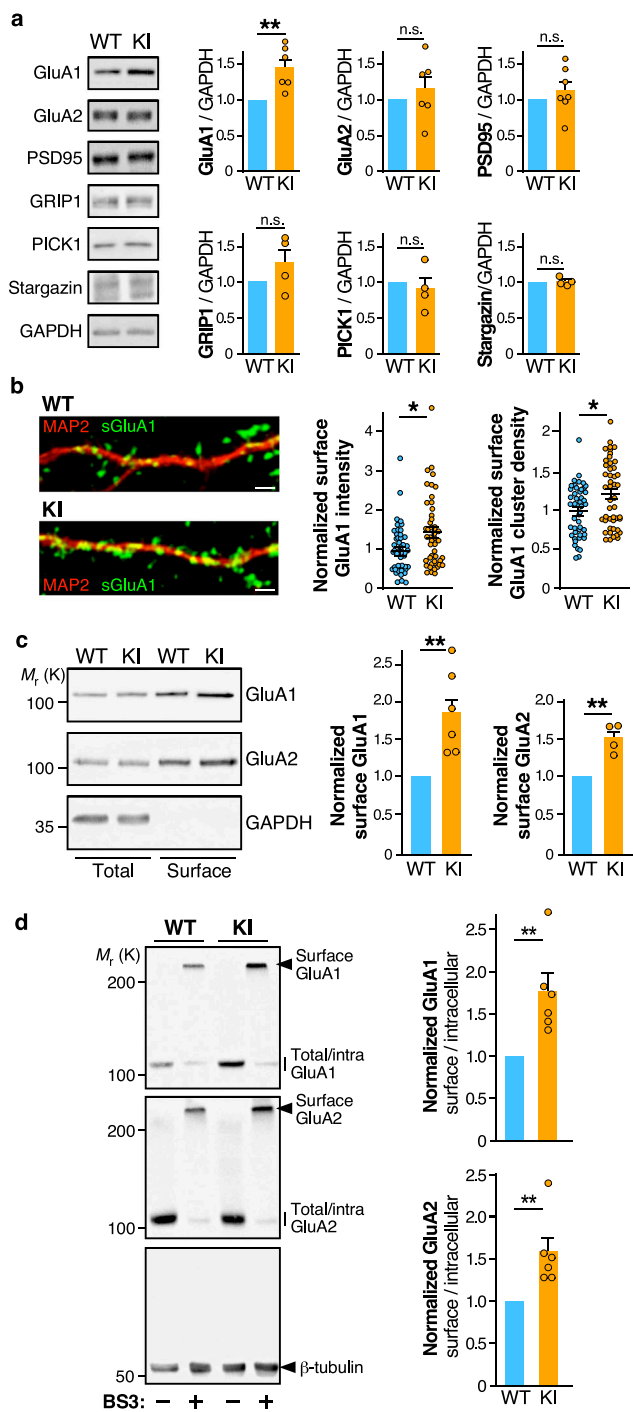


Fig. 3 Increased surface expression of AMPAR in hippocampal neurons of *Fmr1^{R138Q}* KI mice. **a** Immunoblots showing the levels of the indicated synaptic proteins in brain homogenates from PND21 WT and *Fmr1^{R138Q}* littermate animals. GAPDH was used as a loading control. Quantification shows the mean \pm s.e.m. of the total levels of the indicated proteins. $N = 6$ (GluA1, GluA2), $N = 7$ (PSD95), and $N = 4$ (GRIP1, PICK1, Stargazin) biologically independent experiments. Unpaired t test. ns not significant. $**p = 0.0034$. **b** Secondary dendrites from TTX-treated WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal neurons at 15 DIV stained for surface GluA1 (green) and MAP2 (red). Scale bar, 5 μ m. Histograms show mean \pm s.e.m. of both surface intensity and cluster density for GluA1 in WT and *Fmr1^{R138Q}* neurons. Values were normalized to their respective basal conditions. $N = 47$ neurons per genotype from five biologically independent experiments. Two-tailed Mann–Whitney test. $*p = 0.0147$ (intensity) and $*p = 0.0124$ (density). **c** Immunoblots showing the surface expression of GluA1 and GluA2 in TTX-treated WT and *Fmr1^{R138Q}* cultured hippocampal neurons at 15 DIV using biotinylation assays. Histograms show the mean \pm s.e.m. of the normalized level of GluA1 and GluA2 subunits at the neuronal surface in WT and *Fmr1^{R138Q}* neurons. $N = 7$ (GluA1) and 4 (GluA2) biologically independent experiments respectively. Two-sided ratio t test. $**p = 0.0011$ (GluA1); $**p = 0.0074$ (GluA2). **d** Immunoblots showing the basal surface expression of GluA1 and GluA2 in PND90 TTX-treated WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal slices using the BS3-crosslinking assay. Control tubulin immunoblot is included to confirm the absence of BS3 crosslinking intracellularly. The surface/intracellular ratio in the WT was set to 1 and *Fmr1^{R138Q}* values were calculated respective to the WT. Error bars show the mean values \pm s.e.m. $N = 6$ independent experiments. Two-tailed ratio t test. $**p = 0.0041$ (GluA1); $**p = 0.0056$ (GluA2). Source data are provided as a Source Data file.

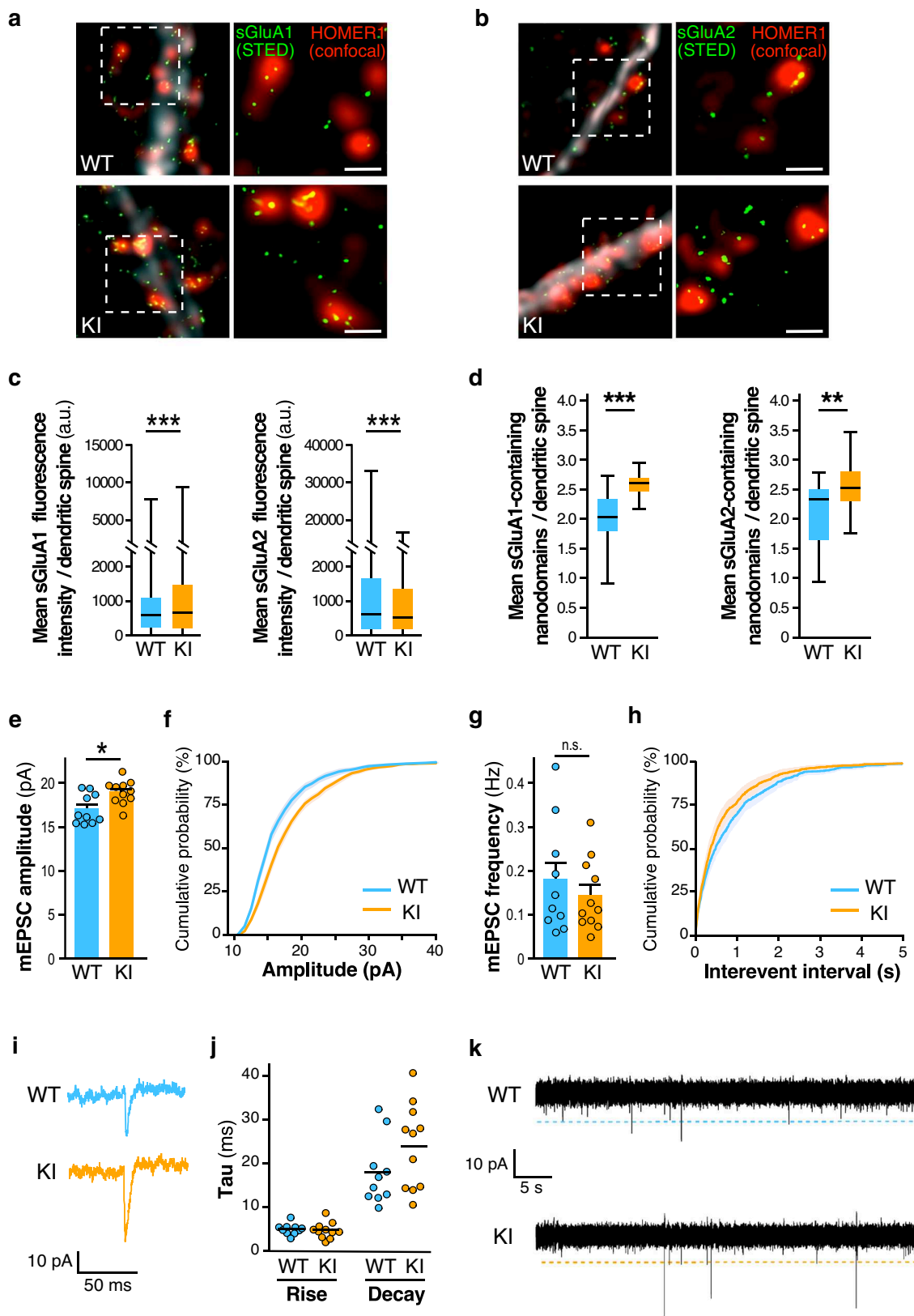
Finally, to better understand whether the increase in surface-expressed AMPARs measured in the *Fmr1^{R138Q}* hippocampus (Figs. 2, 3, and 4a–d) is associated with alterations in glutamatergic transmission, we performed whole-cell patch-clamp recordings in CA1 neurons from hippocampal slices of PND90 WT and *Fmr1^{R138Q}* littermates (Fig. 4e–k). We showed that the amplitude of AMPAR-mediated miniature Excitatory PostSynaptic Currents (mEPSCs) is significantly enhanced in *Fmr1^{R138Q}* mice (Fig. 4e, f; WT: 17.09 ± 0.539 pA; *Fmr1^{R138Q}*: 18.97 ± 0.405 pA). Interestingly, we did not measure any significant differences in the frequency of mEPSCs (Fig. 4g, h; WT: 0.178 ± 0.040 Hz; *Fmr1^{R138Q}*: 0.143 ± 0.025 Hz) or the kinetics of these events (Fig. 4i, j) between the two genotypes.

Altogether the data from the above experiments (Figs. 2–4) revealed that the R138Q FXS mutation leads to important pre- and postsynaptic alterations resulting in synaptic transmission deficits in the *Fmr1^{R138Q}* hippocampus.

Impaired long-term potentiation in the *Fmr1^{R138Q}* hippocampus.

We next investigated the consequences of the R138Q mutation in hippocampal plasticity. Since the level of surface-expressed AMPARs is enhanced in the *Fmr1^{R138Q}* hippocampus, we wondered whether the induction of LTP could trigger a further increase in synaptic AMPARs (Fig. 5 and Supplementary Fig. 4). To test this hypothesis, we first combined surface immunolabeling assays with the chemical induction of LTP (cLTP²¹) on WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal neurons (Fig. 5a, b). In line with the literature²¹, the level of surface GluA1 was significantly increased upon cLTP in WT neurons (Mean surface GluA1 intensity, WT: 1.427 ± 0.129 vs basal; Surface cluster density, WT: 1.308 ± 0.08596 vs basal) whereas the surface level of GluA1 in *Fmr1^{R138Q}* neurons was unexpectedly decreased (Mean surface GluA1 intensity, *Fmr1^{R138Q}*: 0.6354 ± 0.08647 vs basal; Surface cluster density, *Fmr1^{R138Q}*: 0.7455 ± 0.08227 vs basal).

number of both surface-associated GluA1 and GluA2 nanodomains (Fig. 4d, *Fmr1^{R138Q}* sGluA1: 2.582 ± 0.106 ; *Fmr1^{R138Q}* sGluA2 2.554 ± 0.078). These data indicate that the missense R138Q mutation leads to a significant increase in the number of postsynaptic nanodomains containing AMPARs. However, while the mean fluorescence associated with surface-expressed GluA1 is also increased in hippocampal *Fmr1^{R138Q}* synapses, the synaptic fluorescence level from surface-labeled GluA2 is decreased revealing that the upregulation of surface GluA2 measured in biochemical experiments is rather due to its extrasynaptic increase. This indicates that the FXS mutation not only impacts the surface expression of both GluA1 and GluA2 but also differentially perturbs their synaptic targeting, trafficking, and nanoscale organization.



We confirmed these results using surface biotinylation assays in WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal neurons in basal and cLTP-induced conditions (Supplementary Fig. 4a–c). The cLTP treatment triggered the increase in both GluA1 and GluA2 surface expression in WT neurons (WT GluA1 cLTP: 1.578 ± 0.107 ; WT GluA2 cLTP: 1.203 ± 0.008). In contrast, the

surface levels of AMPARs upon cLTP were not increased but as above, rather decreased in *Fmr1^{R138Q}* hippocampal neurons (*Fmr1^{R138Q}* GluA1 cLTP: 0.490 ± 0.073 ; *Fmr1^{R138Q}* GluA2 cLTP: 0.899 ± 0.157).

In addition to the data obtained on hippocampal cultures, we performed BS3-crosslinking assays and showed that the induction

Fig. 4 Increased synaptic surface expression of AMPAR and basal excitatory transmission in hippocampal *Fmr1^{R138Q}* neurons. **a, b** Super-resolution STED images of surface-expressed GluA1 and GluA2 (STED, green) in postsynaptic Homer1 sites (confocal, red) of TTX-treated WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal neurons. Scale bar, 500 nm. **c, d** Quantification of **(a)** and **(b)**. Box plots indicate median (middle line), 25th, 75th percentile (box), and min to max values (whiskers) obtained for the mean surface GluA1 and GluA2 fluorescence intensity **(c)** and nanodomains **(d)** in WT and *Fmr1^{R138Q}* neurons. $N = 17$ –30 (WT) and 15–30 (*Fmr1^{R138Q}*) neurons were analyzed from three biologically independent experiments with a total of dendritic spines analyzed ranging from 878 to 4246. Unpaired *t* test. *** $p < 0.0001$; ** $p = 0.0011$. **e–k** mEPSCs recordings from acute hippocampal slices obtained from PND90 WT and *Fmr1^{R138Q}* littermates. Quantification shows the mean values \pm s.e.m. **(e, g)** and cumulative curves \pm s.e.m. **(f, h)** of mEPSC amplitude and frequency. $N = 10$ –11 neurons per genotype from three independent experiments. Unpaired *t* test. ns not significant. * $p = 0.0111$. **i** Example traces of WT and *Fmr1^{R138Q}* single events. **j** Computed Tau rise and decay. **k** Representative traces of mEPSC recordings from WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal slices. Source data are provided as a Source Data file.

of cLTP in *Fmr1^{R138Q}* hippocampal slices led to a significant reduction in the levels of surface-expressed AMPARs (Fig. 5c–e, *Fmr1^{R138Q}* GluA1 cLTP: 0.706 ± 0.008 vs basal; Supplementary Fig. 4d–f, *Fmr1^{R138Q}* GluA2 cLTP: 0.860 ± 0.05 vs *Fmr1^{R138Q}* basal), further confirming that the R138Q mutation impairs the AMPAR trafficking. As expected, the cLTP treatment was able to increase the surface levels of AMPARs in hippocampal slices from WT littermate brains (Fig. 5c, e, WT GluA1 cLTP: 3.691 ± 0.675 vs basal; Supplementary Fig. 4d–f, WT GluA2 cLTP: 1.953 ± 0.315 vs WT basal).

Altogether, these data indicate that the hippocampal plasticity is severely impaired in the *Fmr1^{R138Q}* mice.

It has been demonstrated that the LTP induction promotes a reorganization of the AMPAR nanodomains²². Thus, to further assess the impact of the R138Q mutation in cLTP-activated neurons, we performed super-resolution STED microscopy on surface-labeled GluA1 in cLTP-treated WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal cells (Fig. 5f–h). As expected, the mean fluorescence intensity per synapse (Fig. 5f, g; WT basal: 797 ± 28 ; WT cLTP: 1076 ± 35), as well as the density of the postsynaptic nanodomains (Fig. 5f, h; WT basal: 2.023 ± 0.107 ; WT cLTP: 2.783 ± 0.09 nanodomains per spine) containing the surface-expressed GluA1 subunits were both significantly increased in WT cLTP-treated neurons. In contrast, *Fmr1^{R138Q}* neurons exhibited a significant decrease in the mean postsynaptic surface GluA1 fluorescence intensity upon cLTP (Fig. 5f, g; *Fmr1^{R138Q}* basal: 1013 ± 34 ; *Fmr1^{R138Q}* cLTP: 890 ± 30) while the mean density of surface GluA1-containing nanodomains remained unchanged (Fig. 5f, h; *Fmr1^{R138Q}* sGluA1 basal: 2.582 ± 0.05 ; *Fmr1^{R138Q}* sGluA1 cLTP: 2.599 ± 0.040 nanodomains per spine). These data thus reveal that the R138Q mutation also impacts the synaptic reorganization of AMPARs upon cLTP in *Fmr1^{R138Q}* cultured hippocampal neurons, further confirming that the activity-dependent trafficking of these receptors is impaired in the *Fmr1^{R138Q}* mice.

Altogether, these data indicate that, contrary to WT neurons, the induction of cLTP does not promote any increase in the surface nor the synaptic levels of AMPARs in the *Fmr1^{R138Q}* hippocampus. Therefore, to determine if the expression of the FMRP-R138Q mutant also physiologically impacts the AMPAR-mediated responses, we induced LTP by high-frequency stimulation (HFS) in acute WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal slices and recorded the postsynaptic responses in CA1 neurons (Fig. 5i–k). First, we tested the impact of the R138Q mutation on the CA3 to CA1 synaptic transmission and did not find any significant differences with the WT responses in Input/Output curves established following the stimulation of the Schaffer collaterals (Supplementary Fig. 5). This indicates that the connectivity between the pre- and postsynaptic sites is preserved in the *Fmr1^{R138Q}* hippocampus. Next, we found that the induction of LTP by HFS was evoked as expected in the WT hippocampus (WT LTP: $157.2 \pm 6.52\%$ vs basal) but was drastically reduced in *Fmr1^{R138Q}* male littermates (*Fmr1^{R138Q}*

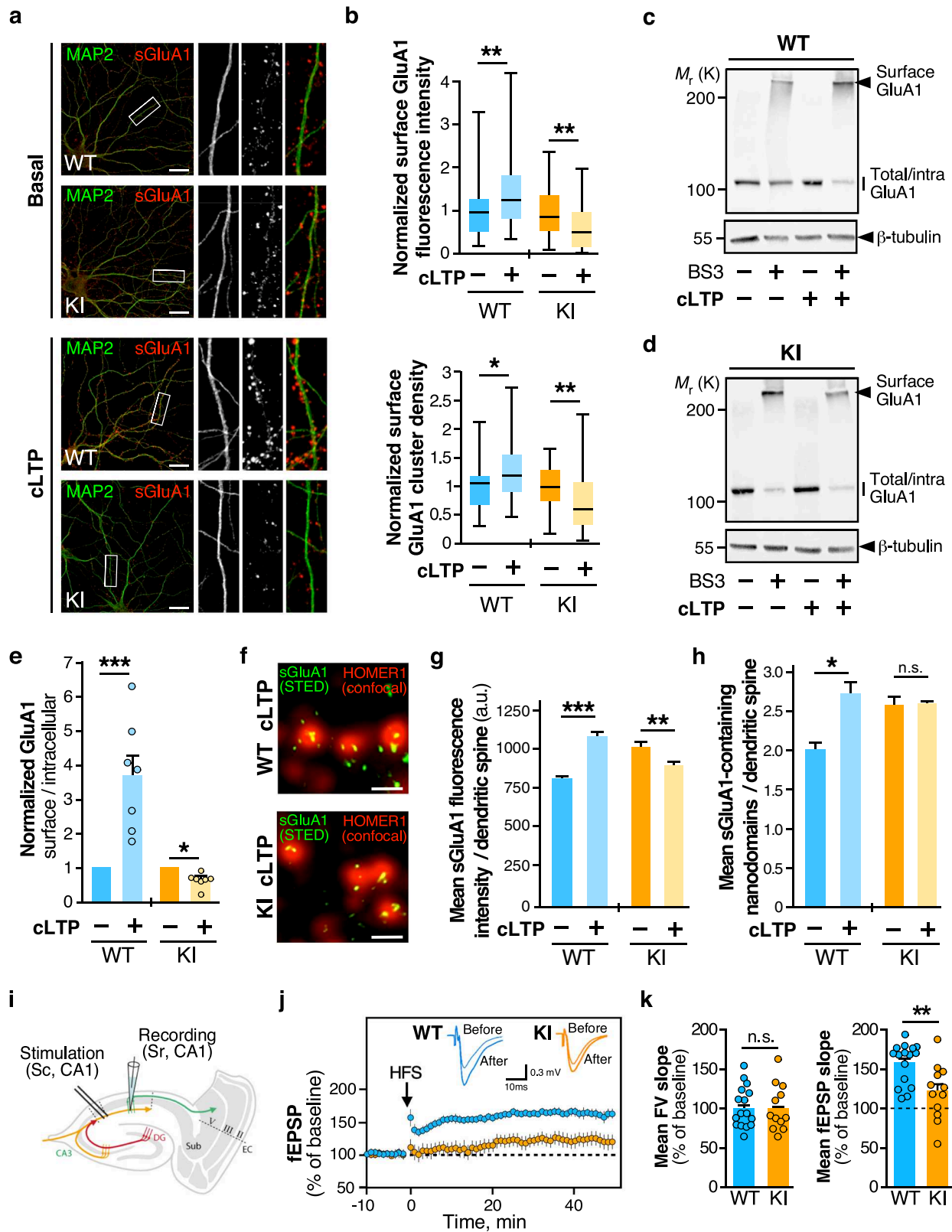
LTP: $122.4 \pm 10.12\%$ vs basal), in line with the impaired cLTP seen in both biochemical and imaging experiments (Fig. 5a–h). In addition, we did not measure any significant difference in the mean fiber volley (FV) slope between genotypes (Fig. 5i–k), suggesting that the impaired LTP in the *Fmr1^{R138Q}* hippocampus rather arises from postsynaptic impairments than from presynaptic alterations.

***Fmr1^{R138Q}* mice display ID- and ASD-like features.** The R138Q mutation has been identified in both male and female patients^{11,13,15}. Since the mutation affects the surface levels of AMPARs and directly impacts synaptic plasticity in the hippocampus, we investigated whether male and female *Fmr1^{R138Q}* mice display altered cognitive and/or social performances (Fig. 6). To avoid possible pitfalls due to an impact of the R138Q mutation on locomotion, we first tested PND40–45 mice using the open field test to detect any potential motor defects. We did not measure any significant differences in the number of crossings between the two genotypes demonstrating that there is no motor alteration in the *Fmr1^{R138Q}* mice (Supplementary Fig. 6).

Communication skills are altered in some FXS patients and *Fmr1*-KO mice¹⁹. We therefore compared the ultrasonic vocalization (USV) profile in PND7 WT and *Fmr1^{R138Q}* pups removed from the nest and found a ~50% decrease in the number of USVs in *Fmr1^{R138Q}* compared to WT animals in both genders (Fig. 6a, b; *Fmr1^{R138Q}* male: 75.36 ± 17.71 USVs; WT male: 147.4 ± 14.06 USVs; *Fmr1^{R138Q}* female: 79.88 ± 35.68 USVs; WT female: 163.4 ± 31.49 USVs). These data indicate that the R138Q mutation leads to severe communicative deficits in infant *Fmr1^{R138Q}* mice.

Next, we evaluated the cognitive performance in PND40–45 males and females with the novel object recognition test (Fig. 6c, d). We found a profound deficit for both genders as the *Fmr1^{R138Q}* mice spent significantly less time than WT animals exploring the novel object (*Fmr1^{R138Q}* male: $51.18 \pm 3.26\%$; WT male: $71.16 \pm 3.72\%$; *Fmr1^{R138Q}* female: $45.27 \pm 4.37\%$; WT female: $66.42 \pm 3.31\%$). In addition, the *Fmr1^{R138Q}* mice were spending significantly more time sniffing the old object (*Fmr1^{R138Q}* male: 27.27 ± 3.85 s; WT male: 16.46 ± 2.46 s; *Fmr1^{R138Q}* female: 19.22 ± 3.13 s; WT female: 9.77 ± 0.98 s), thus showing a lower discrimination index (Discrimination index *Fmr1^{R138Q}* male: $2.36 \pm 6.51\%$; WT male: $42.31 \pm 7.45\%$; Discrimination index *Fmr1^{R138Q}* female: $-9.45 \pm 8.73\%$; WT female: $32.84 \pm 6.63\%$). These data indicate that the R138Q mutation substantially alters the cognitive function in the *Fmr1^{R138Q}* mice.

About 25% of FXS patients present ASD traits, including social avoidance and decreased social skills. Therefore, to evaluate the impact of the R138Q mutation in ASD-like behaviors, we tested sociability in both male and female WT and *Fmr1^{R138Q}* mice using the three-chamber test (Fig. 6e, f). As expected, WT animals from both sexes spent significantly more time sniffing the novel mouse rather than the empty cage. We showed that both the time spent sniffing the social stimulus and the ability to discriminate



between the novel mouse and the empty cage was dramatically reduced in *Fmr1*^{R138Q} males (*Fmr1*^{R138Q} male sniffing time: 42.45 ± 13.84%; WT male: 80.48 ± 4.39%; Discrimination index *Fmr1*^{R138Q} male: -15.10 ± 27.69%; WT male: 60.96 ± 8.78%). However, there was no significant difference between the WT and *Fmr1*^{R138Q} female mice (*Fmr1*^{R138Q} female sniffing time: 63.21 ±

9.25%; WT female: 69.29 ± 10.69%; Discrimination index *Fmr1*^{R138Q} female: 26.41 ± 18.51%; WT female: 38.58 ± 21.37%).

Altogether, our biochemical and physiological data and reveal that *Fmr1*^{R138Q} mice display important communicative, cognitive, and social deficits.

Fig. 5 LTP is impaired in *Fmr1*^{R138Q} mice. **a** Secondary dendrites from TTX-treated WT and *Fmr1*^{R138Q} 15 DIV neurons stained for MAP2-positive microtubule (green) and surface-expressed GluA1 (red) in basal conditions and upon cLTP induction. Bar, 20 μ m. **b** Boxplots indicate median (line), 25th, 75th percentile (box), and min-to-max values (whiskers) obtained for surface GluA1 intensity and cluster density in WT and *Fmr1*^{R138Q} neurons in control and cLTP conditions. Values were normalized to their basal conditions. $N = 39$ – 42 neurons per genotype from four independent experiments. Two-tailed Mann–Whitney test. * $p = 0.0103$; ** $p = 0.0053$ (WT sGluA1 intensity); ** $p = 0.0034$ (KI sGluA1 intensity); ** $p = 0.0036$ (KI sGluA1 cluster). **c, d** Immunoblots showing the surface expression of GluA1 in basal and cLTP-induced conditions in PND90 TTX-treated WT (**c**) and *Fmr1*^{R138Q} (**d**) hippocampal slices using BS3-crosslinking assays. Control Tubulin immunoblot is included to control the absence of intracellular BS3-crosslinking. **e** The surface/intracellular ratio in the WT was set to 1 and *Fmr1*^{R138Q} values were calculated relative to the WT. Bars show the mean \pm s.e.m. $N = 7$ independent experiments. Two-tailed ratio t test. * $p = 0.0358$; *** $p = 0.0004$. **f** STED images of surface-expressed GluA1 (STED, green) in postsynaptic Homer1 sites (confocal, red) of cLTP induced WT and *Fmr1*^{R138Q} hippocampal neurons. Scale bar, 500 nm. **g, h** Box plots indicate median (middle line), 25th, 75th percentile (box), and min to max values (whiskers) obtained for the postsynaptic surface-associated GluA1 fluorescent intensity (**g**) and nanocluster density (**h**) computed from STED imaging data in basal and cLTP-treated WT and *Fmr1*^{R138Q} neurons. $N = 13$ – 17 (WT) and 15 – 18 (*Fmr1*^{R138Q}) neurons were analyzed from three independent experiments. **g, h** Unpaired t test. *** $p < 0.0001$; ** $p = 0.0079$. ns not significant. Values for control surface GluA1 in (**f**–**h**) are taken from Fig. 4 (**c, d**) since these experiments were performed in parallel. **i** Schematic diagram of the stimulating and recording areas in the mouse hippocampus. **j** fEPSPs were recorded at CA1 synapses on hippocampal slices from P35–42 WT and *Fmr1*^{R138Q} littermates in basal conditions and upon LTP induction by high-frequency stimulation (HFS, 3 \times 100Hz, 1 s). **k** Histograms show the mean \pm s.e.m. of fiber volley (FV) and fEPSP slopes from 12–16 neurons per genotype in four independent experiments. Unpaired t test with Welch's correction. ns not significant; ** $p = 0.0092$. Source data are provided as a Source Data file.

Discussion

Synaptic transmission and/or plasticity defects have been clearly linked to the development of many, if not all, neurological disorders. Therefore, a better understanding of the pathways underlying these alterations is essential to develop strategies to rescue the identified dysfunctions and design innovative targeted therapies to treat these diseases. Here, we generated and characterized a novel mouse model for FXS expressing the recurrent R138Q missense mutation in the FMRP protein. We show that the R138Q mutation leads to an increase in spine density, alterations in both the pre- and postsynaptic organization, and an impaired LTP in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus. The consequence of this plasticity defect is an abnormal socio-cognitive behavior in *Fmr1*^{R138Q} mice that resembles the ID and ASD-like traits described in FXS patients bearing the R138Q mutation. Altogether, our data validate the *Fmr1*^{R138Q} mouse line as a compelling preclinical model to investigate the molecular mechanisms underlying the pathology.

To date, only two studies have provided some insights into the impact of the R138Q mutation on neuronal function^{13,23}. FMRP is known to participate in the regulation of AMPAR trafficking^{1,7}, which is critical to maintaining the synaptic function. Alpatov and colleagues²³ investigated the impact of the R138Q mutation on the basal trafficking of AMPAR and reported that the exogenous expression of FMRP-R138Q does not impact the constitutive endocytosis of AMPAR in an *Fmr1*-KO background. Here, we revealed an altered surface expression of both GluA1 and GluA2 AMPAR subunits within the postsynaptic membrane of the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus, participating in an LTP impairment in these mice. We also identified that the R138Q mutation leads to alterations in the postsynaptic organization of AMPAR-containing nanodomains (Fig. 4). Nanoscale scaffolding domains at the PSD are essential to organize and concentrate AMPARs to allow an efficient synaptic transmission^{20,24}. These 80-nm AMPAR nanodomains facing presynaptic glutamate release sites are dynamic and cLTP induction promotes their nanoscale reorganization^{20,22,24}. Importantly, the calcium-dependent function of AMPARs also relies on the presence of edited GluA2 subunits at the synapse, which confers a low Ca²⁺ permeability to GluA2-containing heteromers (calcium impermeable, CI-AMPARs). Conversely, GluA1 homomers, which lack the GluA2 subunit, are permeable to Ca²⁺ and refer as CP-AMPARs^{25–27}. In basal conditions, the majority of AMPAR assemblies in the adult hippocampus contain edited Ca²⁺-impermeable GluA2 subunits, which is essential to maintaining

a low intracellular Ca²⁺ concentration. In the *Fmr1*^{R138Q} hippocampal synapses, there is an excess of GluA1 subunits associated with a decrease in the overall amount of surface-expressed GluA2 at the synapse (Fig. 4a–d). This likely reflects a different AMPAR subunit composition in *Fmr1*^{R138Q} synapses, potentially favoring the formation of CP-AMPARs. The recruitment of CP-AMPARs to postsynaptic sites plays a key role in the initial phase of LTP^{22,25,26}. Interestingly, while we measured an overall synaptic increase in CP-AMPARs upon cLTP induction in WT neurons, this event is compromised in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus (Fig. 5g). Thus, it is tempting to speculate that the enhanced expression of synaptic CP-AMPARs in basal conditions in *Fmr1*^{R138Q} neurons likely impairs the recruitment of additional GluA1-containing CP-AMPARs that are necessary to initiate the LTP. Furthermore, we showed here that, contrary to the WT synapse, there is no increase in GluA1-containing nanodomains upon LTP in *Fmr1*^{R138Q} neurons (Fig. 5h), which could also participate in the impaired postsynaptic response measured in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus.

The *Fmr1*^{R138Q} postsynaptic compartment also presents important ultrastructural alterations and displays an increase in the density of presynaptic neurotransmitter vesicles and a significant reduction of the PSD thickness (Fig. 2). This could lead to defective synaptic responses including altered diffusive properties and/or anchoring of AMPARs within the postsynaptic membranes, which is critical to recruiting AMPARs at the hippocampal synapse upon LTP induction^{28,29}.

Altogether, these data uncover a previously unsuspected postsynaptic impact of the R138Q mutation leading to both basal and activity-dependent AMPAR trafficking defects in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus.

The second study investigating the functional impact of the R138Q mutation reported that the exogenous overexpression of a truncated (FMRP_{1–298}) version of the FMRP-R138Q mutant fails to rescue action potential (AP) broadening in *Fmr1*-KO neurons¹³, which correlates with an increased presynaptic release³⁰. However, the presynaptic release per se was not assessed in this work. The authors also showed that the R138Q mutation disrupts the interaction of the short FMRP_{1–298} form with the β 4 subunit of BK channels, thus underlying AP duration^{13,30}. To conclude, they hypothesized that an alteration of the presynaptic function is likely responsible for the ID and seizures exhibited by the first FXS R138Q patient¹³. Importantly, BK channels are localized both at pre- and postsynaptic sites³¹. Consequently, alterations in FMRP/BK channel interaction may not only be linked to a

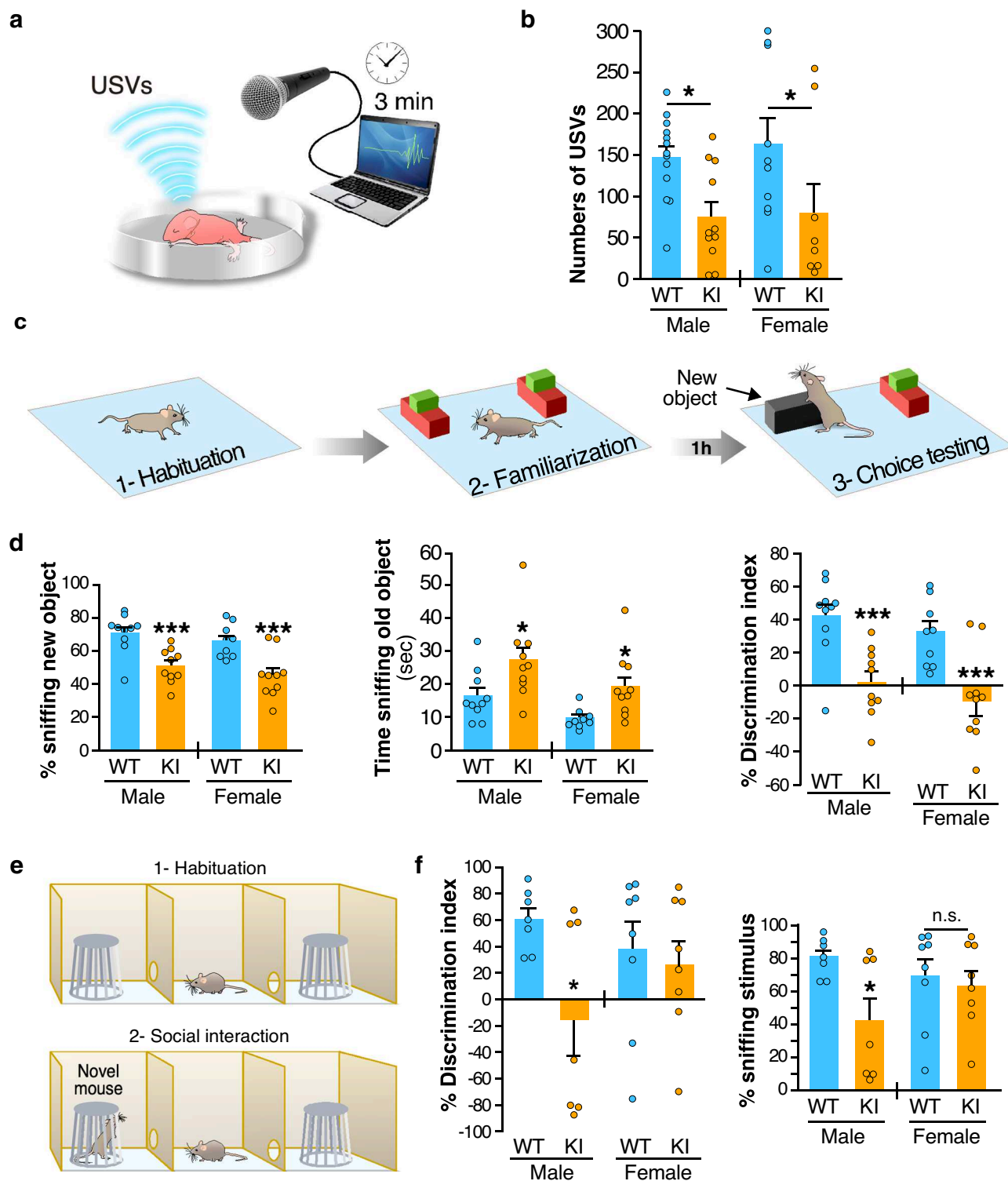


Fig. 6 *Fmr1^{R138Q}* mice show communication deficits and socio-cognitive alterations. **a** Schematic of the isolation-induced ultrasonic vocalizations (USVs) test. **b** Compared to WT animals, *Fmr1^{R138Q}* KI mice (PND7) emit ~50% less USVs when removed from the nest. Histogram shows the mean values ± s.e.m. of USVs in WT and *Fmr1^{R138Q}* males and females. WT, N = 13 males, 11 females; *Fmr1^{R138Q}*, N = 10 males, 8 females. **p* = 0.028. **c** Schematic of the object recognition test used to assess the cognitive domain. **d** Quantification shows the mean values ± s.e.m. of time sniffing the new object (%), the old object (s), and the discrimination index (%) for both PND40–45 WT and *Fmr1^{R138Q}* males and females. WT, N = 10 males, 9 females; *Fmr1^{R138Q}*, N = 10 males, 10 females. **p* = 0.011 (male), **p* = 0.028 (female), ****p* < 0.001. **e** Scheme of the three-chamber test used to assess sociability. **f** Histograms show the mean percentage ± s.e.m. of discrimination index and time sniffing the stimulus mouse for both PND40–45 WT and *Fmr1^{R138Q}* males and females. WT, N = 7 males, 8 females; *Fmr1^{R138Q}*, N = 7 males, 8 females. **p* = 0.017. Two-way ANOVA with genotype and sex as factors followed by Newman–Keuls post-hoc test for individual group comparisons were computed for all behavioral studies. Source data are provided as a Source Data file.

presynaptic impairment as suggested by the authors but also to the postsynaptic defects unraveled in the present work.

In the present study, we also demonstrated that the R138Q mutation leads to an increase in the density of synapses in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus. Unexpectedly, the frequency of mEPSCs, which usually correlates with synaptic density, is not altered (Fig. 4e–k). Recently, it was reported that the FMRP-R138Q mutant fails to restore activity-dependent bulk endocytosis (ADBE) in *Fmr1*-KO neurons, perhaps through the loss of BK channel interaction³². Our EM measurements also revealed a significant increase in the density of presynaptic vesicles in *Fmr1*^{R138Q} hippocampal termini (Fig. 2c). This ultrastructural observation could potentially result from an impaired presynaptic glutamate release or a disruption in the exocytosis/recycling process of the synaptic vesicles. This may in turn directly impact the neurotransmitter release and, together with the identified postsynaptic alterations, may mask the effects on the mEPSC frequency in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus.

The hippocampal plasticity acts on several brain functions that impact a wide range of behavioral responses. We found that the R138Q mutation leads to altered cognitive performances in both male and female *Fmr1*^{R138Q} mice using the novel object recognition (NOR) test (Fig. 6c, d), likely due to the impaired hippocampal LTP in these mice. Indeed, while it is known that the perirhinal cortex is critical to object recognition memory assessed with the NOR test, it has been proposed that the perirhinal cortex and the hippocampus play complementary roles in the NOR task^{33,34}. In particular, at the start of the training session, object information is stored in the perirhinal cortex and when a threshold amount of information is acquired, object information is transferred to the hippocampus and becomes strong object memory. If the threshold is not reached, then the information remains perirhinal cortex dependent as a weak object memory³⁴. Thus, it is likely that the impaired LTP observed in the *Fmr1*^{R138Q} mice participates in the altered cognitive performances observed during the NOR test.

Here, we identified strong social deficits in male *Fmr1*^{R138Q} mice (Fig. 6f, g). It has been demonstrated that the hippocampal formation is also involved in different components of the social repertoire, including social memory, adaptation to new social contexts, and the maladaptive social behavior observed across several psychiatric disorders³⁵. While the hippocampal plasticity defects in the *Fmr1*^{R138Q} mice may not completely explain the social deficits observed in males, it is likely they contribute, at least partially, to such abnormal behavior. Interestingly, we did not measure any significant impairment in the social behavior of female *Fmr1*^{R138Q} mice using the three-chamber test (Fig. 6e, f). Sex differences in the function of the hippocampus including the hippocampal neuronal morphology and synaptic plasticity have been observed in rodents³⁶. For instance, estrogens may interfere and play a protective role in the *Fmr1*^{R138Q} social phenotype³⁷. Indeed, several preclinical, as well as clinical studies reported a neuroprotective role of estrogens in a number of neurodevelopmental disorders^{38–43}, including autism^{39,40}. However, while estrogens may play a protective role contributing to the normal behavior of the *Fmr1*^{R138Q} female mice in the three-chamber test, on the basis of the current behavioral data we cannot exclude that *Fmr1*^{R138Q} female mice still display defects in their social repertoire. Such impairments may be either more subtle in females than in males or revealed by behavioral tasks other than the three-chamber test.

Since most of the knowledge on FXS derives from studies using *Fmr1*-KO models, it is important to compare the phenotype reported in these models with our data on the *Fmr1*^{R138Q} mice. Because the R138Q mutation occurs in the *FMR1* gene, it has been unequivocally associated with the development of an FXS-

like pathology. It is important to stress here that the three unrelated FMRP-R138Q patients show markedly variable phenotypes^{11,13–15}, indicating that the same mutation leads to different clinical features ranging from mild symptoms to a full, complex classical FXS phenotype. Even if some of the defects measured in *Fmr1*^{R138Q} animals are different from those measured in *Fmr1*-KO mice, it is important to notice that they rely on alterations in the same cellular processes, including synaptic elimination and AMPAR-mediated synaptic function, which likely underlie the socio-emotional and cognitive deficits. For instance, an increased spine density and immaturity have been consistently reported in the *Fmr1*-KO hippocampus^{18,19,44,45}. While we also measured an increase in spine density in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus, we did not notice any modification in the overall maturity of the dendritic protrusions. In addition, while the surface levels of AMPARs are significantly increased in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus, it is rather decreased in different brain regions of the *Fmr1*-KO mouse^{46–49}, including the hippocampus. However, alterations in postsynaptic AMPAR surface expression result in impaired basal synaptic transmission in both models⁴⁹ (Fig. 4). Finally, we have shown that the NMDAR-mediated LTP is severely impaired in the *Fmr1*^{R138Q} hippocampus. While LTP impairments have also been reported in the *Fmr1*-KO hippocampus^{50,51}, the molecular mechanisms underlying these defects in *Fmr1*^{R138Q} mice are likely different from those in the *Fmr1*-KO background. We also showed that *Fmr1*^{R138Q} mice display reduced social interaction in the three-chamber test, which is reminiscent of autistic-like features. *Fmr1*^{R138Q} mice are also unable to discriminate between a familiar and a novel object demonstrating that learning and memory processes are impaired in these animals. Similar cognitive and socio-emotional deficits have been reported in the *Fmr1*-KO mice in the same behavioral tasks^{52,53}. Altogether, our data indicate that different mutations in the *FMR1* gene engage distinct molecular mechanisms leading to similar pathological conditions. Therefore, the identification of additional FMRP-R138Q patients will undoubtedly help to shed light on the phenotypic and mechanistic similarities and differences with the classical FXS pathology.

From a therapeutic point of view, it might be of interest to target the AMPARs in the *Fmr1*^{R138Q} brain. The excess of available AMPARs in the *Fmr1*^{R138Q} brain may correlate with the intractable seizures observed in the first-reported patient carrying the R138Q mutation¹³. The FDA-approved anti-epileptic AMPAR antagonist Perampanel⁵⁴ could be used to reduce the activity of these glutamate receptors and treat the epileptic manifestations in FXS patients carrying the R138Q mutation. Preclinical studies are now required to first investigate the epileptic activity in the *Fmr1*^{R138Q} mouse line and then determine if Perampanel can correct the altered AMPAR function, as well as the socio-cognitive behaviors in these mice.

Generating preclinical models for brain disorders is an essential step toward the development of efficient therapies to treat human diseases. In this context, the *Fmr1*^{R138Q} mouse line certainly represents a unique preclinical model to test the efficacy of new molecules and/or the repurposing of existing FDA-approved drugs to correct the altered pathways identified in these mice. This may also lead in the near future to the development of clinical studies to assess the potential benefits of these drugs in FXS patients. Therefore, gaining insights into this complex neurodevelopmental disorder may lead to innovative therapeutic strategies for these particular cases of FXS. Nevertheless, since AMPAR alterations as well as synaptic defects have been linked to other neurodevelopmental disorders, these approaches might be extended to classical FXS patients and more generally to patients presenting ID and ASD in which the AMPAR pathway is altered.

Methods

Mouse lines. *Fmr1^{RI38Q}* mice were successfully generated at the 'Institut Clinique de la Souris' (ICS; Illkirch-Graffenstaden, France) using standard procedures of homologous recombination in murine embryonic C57BL/6N stem (ES) cells (Fig. 1a). *Fmr1^{RI38Q}* mice were backcrossed for more than ten generations into the C57BL/6J genetic background (Janvier, St. Berthevin, France). All animals were handled and treated in accordance with the European Council directives for the Care and Use of Laboratory Animals and following the ARRIVE guidelines. Mice had free access to water and food. Mice were exposed to a 12-h light/dark cycle and the temperature was maintained at 23 ± 1 °C with a relative humidity of 45 to 65%.

Histology and nissl staining. Brains of PND90 WT and *Fmr1^{RI38Q}* male littermates were carefully dissected and frozen in pre-cooled isopentane in liquid nitrogen (-60 °C) for 1 min and stored at -20 °C until cryostat sectioning. Twenty micrometers section containing the hippocampus were then quickly fixed in 4% formaldehyde in PBS. Hippocampal sections were then Nissl stained to reveal the gross architecture of the hippocampus. Fixed sections were first immersed in a cresyl violet solution (5 g L⁻¹ cresyl violet, 0.3% acetic acid) for 2–3 min, then quickly washed in distilled water, and 70% ethanol/0.05% acetic acid. After dehydrating in 100% ethanol, sections were mounted with Entellan and imaged with a 4x lens on a Leica DMD optical microscope.

Golgi-cox staining. WT and *Fmr1^{RI38Q}* male littermates at PND90 were deeply anesthetized by an intraperitoneal injection of 50 mg kg⁻¹ sodium pentobarbital. Mice were then transcardially perfused with a 0.9% NaCl solution (w/v) to remove blood from the vessels. Brains were stained with the FD Rapid GolgiStain Kit (FD NeuroTechnologies) following the manufacturer's instructions. Briefly, tissues were quickly rinsed in ddH₂O and immersed in the impregnation solution for 14 days at RT in the dark. Brains were then transferred to the tissue-protecting solution and kept in the dark at RT for a further 72 h. Hundred-micrometers-coronal section mounted in the tissue-protecting solution on coated slides (2% gelatin, 1% KCr (SO₄)₂) were then air dried at room temperature (RT) for 2 h in the dark. After two 4-min washes in ddH₂O, sections were stained in an ammonium and sodium thiosulfate-containing solution for 10 min. Sections were then dehydrated successively in ethanol with increasing percentage (50 to 100%) and finally, in xylene for 4 min and mounted in Entellan. Images were acquired in the following 48 h using an Axiovert200M videomicroscope (Zeiss) with a 100x oil immersion lens. Z-series of randomly selected basal and apical secondary dendrites from CA1 hippocampal neurons were processed with the Extended Depth of Field plugin of ImageJ. Dendritic spine length, width, and density were measured in ImageJ and data imported in GraphPad Prism software for statistical analysis.

Electron microscopy. WT and *Fmr1^{RI38Q}* male littermates at PND90 were deeply anesthetized by an intraperitoneal injection of 50 mg kg⁻¹ sodium pentobarbital. Mice were transcardially perfused with a 0.9% NaCl solution and then with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.15 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4). Brains were post fixed for an additional 24–48 h at 4 °C. Hippocampi were then manually dissected from 100 μm thick vibratome sections. After washing, they were further fixed in 2% osmium tetroxide, rinsed, stained with 1% uranyl acetate in water for 45 min, dehydrated, and embedded in epoxy resin (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA). Ultrathin 70–90-nm sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, then imaged under a Philips CM10 transmission electron microscope (TEM; FEI, Eindhoven, Netherlands). Images were acquired at a final magnification of 25–34000× using a Morada CCD camera (Olympus, Munster, Germany). Excitatory synapses in the apical dendrite layer of the hippocampal CA1 region were selected for analyses based on the presence of a cluster of presynaptic vesicles, a defined synaptic cleft, and an electron-dense postsynaptic density (PSD). The density of excitatory synapses and presynaptic vesicles, as well as the length and thickness of the PSD, were computed. The average thickness of the PSD was calculated as described in^{55,56}. The estimation of the density of excitatory synapses per μm³ of the hippocampus was computed using a size-frequency stereological method^{56,57}.

Mouse brain lysate preparation. Brain lysates from WT and *Fmr1^{RI38Q}* littermates from the indicated developmental stages (PND3–90) were prepared. Briefly, freshly dissected brains were transferred in five volumes (w/v) of ice-cold sucrose buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.32 M sucrose) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma, 1/100) and homogenized at 4 °C using a Teflon-glass potter. Nuclear fraction and cell debris were pelleted by centrifugation at 1000 g for 10 min. The post nuclear S1 fraction (supernatant) was collected and protein concentration measured using the BCA protein assay (Biorad).

Total mRNA analysis. Total RNA was extracted from PND90 WT and *Fmr1^{RI38Q}* brains with the Trizol reagent (Sigma) according to the manufacturer's recommendations. RNA was then purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). RT was performed on 1 μg of RNA with the Superscript IV synthesis kit (Invitrogen). Quantitative PCR (qPCR) was performed on a Light Cycler 480 (Roche) with MasterMix SYBRGreen (Roche) using specific oligonucleotides (Supplementary Table 1) and following the manufacturer's instructions.

Primary neuronal cultures. The protocol to prepare primary neuronal cultures from mouse embryos was approved by the National Animal Care and Ethics Committee (Project reference APAFIS#18648-20190111154666). Hippocampal neurons were prepared from WT and *Fmr1^{RI38Q}* embryonic (E15.5) C57BL/6 mice. Neurons were plated in Neurobasal medium (Invitrogen, France) supplemented with 2% B27 (Invitrogen), 0.5 mM glutamine, and penicillin/streptomycin (Ozyme) on 60-mm dishes or 16-mm glass coverslips (VWR) pre-coated with Poly-L-Lysine (0.5 mg mL⁻¹; Sigma). Neurons (600,000 cells per 60-mm dish or 80,000 cells per 16-mm coverslip) were then used at 14–15 DIV.

Sindbis virus production and neuronal transduction. Attenuated Sindbis viral particles (SINrep(nsP2S726)) were prepared by generating cRNAs from the pSin-Rep5 plasmid (Invitrogen) containing the sequence coding for eGFP and from the defective helper (pDH-BB) plasmid^{58,59} using the Mmessage Mmachine SP6 solution (Ambion). Both cRNAs were then electroporated into BHK21 cells. Pseudovirions present in the culture medium were harvested 48 h after electroporation and ultracentrifuged on a SW41Ti. Aliquots of concentrated Sindbis particles were titrated and stored at -80 °C until use. Neurons were transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 and incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 20 h until use.

Biotinylation assays⁶⁰. Live Tetrodotoxin (TTX, 0.5 μM)-treated control or treated *Fmr1^{RI38Q}* hippocampal neurons (14–15 DIV) were surface biotinylated for 10 min at 4 °C on ice using the membrane impermeant Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce, 0.3 mg mL⁻¹ in PBS). After three washes in ice-cold PBS, neurons were incubated with NH₄Cl (50 mM in PBS) for 5 min at 4 °C to quench the remaining unbound biotin. After three more washes in PBS, cells were lysed in extraction buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 1%, SDS 0.1%, mammalian protease inhibitor cocktail 1%) for 1 h at 4 °C. After sonication and centrifugation (16,000 g for 15 min at 4 °C), supernatants containing an equal amount of protein were incubated with 50 μl streptavidin beads for 3 h to overnight at 4 °C to immunoprecipitate the surface-biotinylated proteins. After four washes in extraction buffer, proteins were eluted from the streptavidin beads by boiling in reducing sample buffer containing 5% β-mercaptoethanol and then resolved by SDS-PAGE and immunoblotting using the indicated antibodies. Standard GAPDH controls were included to ensure that there was no intracellular biotinylation. Bands were quantified using ImageJ and normalized as indicated in the figure legends.

BS3-crosslinking assays⁵⁶. Hippocampi from WT and *Fmr1^{RI38Q}* male littermates were included in agar. Two hundred fifty-micrometer-thick hippocampal slices were prepared in ice-cold oxygenated (5% CO₂, 95% O₂) sucrose solution (2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 10 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 11 mM glucose, 234 mM sucrose). Free-floating hippocampal slices were first pretreated with TTX in ECS solution (140 mM NaCl, 1.3 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 33 mM glucose, Tris buffered to pH 7.4, TTX 1 μM) for 10 min at 37 °C and then incubated in ECS or cLTP²¹ solutions. LTP was chemically induced with 200 μM glycine, 20 μM bicuculline, and 1 μM strychnine in pre-warmed ECS for 3 min. After a 20-min washout in ECS, slices were incubated in the cell membrane-impermeable BS3 crosslinker (PierceNet) that was prepared as a 52 mM stock solution in 5 mM sodium citrate buffer pH 5 and added onto hippocampal slices at a final concentration of 2 mM, for 30 min at 4 °C with gentle agitation. Glycine (100 mM) was then added for 10 min at 4 °C to quench the remaining unbound BS3. Slices were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, mammalian protease inhibitor cocktail 1%) for 1 h at RT. After sonication and centrifugation at 16,000 g for 15 min, protein concentration was measured using the BCA protein assay (Bio-Rad). Proteins (20 μg) were resolved on 7% acrylamide SDS-PAGE gels and blotted for GluA1 and GluA2. Standard β3-tubulin controls were included to ensure that intracellular proteins were not BS3 crosslinked. Bands were quantified using ImageJ software (NIH). A surface/intracellular ratio was performed to analyze the levels of surface GluA1 and GluA2 expression.

Immunoblotting. Protein extracts were resolved by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane (BioTraceNT, PALL), immunoblotted with the following primary antibodies: mouse anti-FMRP¹⁸ 1 μg/mL (DSFB, Clone 2F5-1); Rabbit anti-GluA1 C-terminal 1/1000 (Merk-Millipore #AB1504); Rabbit anti-GluA2 C-terminal 1/2000 (Synaptic System #182103); Rabbit anti-Homer1 1/1000 (Synaptic Systems #160003); Mouse anti-PSD95 1/10000 (NeuroMab #75-028 clone K28/43); Goat anti-GluN1 1/500 (Santa-Cruz #sc-1467); Mouse anti-Synapsin1a/b 1/500 (Santa-Cruz #sc-376623); Rabbit anti-GAD65/67 1/500 (Merk-Millipore #ABN904); Rabbit anti-CaMKII 1/500 (Santa-Cruz #sc-9035); Rabbit anti-Arc 1/1000 (Synaptic Systems #156003); Mouse anti-Gephyrin 1/1000 (Synaptic System #147111); Rabbit anti-vGluT1 1/5000 (Synaptic System #135303). Standard loading controls were included using a rabbit anti-GAPDH antibody 1/25000 (Sigma #G9545) or a rabbit anti-β3 Tubulin 1/25000 (Synaptic Systems #302302) as indicated. Proteins were revealed using the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (GE healthcare #NA931V and #NA934V). Proteins were then identified using Immobilon Western (Millipore) chemiluminescent solution and images

acquired on a Fusion FX7 system (Vilber Lourmat). Full-size blots for cropped gels are shown in the Source data file.

Immunolocalization of surface-expressed GluA1 AMPAR subunits. Live TTX-treated WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal neurons (14–15 DIV) were incubated with a mouse monoclonal anti-N-terminal GluA1 antibody (1:100; Merk-Millipore #MAB2263) for 10 min at RT. After three washes, the neurons were quickly fixed in PBS containing 3.7% formaldehyde and 5% sucrose for 5 min at RT. Cells were then thoroughly rinsed and incubated with a non-permeabilizing blocking solution (0.2% BSA, 5% HS in PBS) for 30 min. Neurons were then stained for 1 h at RT with the appropriate secondary antibodies (ThermoFisher/Invitrogen #A-21202 and #A-21203; 1:200) conjugated to Alexa488 or 594 as indicated in PBS containing 0.2% BSA. Neurons were then further fixed for 10 min in PBS containing 3.7% formaldehyde and 5% sucrose to stabilize the surface-associated secondary antibodies. After a 30-min blocking/permeabilizing step in PBS containing 0.2% BSA, 0.2% Triton X-100, and 5% HS, neurons were incubated with guinea pig anti-MAP2 (1/1000; Synaptic systems #188004) antibodies overnight at 4 °C. Cells were then washed three times in PBS and incubated with the indicated secondary Alexa-conjugated antibodies for 1 h at RT, mounted with Mowiol (Sigma), and stored at –20 °C until confocal examination. The overall surface GluA1 intensity which represents the fluorescence associated with the GluA1 antibody labeling was then measured, as well as the density of surface GluA1 clusters, which rather correlates with the distribution of the surface-expressed AMPARs at synapses along dendrites since GluA1 is generally concentrated to dendritic spines.

For STED imaging, live TTX-treated neurons were incubated with either a mouse monoclonal anti-N-terminal GluA1 (1/40, Merk-Millipore #MAB2263) or GluA2 (1/30, Merk-Millipore #MAB397) antibodies and treated or not for cLTP as above. To visualize the surface-expressed subunits, neurons were labeled with the appropriate secondary antibodies conjugated to the StarRED dye (Abberior GmbH STRED-1001; 1/100) prior to the permeabilization step and staining for Homer1 with a rabbit anti-Homer1 (1/500; Synaptic System). Coverslips were mounted in Abberior Mount Solid Antifade (Abberior GmbH, Göttingen). STED images were acquired using a Leica SP8 STED 3X (Leica Microsystems, Nanterre), at 400 Hz through a 100x/1.4 NA Oil objective using the Leica LAS X software. Z-stack of confocal images of Homer1 immunolabelled with Alexa594-labeled secondary antibodies were obtained by a laser excitation at 561 nm and combined with a STED image acquisition of surface GluA1 or GluA2 immunostained with a StarRed Fluorophore excited at 633 nm and depleted at 775 nm (20–30% of power). Z-stack of 2D STED images had a 20 × 20 × 200-nm voxel size and all images were deconvolved using Huygens Professional (v18.10, Scientific Volume Imaging, The Netherlands) and the CML algorithm with respectively SNR:20 and SNR:14 for the confocal and STED images with 40 iterations.

Analysis of synaptic AMPAR nanodomains. Deconvolved Z-stack images of confocal Homer1-Alexa594/STED GluA1/2-StarRed were analyzed using a home-made macro program in FIJI software⁴⁸ to quantify the levels of surface-expressed GluA1 and GluA2 on dendritic spines. Deconvolved Z-stacks were first converted to 2D images by a sum projection. The Homer1 image was then segmented (Median filtering, intensity thresholding, Watershed) to delineate mature dendritic spines with a diameter criterion (>250 nm). Corresponding Spine Regions of Interest (SROI) obtained was first used to measure the intensity of the surface GluA1/2 staining below this SROI on GluA1/2 images. Then the number of nanodomains per spine was counted by an individual SROI screening on GluA1/2 images: each SROI was duplicated to give a small surface GluA1/2 image per spine and segmented. The number of surface-associated GluA1 and GluA2 nanodomains detected per spine in secondary dendrites was incremented according to a size criterion, assuming a maximum size of 90 nm. Data were then imported in GraphPad Prism software for statistical analysis.

Imaging and analysis of spine morphology. WT and *Fmr1^{R138Q}* hippocampal neurons were transfected at 14 DIV with Sindbis virus (MOI of 0.1) expressing free eGFP for 20 h before fixation in PBS containing 3.7% formaldehyde and 5% sucrose for 20 min at RT. Cells were then mounted in Mowiol as above. Confocal images were acquired through a 63x oil objective (numerical aperture NA 1.4) on a laser scanning confocal microscope LSM780 (Carl Zeiss, Marly-le-Roy, France). The 488-nm laser power and detection gain (510–550 nm range) were adjusted to avoid signal saturation. Z-stacks of three to five images of randomly selected GFP-expressing secondary dendrites were compressed into two dimensions using a maximum projection with the ImageJ software. Maximal Intensity Projection images were imported into NeuronStudio⁶¹ for the automatic detection of the dendritic spines. The length of individual spines was automatically measured and data were imported in GraphPad Prism software for statistical analysis.

mEPSC patch-clamp recordings. Mice were anesthetized (Ketamine 150 mg kg⁻¹ / Xylazine 10 mg kg⁻¹) and transcardially perfused with aCSF for slice preparation. Two hundred fifty-micrometer-thick acute transverse hippocampal slices were prepared. In ice-cold dissecting solution (234 mM sucrose, 2.5 mM KCl, 0.5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, and 11 mM D-glucose) oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂ at pH 7.4. Slices were first incubated

for 1 h at 37 °C in aCSF (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 1.3 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, and 11 mM D-glucose) oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂ at pH 7.4. Slices were used after recovering for another 30 min at RT. Visualized whole-cell voltage-clamp recording techniques were used to measure AMPAR miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs), using an upright microscope (Olympus France). Whole-cell recordings were performed using a Multiclamp 700B (Molecular Devices, UK) amplifier, under the control of pClamp10 software (Molecular Devices, UK). Slices were kept at 32–34 °C in a recording chamber perfused with 2.5 ml min⁻¹ aCSF (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 2 mM MgSO₄, 4 mM CaCl₂, and 11 mM D-glucose) oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂. Picrotoxin (50 μM; Sigma-Aldrich, France) to block GABAergic transmission and TTX (0.5 μM; Abcam, France) to block sodium channels were added to the aCSF perfusion solution. Recording pipettes (5–6 MΩ) for voltage-clamp experiments were filled with a solution containing 117.5 mM Cs-gluconate, 15.5 mM CsCl, 10 mM TEACl, 8 mM NaCl, 10 HEPES, 0.25 mM EGTA, 4 mM MgATP, and 0.3 NaGTP (pH 7.3; Osmolarity 290–300 mOsm). Whole-cell patch-clamp configuration was established at a Voltage holding (Vh) of –65 mV, and cells were left to stabilize for 2–3 min before recordings. Holding current and series resistance were continuously monitored throughout the recordings and, if either of these parameters varied by more than 20%, the experiment was discarded. At least 100 events were obtained from each cell. Experiments and analysis were done blind to the genotype. Recordings were analyzed using the Clampfit software by applying a threshold search to detect spontaneous events. The threshold for AMPAR mEPSCs detection was set at –9 pA to exclude electric noise contamination.

Slice preparation and LTP electrophysiological recordings. WT and *Fmr1^{R138Q}* male littermate (PND35–42) brains were incubated for 4 min in ice-cold sucrose cutting solution (19.99 mM KCl, 260 mM NaHCO₃, 11.5 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucose, 220 mM sucrose, 0.2 mM CaCl₂, 6 mM MgCl₂) gassed with carbogen (95% O₂ + 5% CO₂; pH 7.4 at 37 °C; 290–310 mosmol L⁻¹). Sagittal hippocampal slices (350 μm) were then incubated in standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF; 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.3 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 1 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃). Slices were allowed to recover at 35 °C for 45 min, continuously oxygenated with carbogen, and then for 45 min at RT. Recordings were performed in ACSF continuously oxygenated with carbogen at 33–35 °C in a submerged recording chamber perfused at a low rate (1.8 ml min⁻¹). Glass microelectrodes (tip diameter 5–10 μm; resistance: 0.2–0.3 Ω) were filled with ACSF. Field recordings were performed using MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices, Foster City, CA, USA) and Clampfit software. Schaffer collaterals in the CA1 region were stimulated using a bipolar electrode and recorded in the *stratum radiatum* of the CA1. A baseline of 10 min was recorded in the current-clamp mode with a single stimulation at 0.1 Hz every 10 s. LTP was induced by high-frequency stimulation (3 × 100 Hz for 1 s, 30 s inter burst), and recorded at 0.1 Hz stimulation rate for 50 min. The analysis was performed using the Clampfit software (Molecular Device). Along with the 0.1 Hz stimulations, fiber volley (FV) and synaptic response slopes were calculated and normalized to the baseline levels. Experiments were done blind to the genotype. To assess for synaptic changes, the EPSP/FV slope ratio was calculated and averaged for 1-min time periods. Quantification and statistical comparisons were computed by comparing the EPSP/FV ratios obtained at 40–50 min after induction to the baseline level.

Behavioral tasks. All experiments were performed between 9:00 a.m. and 4:30 p.m. Both male and female WT and *Fmr1^{R138Q}* mice were tested. The experiments were approved by the Italian Ministry of Health (Rome, Italy; Authorization number: 87-2019-PR) and performed in agreement with the ARRIVE guidelines, with the guidelines released by the Italian Ministry of Health (D.L. 26/14) and the European Community Directive 2010/63/EU. All behavioral experiments were performed and scored blind to the genotype. Data are expressed as mean ± s.e.m.

Locomotor activity. At PND40–45, during the habituation session of the novel object recognition test, locomotor activity was calculated using a grid that divides the arena into equally sized squares and that is projected over the recordings. The number of line crossings made by the animal was quantified to assess its motor activity.

The Isolation-induced ultrasonic vocalizations (USVs) test. The test was performed as previously described¹⁹. Briefly, each pup (PND7) was individually removed from the nest and placed into a black Plexiglas arena, located inside a sound-attenuating and temperature-controlled chamber. USVs from the pups were detected for 3 min by an ultrasound microphone (Avisoft Bioacoustics, Germany) sensitive to frequencies between 10 and 250 kHz and fixed at 10 cm above the arena. Pup axillary temperature was measured before and after the test by a digital thermometer. The emission of USVs was analyzed using Avisoft Recorder software (Version 5.1).

Novel object recognition test. The novel object recognition test was performed at PND40–45. The test consisted of three phases: habituation, training, and test. In the habituation phase, the animals were allowed to explore an empty arena (a Plexiglas arena measuring 40 × 40 × 40 cm³) for 5 min. Twenty-four hours later, on

the training trial, each mouse was individually placed into the arena containing two identical objects (A1 and A2), equidistant from each other, and allowed to explore the objects for 10 min. After 1 h, during the test phase, one copy of the familiar object (A3) and a new object (B) was placed in the same location as during the training trial. The time spent exploring each object was recorded for 5 min. The discrimination index was calculated as the difference in time exploring the novel and the familiar objects, expressed as the percentage ratio of the total time spent exploring both objects⁶².

Three-chamber test. This test was performed at PND40–45. The apparatus was a rectangular three-chamber box, with two lateral chambers (20.5 (length) × 41 (width) × 22.5 (height) cm) connected to a central chamber (20 (length) × 41 (width) × 22.5 (height) cm). Each lateral chamber contained a small Plexiglas cylindrical cage. Each experimental mouse was individually allowed to explore the central compartment for 5 min with both doors closed. Next, each experimental mouse was individually allowed to explore the apparatus for 10 min and then confined in the central compartment. An unfamiliar stimulus animal was confined in a cage located in one chamber of the apparatus, while the cage in the other chamber was left empty. Both doors to the side chambers were then opened, allowing the experimental animal to explore the apparatus for 10 min. The percentage of time spent in the social approach (sniffing the stimulus animal) and the discrimination index were scored using the Observer XT, version 12.0 software (Noldus Information Technology, The Netherlands). The discrimination index was calculated as the difference in time exploring the stimulus and the empty cage, expressed as the percentage ratio of the total time spent exploring both the stimulus and empty cage.

Data manipulation and statistical analysis. Statistical analyses were calculated using GraphPad Prism (v7.0; GraphPad Software, Inc) or Sigma Plot (v13.0; Systat Software, Inc, USA) software. All data are expressed as mean ± s.e.m. Unpaired *t* test (Figs. 2c, 3a, 4, 5c, d, k and Supplementary Figs. 1b and 3), Ratio *t* test (Figs. 3c, d, 5b, h and Supplementary Fig. 4) or non-parametric Mann–Whitney test (Figs. 2a, b, 3b, 5e and supplementary Fig. 2) were used to compare medians of two data sets. Statistical significance for multiple comparison data sets was computed two-way ANOVA with Sidak's post test (Fig. 1b). Behavioral data (Fig. 6 and Supplementary Fig. 6) were analyzed by two-way ANOVA including genotype and sex as factors with a Newman–Keuls post hoc test for individual group comparisons. Normality for all groups was verified using the Shapiro–Wilk test. For electrophysiological data, distributions were analyzed by a Kolmogorov–Smirnov test (Fig. 4). **p* < 0.05 was considered significant.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. The B6N *Fmr1*^{R138Q} line is available to the scientific community via the Mouse Clinical Institute (ICS, Illkirsh, France; <http://www.ics-mci.fr/en/>), or the INFRAFRONTIER consortium (the European Research Infrastructure for phenotyping and archiving of model mammalian genomes (<https://www.infrafrontier.eu/>)). Source data are provided with this paper.

Received: 6 April 2020; Accepted: 16 February 2021;

Published online: 10 March 2021

References

- Bassell, G. J. Fragile balance: RNA editing tunes the synapse. *Nat. Neurosci.* **14**, 1492–1494 (2011).
- Wang, L. W., Berry-Kravis, E. & Hagerman, R. J. Fragile X: leading the way for targeted treatments in autism. *Neurotherapeutics* **7**, 264–274 (2010).
- Darnell, J. C. & Klann, E. The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat. Neurosci.* **16**, 1530–1536 (2013).
- Prieto, M., Folci, A. & Martin, S. Post-translational modifications of the Fragile X Mental Retardation Protein in neuronal function and dysfunction. *Mol. Psychiatry* **25**, 1688–1703 (2020).
- Santorio, M. R., Bray, S. M. & Warren, S. T. Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annu. Rev. Pathol.* **7**, 219–245 (2012).
- Yan, Z., Kim, E., Datta, D., Lewis, D. A. & Soderling, S. H. Synaptic actin dysregulation, a convergent mechanism of mental disorders? *J. Neurosci.* **36**, 11411–11417 (2016).
- Maurin, T., Zongaro, S. & Bardoni, B. Fragile X Syndrome: from molecular pathology to therapy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **46**(Pt 2), 242–255 (2014).
- De Boule, K. et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat. Genet.* **3**, 31–35 (1993).
- Feng, Y. et al. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol. Cell* **1**, 109–118 (1997).
- Zang, J. B. et al. A mouse model of the human Fragile X syndrome I304N mutation. *PLoS Genet.* **5**, e1000758 (2009).
- Collins, S. C. et al. Identification of novel FMR1 variants by massively parallel sequencing in developmentally delayed males. *Am. J. Med. Genet. A* **152A**, 2512–2520 (2010).
- Myrick, L. K., Hashimoto, H., Cheng, X. & Warren, S. T. Human FMRP contains an integral tandem Agenet (Tudor) and KH motif in the amino terminal domain. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 1733–1740 (2015).
- Myrick, L. K. et al. Independent role for presynaptic FMRP revealed by an FMR1 missense mutation associated with intellectual disability and seizures. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 949–956 (2015).
- Sitzmann, A. F., Hagelstrom, R. T., Tassone, F., Hagerman, R. J. & Butler, M. G. Rare FMR1 gene mutations causing fragile X syndrome: a review. *Am. J. Med. Genet. A* **176**, 11–18 (2018).
- Diaz, J., Scheiner, C. & Leon, E. Presentation of a recurrent FMR1 missense mutation (R138Q) in an affected female. *Transl. Sci. Rare Dis.* **3**, 139–144 (2018).
- Lu, R. et al. The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 15201–15206 (2004).
- Patel, A. B., Loerwald, K. W., Huber, K. M. & Gibson, J. R. Postsynaptic FMRP promotes the pruning of cell-to-cell connections among pyramidal neurons in the L5A neocortical network. *J. Neurosci.* **34**, 3413–3418 (2014).
- Khayachi, A. et al. Sumoylation regulates FMRP-mediated dendritic spine elimination and maturation. *Nat. Commun.* **9**, 757 (2018).
- Maurin, T. et al. Involvement of phosphodiesterase 2A activity in the pathophysiology of fragile X syndrome. *Cereb. Cortex* **29**, 1–12 (2018).
- Nair, D. et al. Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *J. Neurosci.* **33**, 13204–13224 (2013).
- Lu, W. et al. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **29**, 243–254 (2001).
- Groc, L. & Choquet, D. Linking glutamate receptor movements and synapse function. *Science* **368**, eaay4631 (2020).
- Alpatov, R. et al. A chromatin-dependent role of the fragile X mental retardation protein FMRP in the DNA damage response. *Cell* **157**, 869–881 (2014).
- MacGillavry, H. D., Song, Y., Raghavachari, S. & Blanpied, T. A. Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic AMPA receptors. *Neuron* **78**, 615–622 (2013).
- Lu, W. et al. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* **62**, 254–268 (2009).
- Hanley, J. G. Subunit-specific trafficking mechanisms regulating the synaptic expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Semin. Cell Dev. Biol.* **27**, 14–22 (2014).
- Purkey, A. M. & Dell'Acqua, M. L. Phosphorylation-dependent regulation of Ca(2+)-permeable AMPA receptors during hippocampal synaptic plasticity. *Front. Synaptic Neurosci.* **12**, 8 (2020).
- Penn, A. C. et al. Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors. *Nature* **549**, 384–388 (2017).
- Zhang, H. et al. Modulation of AMPA receptor surface diffusion restores hippocampal plasticity and memory in Huntington's disease models. *Nat. Commun.* **9**, 4272 (2018).
- Deng, P. Y. et al. FMRP regulates neurotransmitter release and synaptic information transmission by modulating action potential duration via BK channels. *Neuron* **77**, 696–711 (2013).
- Sailer, C. A. et al. Immunolocalization of BK channels in hippocampal pyramidal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 442–454 (2006).
- Bonnycastle, K., Kind, P. C. & Cousin, M. A. FMRP sustains presynaptic function via control of activity-dependent bulk endocytosis. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.09.10.291062> (2020).
- Winters, B. D., Saksida, L. M. & Bussey, T. J. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **32**, 1055–1070 (2008).
- Cohen, S. J. & Stackman, R. W. Jr. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav. Brain Res.* **285**, 105–117 (2015).
- Montagrin, A., Saiote, C. & Schiller, D. The social hippocampus. *Hippocampus* **28**, 672–679 (2018).
- Koss, W. A. & Frick, K. M. Sex differences in hippocampal function. *J. Neurosci. Res.* **95**, 539–562 (2017).
- Pinares-Garcia, P., Stratikopoulos, M., Zagato, A., Loke, H. & Lee, J. Sex: a significant risk factor for neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Brain Sci.* **8**, 154 (2018).

38. Crider, A. & Pillai, A. Estrogen signaling as a therapeutic target in neurodevelopmental disorders. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **360**, 48–58 (2017).
39. Gockley, J. et al. The female protective effect in autism spectrum disorder is not mediated by a single genetic locus. *Mol. Autism* **6**, 25 (2015).
40. Lai, M. C., Baron-Cohen, S. & Buxbaum, J. D. Understanding autism in the light of sex/gender. *Mol. Autism* **6**, 24 (2015).
41. Dewing, P. et al. Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. *Curr. Biol.* **16**, 415–420 (2006).
42. Dewing, P., Shi, T., Horvath, S. & Vilain, E. Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **118**, 82–90 (2003).
43. Ervin, K. S. et al. Estrogen involvement in social behavior in rodents: rapid and long-term actions. *Horm. Behav.* **74**, 53–76 (2015).
44. Antar, L. N., Li, C., Zhang, H., Carroll, R. C. & Bassell, G. J. Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* **32**, 37–48 (2006).
45. Grossman, A. W., Eliseseu, N. M., McKinney, B. C. & Greenough, W. T. Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brain Res.* **1084**, 158–164 (2006).
46. Costa, L. et al. Activation of 5-HT7 serotonin receptors reverses metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic plasticity in wild-type and Fmr1 knockout mice, a model of Fragile X syndrome. *Biol. Psychiatry* **72**, 924–933 (2012).
47. Gross, C. et al. Excess phosphoinositide 3-kinase subunit synthesis and activity as a novel therapeutic target in fragile X syndrome. *J. Neurosci.* **30**, 10624–10638 (2010).
48. Henderson, C. et al. Reversal of disease-related pathologies in the fragile X mouse model by selective activation of GABAB receptors with arbaclofen. *Sci. Transl. Med.* **4**, 152ra128 (2012).
49. Suvrathan, A., Hoeffler, C. A., Wong, H., Klann, E. & Chattarji, S. Characterization and reversal of synaptic defects in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 11591–11596 (2010).
50. Lauterborn, J. C. et al. Brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic plasticity in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci.* **27**, 10685–10694 (2007).
51. Lee, H. Y. et al. Bidirectional regulation of dendritic voltage-gated potassium channels by the fragile X mental retardation protein. *Neuron* **72**, 630–642 (2011).
52. McNaughton, C. H. et al. Evidence for social anxiety and impaired social cognition in a mouse model of fragile X syndrome. *Behav. Neurosci.* **122**, 293–300 (2008).
53. Mines, M. A., Yuskaitis, C. J., King, M. K., Beurel, E. & Jope, R. S. GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PLoS ONE* **5**, e9706 (2010).
54. Ceolin, L. et al. A novel anti-epileptic agent, perampanel, selectively inhibits AMPA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Neurochem. Int.* **61**, 517–522 (2012).
55. Dosemeci, A. et al. Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 10428–10432 (2001).
56. Folci, A. et al. Myosin IXa binds AMPAR and regulates synaptic structure, LTP, and cognitive function. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, 1 (2016).
57. DeFelipe, J., Marco, P., Busturia, I. & Merchan-Perez, A. Estimation of the number of synapses in the cerebral cortex: methodological considerations. *Cereb. Cortex* **9**, 722–732 (1999).
58. Martin, S., Bouschet, T., Jenkins, E. L., Nishimune, A. & Henley, J. M. Bidirectional regulation of kainate receptor surface expression in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **283**, 36435–36440 (2008).
59. Schorova, L. et al. The synaptic balance between sumoylation and desumoylation is maintained by the activation of metabotropic mGlu5 receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 3019–3031 (2019).
60. Martin, S. & Henley, J. M. Activity-dependent endocytic sorting of kainate receptors to recycling or degradation pathways. *Embo J.* **23**, 4749–4759 (2004).
61. Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dickstein, D. L., Hof, P. R. & Wearne, S. L. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS ONE* **3**, e1997 (2008).
62. Campolongo, P. et al. Novelty-induced emotional arousal modulates cannabinoid effects on recognition memory and adrenocortical activity. *Neuropsychopharmacology* **38**, 1276–1286 (2013).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the ‘Fondation pour la Recherche Médicale’ (Equipe labellisée #DEQ20140329490 to BB and ‘Fin de thèse’ #FDT202012010480 to MP), the ‘Agence Nationale de la Recherche’ (ANR-20-CE16-0006-01 to SM, ANR-20-CE16-0006-02 to YH, and ANR-20-CE16-0016-01 to BB), the ‘Jérôme Lejeune’ (SM, VT), ‘Fondation pour la Recherche sur le Cerveau’ (AO2018, BB), the IDEX UCA^{led} interdisciplinary master program (CG), and ‘Bettencourt-Schueller’ (SM) foundations for financial support. We also thank the French government for the ‘Investments for the Future’ LabEx ‘SIGNA-LIFE’ (ANR-11-LABX-0028-01), LabEx ‘ICST’ (ANR-11-LABX-0015-01), and the IDEX UCA^{led} ANR-15-IDEX-01, as well as the CG06 (AAP santé), GIS IBI SA (AO 2014), and ‘Région Provence-Alpes-Côte d’Azur’ for the ‘Microscopy and Imaging Côte d’Azur’ (MICA) platform funding. MPri is a fellow from the international Ph.D. ‘SIGNA-LIFE’ program.

Author contributions

M. Prieto performed Golgi assays and all the spine density analysis in hippocampal cultures and slices. A.F., M. Pronot, and M. Prieto achieved all biotinylation and crosslinking assays. A.F., M. Prieto, M. Pronot, and G.P. performed all biochemical experiments on total lysates. A.F., M. Pronot, and M. Prieto performed all the immunocytochemistry. M. Prieto and G.P. monitored the growth and fertility of the *Fmr1*^{R138Q} mouse line. A.F., G.P., M. Pronot, and M. Prieto prepared neuronal cultures. G.P. purified primary antibodies and with A.F., M. Prieto, M.C., and M. Pronot, performed some hippocampal slice preparations. S.A. imaged the STED experiments. F.B. provided computational tools to analyze imaging data. P.P. performed and analyzed mEPSCs experiments in hippocampal slices. M.C. and E.D. performed some electrophysiological recordings. M. Prieto prepared brains for EM experiments. N.L. and M.F. performed and analyzed EM. V.B. and S.S. performed and analyzed behavioral experiments. V.T. provided guidance and analysis of behavioral data. U.F. performed the electrophysiological synaptic plasticity experiments and Y.H. analyzed the data and supervised the work. S.C. performed RNA experiments. B.B. provided specific mRNA probes and RNA work supervision. A.K. and C.G. performed some initial experiments. M. Prieto, A.F., and S.M. contributed to hypothesis development, experimental design, and data interpretation. S.M. provided the overall supervision, the funding, and wrote the original draft. All authors commented on the manuscript. S.M. edited the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21820-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.M.

Peer review information *Nature Communications* thanks Julie Perroy and the other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Annexe 4

Bidirectional regulation of synaptic deSUMOylation by Group I metabotropic glutamate receptors

(En préparation)

Pronot M¹, Poupon G¹, Pizzamiglio L¹, Schorova L¹, Prieto M¹, Folci A¹, Lebel Q¹, Gwizdek C¹, Brau F¹ & Martin S².

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, France.

² Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France.

La SUMOylation joue un rôle central dans la régulation du développement, de la transmission et de la plasticité synaptique. L'équilibre SUMOylation/déSUMOylation est orchestré par l'action coordonnée de la seule enzyme de conjugaison de SUMO Ubc9 et des enzymes de déconjugaison de SUMO appelées SENP. Une régulation étroite de cet équilibre est donc essentielle au fonctionnement du cerveau et sa perturbation est associée à plusieurs troubles neurologiques. Nous avons précédemment démontré qu'une brève activation des mGlu5R piège transitoirement Ubc9 aux post-synapses, ce qui entraîne une augmentation rapide de la SUMOylation synaptique globale et des changements dans l'excitabilité neuronale. Une activation soutenue des mGlu5R entraîne une accumulation post-synaptique de SENP1 et un rétablissement de la SUMOylation synaptique basale. Étant donné que ces deux processus sont contrôlés par l'activation des mGlu5R mais à des échelles de temps différentes, d'autres mécanismes doivent coexister pour réguler cet équilibre spatio-temporel. En combinant technique d'imagerie en temps réel et d'approches biochimiques et pharmacologiques, nous avons mis en évidence une régulation bidirectionnelle de la déSUMOylation synaptique par les mGluRs du groupe I. Nous avons montré l'importance de l'activation de la PKC et de la CaMKII ainsi dans la redistribution synaptique de SENP1. Dans l'ensemble, notre travail a permis de fournir des informations supplémentaires sur les mécanismes de régulation séquentiels dépendants de l'activité qui conduisent à l'homéostasie synaptique de la SUMOylation.

Bidirectional regulation of synaptic desumoylation by Group 1 metabotropic glutamate receptors

Marie Pronot¹, Gwénola Poupon¹, Lara Pizzamiglio¹, Lenka Schorova¹, Marta Prieto¹, Alessandra Folci¹, Quentin Lebel¹, Carole Gwizdek¹, Frédéric Brau¹, and Stéphane Martin^{2,*}

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, France.

² Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France.

*Correspondence to: Stéphane Martin (martin@ipmc.cnrs.fr)

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7275, Université Côte d'Azur, 660 route des lucioles, 06560 Valbonne, France.

Phone: (33) 49395-3461

ORCID: 0000-0001-6771-7645

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the 'Fondation pour la Recherche Médicale' for the 4th year PhD fellowship #FDT202012010480 to MP and the 'Agence Nationale de la Recherche' (ANR-20-CE16-0006-01 to SM) for financial support. We also thank the French government for the 'Investments for the Future' LabEx 'SIGNALIFE' (ANR-11-LABX-0028-01), and the IDEX UCAJedi ANR-15-IDEX-01 as well as the CG06 (AAP santé), GIS IBiSA (AO 2014) and 'Région Provence-Alpes-Côte d'Azur' for the 'Microscopy and Imaging Côte d'Azur' (MICA) platform funding.

Abstract

Sumoylation is a post-translational modification essential to all cell function. In this context, a tightly controlled equilibrium between sumoylation and desumoylation processes is also critical to the neuronal function including neurotransmitter release and synaptic plasticity. Disruption of the sumoylation homeostasis in neurons has been associated with several neurological disorders. The balance between the sumoylation and desumoylation of substrate proteins is governed by the opposite activity of the sole SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and a group of desumoylation enzymes called SENPs respectively. We previously showed that the activation of type 5 metabotropic glutamate receptors (mGlu5R) triggers the transient trapping of Ubc9 in dendritic spines, leading to a rapid increase in the overall synaptic sumoylation. We also reported that the desumoylase activity of SENP1 at the post-synapse is triggered by a sustained activation of these receptors allowing the increased synaptic sumoylation to get back to resting levels. Here we combined the use of pharmacological tools with subcellular fractionation and live-cell imaging of individual hippocampal spines to demonstrate that the synaptic accumulation of the desumoylation enzyme SENP1 is bidirectionally controlled by the activation of type 1 mGlu1 and mGlu5 receptors. Indeed, the pharmacological blockade of mGlu1R activation during type 1 mGluR stimulation leads to a sharp increase in the level of SENP1 accumulation at synapses indicating that mGlu1R acts as a brake to the mGlu5R-dependent desumoylation process at the post-synapse. Altogether, our findings reveal that type 1 mGluRs work in opposition to dynamically maintain the homeostasis of sumoylation at the mammalian synapse.

Keywords: Sumoylation, SENP1, synapse, PKC, CaMKII, mGlu1 and mGlu5 receptors

Introduction

Neuronal transmission takes place in highly specialized structures called synapses. Post-translational modifications (PTMs) play an essential role in synaptic communication by dynamically regulating protein-protein interactions at both pre- and postsynaptic sites. In the past decade, the PTM sumoylation has emerged as a key regulator of the neuronal and synaptic function [1, 2]. Sumoylation consists in the covalent, but reversible, conjugation of the Small Ubiquitin-like MOdifier (SUMO1-3) polypeptides (~100 amino acids; ~11 kDa) to specific lysine residues of substrate proteins [3, 4]. It participates in the dynamic regulation of multi-protein complexes by creating new binding sites for specific interactors or alternatively, by disrupting or preventing protein-protein interactions [5]. Sumoylation regulates the function of several extranuclear proteins involved in neuronal excitability [6-8], postsynaptic differentiation [9] as well as in synaptic transmission and plasticity [10-12].

A tight equilibrium between sumoylation and desumoylation is constantly maintained and essential in order for the targeted proteins to shape their molecular networks and inherently, to fulfil their functions. This balance is preserved by the coordinated action of a dedicated pathway by which SUMO is conjugated to their substrates via the sole E2-conjugating enzyme Ubc9 with or without the need of an E3 SUMO-ligase and removed via specific desumoylation enzymes called Sentrin-specific proteases (SENPs). There are six different SENPs in mammals that are characterized by their selectivity for the SUMO paralogs and/or their subcellular localisation [13]. For instance, SENP1 localised partly to dendritic spines [14-17] and can actively remove SUMO moieties from target proteins [2, 13, 16].

Importantly, dysregulation in protein sumoylation has been directly linked to the development of both neurodevelopmental and neurodegenerative diseases, including, but not restricted to, the Rett syndrome or Parkinson's and Alzheimer's diseases [1, 2]. In line with this view that the homeostasis of protein sumoylation must be preserved to maintain the synaptic function, we previously reported the existence of a spatiotemporal and activity-dependent regulation of the sumoylation process in the brain [7, 15]. In addition, we demonstrated that the activation of the metabotropic glutamate mGlu5 receptor promotes the transient trapping of Ubc9 in dendritic spines leading to an overall increase in synaptic sumoylation [7].

More recently, we showed that the sustained activation of type 1 mGluRs triggers the accumulation of SENP1 at post-synaptic sites by decreasing the exit rate of SENP1 from dendritic spines [16]. However, the activity-dependent mechanisms and signalling pathways driving the spatiotemporal redistribution of the SENP enzymes at synapses are still not fully understood and such investigation is of critical importance to better understand how the levels of synaptic sumoylation is locally maintained.

Here, we identified a bidirectional role of type 1 mGlu1 and mGlu5 receptors on the activity-dependent accumulation of the desumoylating enzyme SENP1 in dendritic spines using a combination of biochemical and live cell-imaging approaches. We show that the mGlu5R activation is primarily responsible for the accumulation of SENP1 in dendritic spines of rat cultured hippocampal neurons whereas the activation of mGlu1R rather acts as a brake to this accumulation. This activity-dependent accumulation at post-synaptic sites requires the activation of either PKC or CaMKII downstream of the mGluRs. Altogether, our data clearly demonstrate that type 1 mGlu1 and mGlu5 receptors act in opposition to finely tune the synaptic levels of SENP1 enzymes in order to maintain the level of sumoylation at synapses.

Results

The synaptic accumulation of SENP1 is triggered by the activation of mGlu5R

The post-synaptic targeting of several enzymes important for the synaptic function is triggered by neuronal activity [7, 15, 16, 18, 19]. To assess how the synaptic accumulation of the desumoylation enzyme SENP1 is activity-dependently regulated, we expressed a GFP-tagged version of SENP1 [16] in rat hippocampal neurons and combined time-lapse microscopy with the use of Dihydroxyphenylglycine (DHPG) to activate group 1 mGlu1 and mGlu5 receptors (**Fig. 1**). Using live-cell imaging, we recorded the redistribution of GFP-SENP1 into dendritic spines in real time during the mGluR stimulation. Activation of type 1 mGluRs with DHPG led to a slow but significant increase in GFP-SENP1 fluorescence in dendritic spines, reaching a plateau 40 min after the beginning of the drug application (**Fig. 1; Supplementary video 1**). In parallel, we monitored a decrease in GFP-SENP1 fluorescence in the dendritic shaft as soon as the plateau of GFP-SENP1 fluorescence was reached (**Fig. 1A,B**). The synaptic GFP-SENP1 fluorescence accumulated in

dendritic spines returned to initial levels when the DHPG was exchanged for the control solution indicating that the type 1 mGluR-dependent accumulation of GFP-SEN1 into the post-synaptic compartments is reversible (**Fig. 1; Supplementary video 1**). We also verified that the overall fluorescence and synaptodendritic localisation of GFP-SEN1 remain unchanged in basal unstimulated conditions over the time course of these experiments (**Supplementary fig. 1**).

It is essential to note here that the gradual accumulation of GFP-SEN1 at post-synaptic sites measured upon the sustained activation of type 1 mGluRs results from the concomitant activation of both mGlu1 and mGlu5 receptors in the presence of DHPG. Since these G-protein coupled receptors can trigger distinct signalling pathways [20], we assessed how the activation of each of these receptor subtypes induces the phosphorylation of the MAP kinases ERK (**Fig. 2**). As expected, the phosphorylation of ERK was triggered by the incubation of hippocampal neurons with the DHPG and this type 1 mGluR-dependent increase in the level of phospho-ERK in response to DHPG was fully blocked when the cells were coincubated with the specific mGlu5R antagonist MPEP, but not when neurons were treated in the presence of the potent non-competitive mGlu1R antagonist JNJ16259685 [21]. These data indicate that the activation of these receptors differentially promotes the phosphorylation of the ERK pathway with the mGlu5Rs being the sole activator of this signalling cascade in rat cultured hippocampal neurons.

Since type 1 mGluRs have also been reported to act in an agonist-independent way characterized by a constitutive activity in absence of agonist, we first assessed the effect of the selective non-competitive mGlu1R antagonist JNJ16259685 on the synaptic accumulation of GFP-SEN1 using time-lapse microscopy (**Fig. 3**). The specific inhibition of mGlu1R constitutive activity with the JNJ16259685 led to a slow but significant increase in GFP-SEN1 fluorescence in dendritic spines, reaching a plateau about 40 min after the start of the mGlu1R non-competitive antagonist application (**Fig. 3; Supplementary video 2**). This synaptic accumulation was mirrored by a decrease in the dendritic shaft indicating that the constitutive activity of mGlu1Rs participates in the regulation of the steady state levels of SEN1 in dendritic spines.

To further identify the contribution of each subtype of mGluRs in the activity-dependent accumulation of SENP1 into dendritic spines, we measured the impact of the mGlu1R antagonist JNJ16259685 in the presence of the type 1 mGluR agonist DHPG (**Fig. 4; Supplementary video 3**). Surprisingly, time-lapse recordings of the synaptic targeting of GFP-SENP1 in the presence of both DHPG and JNJ16259685 revealed that the accumulation of GFP-SENP1 into spines is far much faster and reach higher levels when the activation of mGlu1R is prevented. Indeed, the levels of synaptic GFP-SENP1 fluorescence accumulation were three times higher than in DHPG condition alone (**Fig. 1; DHPG plateau (50-55'; 1.094 ± 0.021) Vs [DHPG + JNJ16259685] plateau (50-55'; 1.277 ± 0.018)**). These data therefore suggest that both the targeting to and the exit from dendritic spines are oppositely regulated by type 1 mGluRs with the activation of mGlu5Rs being responsible for the targeting of SENP1 in dendritic spines and mGlu1Rs rather acting as a brake to this post-synaptic accumulation.

The mGlu5R-dependent accumulation of SENP1 at synapses requires the activation of either PKC or CaMKII

Although on different timescales, both the sumoylation and desumoylation processes at synapses are controlled by the activation of type 1 mGluRs [7, 16]. However, the molecular pathways underlying this enzymatic balance are not fully understood. Since the activation of the Protein Kinase C (PKC) is required for the rapid but transient trapping of the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 into spines [7], we questioned whether PKC activity is also important for the mGlu5R-dependent accumulation of GFP-SENP1 at post-synaptic sites. Time-lapse recordings of JNJ16259685-treated neurons stimulated with DHPG to specifically activate mGlu5Rs were coincubated with Chelerythrine, a potent inhibitor of PKC activity [22]; (**Fig. 5 A,B; Supplementary video 4**). Since the accumulation of GFP-SENP1 is much faster and to a larger extent when mGlu1Rs are antagonized (**Fig. 4**), we compared the levels of desumoylation enzymes accumulated just 20 minutes after the start of the DHPG incubation (*between 30 and 35' in the experimental time sequence shown in fig. 4*). We demonstrated that the accumulation GFP-SENP1 induced by a specific mGlu5R activation is fully blocked when hippocampal neurons are coincubated with the PKC inhibitor Chelerythrine (**Fig. 5A,B; [JNJ16259685 + DHPG] plateau 20-25'; 1.171 ± 0.010) Vs [JNJ16259685 + DHPG + Chelerythrine] plateau (20-25'; 1.004 ± 0.018)**).

The Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase 2 (CaMKII) is a serine/threonine-protein kinase that is also centrally involved in the synaptic function upon neuronal stimulation [19]. We thus investigated whether the activity of the CaMKII could be involved in the post-synaptic accumulation of SENP1. We performed time-lapse recordings on GFP-SENP1 expressing hippocampal neurons pretreated for 10 minutes with the potent CaMKII inhibitor KN93 [23, 24]; **Fig. 5A,C; Supplementary video 4**). We found that similarly to the PKC, the need of a functional CaMKII activity is required to allow the mGlu5R-dependent synaptic accumulation of GFP-SENP1 (**Fig. 5A,C**; [JNJ16259685 + DHPG] plateau 30-35'; 1.168 ± 0.012) Vs [JNJ16259685 + DHPG + KN93] plateau (30-35'; 1.008 ± 0.012). Altogether, these data indicate that the post-synaptic accumulation of GFP-SENP1 in response to a neuronal stimulation via the mGlu5Rs absolutely requires the activation of either PKC or CaMKII kinases.

The synaptic levels of endogenous SENP1 are significantly increased when mGlu1Rs are specifically blocked

To further confirm that the sole activation of mGlu5R is also leading to the post-synaptic accumulation of endogenous SENP1 enzymes, we measured the extent of colocalisation between the endogenous SENP1 and the postsynaptic marker PSD95 in basal, DHPG and [DHPG + JNJ16259685]-treated conditions (**Fig. 6**). In line with the live-imaging data, the extent of SENP1 colocalisation with PSD95-positive post-synaptic sites was significantly increased in the [DHPG + JNJ16259685]-treated hippocampal neurons confirming that the specific activation of mGlu5Rs acts as a trigger for the retention and accumulation of endogenous SENP1 into spines.

To assess the central action of mGlu5R on the synaptic accumulation of the endogenous SENP1 in a more integrated system, we prepared synaptosomal fractions from post-natal day 14 (PND14) rat brain slices (**Fig. 7A,B**) and measured the synaptic levels of SENP1 following a 10-min stimulation with either JNJ16259685, DHPG or [DHPG + JNJ16259685] (**Fig. 7C,D**). We found that synaptosomal fractions were specifically enriched in synaptic proteins such as Synapsin1, PSD95 and Homer1, and importantly, devoid

of Coilin and GM130 proteins demonstrating the absence of nuclear and Golgi contaminants respectively (**Fig. 7B**).

Interestingly, incubation of PND14 brain slices with DHPG led to a significant increase in the endogenous levels of SENP1 in synaptosomes which was enhanced when brain slices were coincubated with [DHPG + JNJ16259685] to specifically activate mGlu5Rs (**Fig. 7C,D**), further confirming the mGlu5R-driven targeting and accumulation of the enzyme to synapses. Altogether these findings demonstrate that the sole activation of mGlu5R drives the activity-dependent dynamics of SENP1 into spines and strongly support the mGlu5R-driven homeostatic regulation of the synaptic sumoylation process.

Discussion

The synaptic balance between sumoylation and desumoylation is essential to maintain a proper synaptic communication [7, 16]. Here, we demonstrated that both type 1 mGlu1 and mGlu5 receptors are involved in this dynamic regulation (**Fig. 8**). We showed that these receptors work in opposition to control the levels of SENP1 present at the post-synapse. Indeed, the amount of SENP1 is largely increased in synapses when mGlu1Rs are blocked during a type 1 mGluR stimulation. This post-synaptic accumulation of SENP1 in response to the sole mGlu5Rs activation requires the prior activation of either PKC or CaMKII, downstream of the mGluRs activation (**Fig. 8**).

The regulation of the synaptic balance between sumoylation and desumoylation appears more complex than initially thought. Both these processes are regulated by the activation of mGluRs and require PKC/CaMKII activities. First, a rapid transient mGlu5R- and PKC-dependent synaptic trapping of the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 allows the rapid sumoylation of synaptic target proteins [7], which is then followed by the activity of SENP1 desumoylation enzymes to get post-synaptic SUMO-modified proteins back to their basal levels [16]. In this work, we provide an additional level of complexity with the demonstration that mGlu1Rs act as a brake to the mGlu5R-dependent accumulation of SENP1 enzymes at synapses. Since Glutamate binds to both type 1 mGluRs, the precise tuning of the desumoylation process at synapses could

rely on different but not mutually exclusive pathways. For instance, the composition in type 1 mGluRs of each synapse could be different, with synapses expressing more mGlu1R than others. Therefore, activated synapses presenting higher levels of mGlu1Rs will show less SENP1 accumulation than synapses where mGlu5Rs are mostly present. Another possibility is that the level of mGlu1R-mGlu5R heterodimers could be different between synapses, leading to distinct signalling pathways activation and thus, to a delayed, or to a more rapid accumulation of SENP1 in activated neurons. Alternatively, this could be the result of a differential binding of type 1 mGluRs to Calmodulin for instance as previously demonstrated [20]. Since phosphorylation events from either PKC or CaMKII are essential to the synaptic accumulation of SENP1, we cannot exclude that SENP1 could also be a direct target of these kinases. The phosphorylation of SENP1 could thus be essential to control either its activity or its subcellular targeting and/or retention in dendritic spines. In line with this hypothesis, SENP1 could readily be phosphorylated in response to neuronal activation since its primary sequence presents high predictive values for Ser/Thr phosphorylation [25]. Of interest is the report that SENP3, a paralog of SENP1, can be phosphorylated in HeLa cells [26]. It was then demonstrated that the phosphorylation of SENP3 prevents its desumoylase activity [27]. Therefore, the hypothetical activity-dependent phosphorylation of SENP1 could also inhibit its desumoylase activity and consequently leading to a rapid increase in synaptic sumoylation. Another possibility is that the phosphorylation of SENP1 could represent a synaptic retention cue. In this case, this modification would rather participate in the accumulation of SENP1 in mGlu5R-activated synapses in line with our data. In any case, extensive studies remain to be done to assess whether SENP1 is activity-dependently phosphorylated in response to type 1 mGluRs activation and how this post-translational modification impacts the activity and/or the synaptic localisation of the desumoylase.

Interestingly, Thalhammer and colleagues reported that the increase in synaptic activity leads to the targeting of CaMKII to dendritic spines of excitatory neurons [18]. However, this post-synaptic activity-dependent targeting of the kinase is linked to the activation of NMDA receptor and to the underlying signalling pathways that involve calcium mobilization and microtubule dynamics [19]. While the SENP1 desumoylase accumulation is not mediated by the activation of NMDAR [16], it remains to be determined whether the synaptic targeting of CaMKII is also driven by the activation of type 1 mGluRs. If this is the

case, it would be in favor of a role of the CaMKII phosphorylation directly on SENP1 to trigger or participate in its synaptic retention. In addition, CaMKII may phosphorylate many additional synaptic proteins other than SENP1 following neuronal activation, which is essential to the synaptic function. Therefore, we cannot rule out the possibility that this increased synaptic phosphorylation could also act as a retention matrix to capture SENP1 into dendritic spines. Thus, we can make the assumption that an interplay between these two post-translational modifications occur in a dynamic way to spatiotemporally control the sumoylation/desumoylation balance at synapses.

Another interesting aspect of the current data is the potential link between brain diseases presenting defects in type 1 mGluR signalling or subcellular/synaptic receptor expression and/or organization. For instance, it is now clearly established that alteration of mGlu5R-dependent functions are clearly involved in the aetiology of several neurological disorders, including Fragile X syndrome, schizophrenia or chronic pain [28]. Therefore, we can postulate that a functional alteration in the mGluR function could also directly impact the homeostasis of protein sumoylation/desumoylation by deregulating the synaptic targeting of Ubc9 and SENP1 in activated neurons. It would thus be of interest to investigate the synapto-dendritic trafficking of both Ubc9 and SENP desumoylases in a diseased context to define whether the altered mGluR function impairs the synaptic levels of sumoylated proteins. This is of particular interest in the case of the Fragile X syndrome since it was shown that the sumoylation of the Fragile X Mental Retardation Protein FMRP is central to the activity-dependent release of its bound mRNAs allowing the synaptic elimination and maturation process in the developing brain [9, 29]. In light of the current data, this particular field of research seems of importance because it could provide an additional angle for the development of future therapeutic intervention for diseases presenting altered type 1 mGluR functions.

Materials and methods

Constructs

GFP-tagged full length WT human SENP1 in pEGFP-C2 is a generous gift from Dr Wang Min [30]. The construct was entirely sequenced.

Rat strain

Wistar rats were from a commercial source (Janvier, St Berthevin, France). Animals were treated in accordance with the European Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory animals in our facility. Animals had free access to water and food. Lighting was controlled as a 12h light and dark cycle and the temperature maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Protocol to prepare primary neuronal cultures from rat embryos at E18 was approved by the National Animal Care and Ethics Committee (Project reference APAFIS#18647-2019011110552947v3).

Cell culture

Hippocampal neurons were prepared from E18 pregnant rats as previously described [7, 9, 16, 31]. Briefly, neurons were plated in Neurobasal medium (Invitrogen, France) supplemented with 2% B27 (Invitrogen), 0.5 mM glutamine and penicillin/streptomycin (Ozyme) on 100-mm dishes or 24-mm glass coverslips (VWR) pre-coated with poly-L-Lysine ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Sigma). Neurons ($3\cdot 10^6$ cells per 100-mm dish or 100,000 cells per coverslip) were then fed once a week with Neurobasal medium supplemented with 2% B27 and penicillin/streptomycin for a maximum of 3 weeks.

Sindbis virus production and neuronal transduction

Attenuated Sindbis viral particles (*SINrep(nsP2S726)*) were prepared and used as previously described [32-34]. Briefly, cRNAs were generated from the pSinRep5 plasmid containing the sequence coding for the indicated GFP-SENP1 constructs and from the defective helper (pDH-BB) plasmid using the Mmessage Mmachine SP6 kit (Ambion). cRNAs were electroporated into BHK21 cells. Pseudovirions from the culture medium were harvested 72h after electroporation and concentrated using ultracentrifugation on SW41Ti. Aliquots of Sindbis particles were stored at -80°C . Neurons were transduced at 17 to 20 days in

vitro (DIV) a multiplicity of infection (MOI) of 0.05 and returned at 37°C under 5% CO₂ for 18 to 24h until use.

Immunocytochemistry

TTX (0.5 μM)-treated hippocampal neurons (18-21 DIV) were preincubated or not for 10 min with 0.1 μM JNJ16259685 (Hello Bio) and then treated or not for 30 min with 50 μM DHPG at 37°C. Neurons were fixed with methanol for 20 min at -20°C and washed three times 5 min in PBS. Cells were then permeabilized for 1h in PBS containing 0.2% Triton X100, 0.2% of BSA and 5% Horse Serum (HS) at RT. Neurons were stained with a rabbit anti-SENPI (1/200; Sigma-Aldrich), a mouse anti-PSD95 (1/500; Neuromab) and a guinea pig anti-MAP2 (1/1000; Synaptic System) overnight at 4°C in PBS containing 0.2% Triton X100, 0.2% of BSA. Cells were washed three times in PBS and incubated with the appropriate secondary antibodies conjugated to Alexa488, Alexa594 or Alexa 647 as indicated and mounted with Mowiol (Sigma). Confocal images (1024×1024 pixels) were acquired with a 63X oil-immersion lens (Numerical Aperture NA 1.4) on a confocal LSM780 microscope (Zeiss, Germany). Z-series of 5 images of randomly selected dendrites were compressed into two dimensions using the maximum projection algorithm of the Zeiss software. Quantification was performed using the ImageJ software and the synaptic enzymatic colocalisation was measured with the JACoP macro.

Live cell imaging

TTX-treated GFP-SENPI expressing hippocampal neurons were treated with the indicated drugs for the indicated time on the figures. A 10-min preincubation time at 37°C was applied when specific inhibitors were tested. Pharmacological drugs used alone or in combination in Earle's buffer (25 mM HEPES-Tris pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 0.9 g.L⁻¹ glucose) were: TTX (0.5μM); JNJ16259685 (0.1μM); DHPG (50 μM); Chelerythrine (50 μM); H89 (1 μM); KN93 (1 μM), Nocodazol (33 μM) and Taxol (0.1 μM). Live neurons (18-21 DIV) were kept on a heated stage (set at 37°C) on a Nikon Ti inverted microscope. GFP fluorescence was excited through a 63X oil-immersion lens (Numerical

Aperture, 1.4) using a 488 nm laser light (50 mW, 3%) and time series (0.1 Hz) were collected for a maximum of 70 min as a single image slice using a Perkin Elmer Ultra-View spinning disk microscope.

Synaptosomal isolation from brain slices

Synaptosomes preparation were adapted from previously published protocols [7, 9, 31, 34]. Three hundred μm -thick P14 rat brain slices were prepared in ice-cold oxygenated (5% CO₂, 95% O₂) aCSF solution (125 mM NaCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM Glucose, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 2.5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃). Free-floating brain slices were first pre-treated with TTX (0.5 μM) in the presence or absence of JNJ16259685 (0.1 μM) in aCSF solution (119 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM Glucose 10 mM HEPES, buffered to pH 7.4) for 10 min at 37 °C and then incubated with or without DHPG (100 μM) for 10 min. Brain slices (250 mg) were homogenized in ice-cold sucrose buffer (10 mM Tris pH 7.4, 0.32 M Sucrose, Mammalian protease inhibitors (Roche) and 20 mM NEM (Sigma-Aldrich) to protect proteins from desumoylation). Nuclear proteins were removed from the synaptosomal preparations by centrifugation at 1,000g for 5 min at 4°C. The supernatant was then loaded on a 4-layer Percoll-Sucrose gradient (20%/10%/6%/2% Percoll in sucrose buffer). The gradient was centrifuged at 15,000 rpm for 10 min at 4°C using a SW41Ti rotor (Beckman). The synaptosomal fraction was recovered at the interface between 10% and 20% and washed in HEPES Buffer (5 mM HEPES pH7.4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose, mammalian protease inhibitors and 20 mM NEM) and centrifuge at 10,000g for 15 min. The pellet was resuspended in (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, mammalian protease inhibitor cocktail 1% and 20 mM NEM) for 1h at RT. After sonication and centrifugation at 16,000 g for 15 min, protein concentration was measured using the Bradford protein assay (Bio-Rad).

Immunoblotting

Protein extracts (25 μg) were resolved by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with the following primary antibodies: Rabbit anti-SEN1 1/250 (Sigma Prestige); Mouse

anti-PSD95 1/10000 (NeuroMab); Mouse anti-Homer1 1/1000 (Synaptic System); Mouse anti-Synapsin1a/b 1/1000 (Santa-Cruz); Mouse anti-SOD2 1/2000 (Santa Cruz); Mouse anti-NOPP140 1/700 (Santa-Cruz); Rabbit anti-Coillin 1/500 (Santa Cruz); Rabbit anti-GM130 1/500 (BD Biosciences); Rabbit anti-ERK1/2 1/1000 (Cell Signalling); Rabbit anti-phosphoERK1/2 1/2000 (Cell Signalling). Standard loading controls were included using ERK1/2 labelling or ponceau staining as indicated.

Statistical analysis

Statistical analyses were calculated using GraphPad Prism 7 (GraphPad software, Inc). Data were expressed as mean \pm s.e.m. One-way ANOVA were performed with a Tukey post-hoc test for multiple comparison data sets and unpaired t-test for the Phospho-ERK experiments. All data were tested for normal distribution.

* $p < 0.05$ was considered significant.

References

1. Schorova L, Martin S (2016) Sumoylation in Synaptic Function and Dysfunction. *Front Synaptic Neurosci* 8:9. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00009>.
2. Henley JM, Seager R, Nakamura Y, Talandyte K, Nair J, Wilkinson KA (2021) SUMOylation of synaptic and synapse-associated proteins: An update. *J Neurochem* 156:145-161. <https://doi.org/10.1111/jnc.15103>.
3. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135:1457-1470.
4. Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88:97-107. [https://doi.org/S0092-8674\(00\)81862-0](https://doi.org/S0092-8674(00)81862-0) [pii].
5. Meulmeester E, Melchior F (2008) Cell biology: SUMO. *Nature* 452:709-711. <https://doi.org/452709a>
6. Girach F, Craig TJ, Rocca DL, Henley JM (2013) RIM1alpha SUMOylation is required for fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell reports* 5:1294-1301. [https://doi.org/S2211-1247\(13\)00638-4](https://doi.org/S2211-1247(13)00638-4) [pii]
7. Loriol C, Casse F, Khayachi A, Poupon G, Chafai M, Deval E, Gwizdek C, et al. (2014) mGlu5 receptors regulate synaptic sumoylation via a transient PKC-dependent diffusional trapping of Ubc9 into spines. *Nat Commun* 5:5113. <https://doi.org/10.1038/ncomms6113>.
8. Craig TJ, Anderson D, Evans AJ, Girach F, Henley JM (2015) SUMOylation of Syntaxin1A regulates presynaptic endocytosis. *Sci Rep* 5:17669. <https://doi.org/srep17669> [pii] 10.1038/srep17669.
9. Khayachi A, Gwizdek C, Poupon G, Alcor D, Chafai M, Casse F, Maurin T, et al. (2018) Sumoylation regulates FMRP-mediated dendritic spine elimination and maturation. *Nat Commun* 9:757. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03222-y>
10. Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM (2007) SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* 447:321-325.
11. Craig TJ, Jaafari N, Petrovic MM, Rubin PP, Mellor JR, Henley JM (2012) Homeostatic synaptic scaling is regulated by protein SUMOylation. *J Biol Chem* 287:22781-22788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.356337>.
12. Chamberlain SE, Gonzalez-Gonzalez IM, Wilkinson KA, Konopacki FA, Kantamneni S, Henley JM, Mellor JR (2012) SUMOylation and phosphorylation of GluK2 regulate kainate receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 15:845-852. <https://doi.org/10.1038/nn.3089>.

13. Nayak A, Muller S (2014) SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. *Genome Biol* 15:422. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0422-2>.
14. Loriol C, Parisot J, Poupon G, Gwizdek C, Martin S (2012) Developmental regulation and spatiotemporal redistribution of the sumoylation machinery in the rat central nervous system. *PLoS ONE* 7:e33757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033757>
15. Loriol C, Khayachi A, Poupon G, Gwizdek C, Martin S (2013) Activity-dependent regulation of the sumoylation machinery in rat hippocampal neurons. *Biol Cell* 105:30-45. <https://doi.org/10.1111/boc.201200016>.
16. Schorova L, Pronot M, Poupon G, Prieto M, Folci A, Khayachi A, Brau F, et al. (2019) The synaptic balance between sumoylation and desumoylation is maintained by the activation of metabotropic mGlu5 receptors. *Cell Mol Life Sci* 76:3019-3031. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03075-8>.
17. Colnaghi L, Conz A, Russo L, Musi CA, Fioriti L, Borsello T, Salmona M (2020) Neuronal Localization of SENP Proteins with Super Resolution Microscopy. *Brain Sci* 10. <https://doi.org/10.3390/brainsci10110778>.
18. Thalhammer A, Rudhard Y, Tigaret CM, Volynski KE, Rusakov DA, Schoepfer R (2006) CaMKII translocation requires local NMDA receptor-mediated Ca²⁺ signaling. *Embo J* 25:5873-5883.
19. Lemieux M, Labrecque S, Tardif C, Labrie-Dion E, Lebel E, De Koninck P (2012) Translocation of CaMKII to dendritic microtubules supports the plasticity of local synapses. *J Cell Biol* 198:1055-1073. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202058>.
20. Choi KY, Chung S, Roche KW (2011) Differential binding of calmodulin to group I metabotropic glutamate receptors regulates receptor trafficking and signaling. *J Neurosci* 31:5921-5930. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6253-10.2011>.
21. Lavreysen H, Wouters R, Bischoff F, Nobrega Pereira S, Langlois X, Blokland S, Somers M, et al. (2004) JNJ16259685, a highly potent, selective and systemically active mGlu1 receptor antagonist. *Neuropharmacology* 47:961-972. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.08.007>.
22. Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP (1990) Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 172:993-999. [https://doi.org/0006-291X\(90\)91544-3](https://doi.org/0006-291X(90)91544-3) [pii].
23. Mockett BG, Guevremont D, Wutte M, Hulme SR, Williams JM, Abraham WC (2011) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II mediates group I metabotropic glutamate receptor-dependent protein synthesis and long-term depression in rat hippocampus. *J Neurosci* 31:7380-7391. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6656-10.2011>.
24. Raka F, Di Sebastiano AR, Kulhawy SC, Ribeiro FM, Godin CM, Caetano FA, Angers S, et al. (2015) Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II interacts with group I metabotropic glutamate and facilitates receptor

- endocytosis and ERK1/2 signaling: role of beta-amyloid. *Mol Brain* 8:21. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0111-4>.
25. Bailey D, O'Hare P (2004) Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J Biol Chem* 279:692-703.
 26. Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10762-10767. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805139105>.
 27. Wei B, Huang C, Liu B, Wang Y, Xia N, Fan Q, Chen GQ, et al. (2018) Mitotic Phosphorylation of SENP3 Regulates DeSUMOylation of Chromosome-Associated Proteins and Chromosome Stability. *Cancer Res* 78:2171-2178. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2288>.
 28. Wang H, Zhuo M (2012) Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene transcription and implications for synaptic plasticity and diseases. *Front Pharmacol* 3:189. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00189>.
 29. Prieto M, Folci A, Martin S (2020) Post-translational modifications of the Fragile X Mental Retardation Protein in neuronal function and dysfunction. *Mol Psychiatry* 25:1688-1703. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0629-4>.
 30. Li X, Luo Y, Yu L, Lin Y, Luo D, Zhang H, He Y, et al. (2008) SENP1 mediates TNF-induced desumoylation and cytoplasmic translocation of HIPK1 to enhance ASK1-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 15:739-750. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402303>.
 31. Casse F, Martin S (2015) Tracking the activity-dependent diffusion of synaptic proteins using restricted photoconversion of Dendra2. *Front Cell Neurosci* 9:367. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00367>.
 32. Xiong H, Casse F, Zhou Y, Zhou M, Xiong ZQ, Joels M, Martin S, et al. (2015) mTOR is essential for corticosteroid effects on hippocampal AMPA receptor function and fear memory. *Learn Mem* 22:577-583. <https://doi.org/10.1101/lm.039420.115>.
 33. Xiong H, Casse F, Zhou M, Xiong ZQ, Joels M, Martin S, Krugers HJ (2016) Interactions between N-Ethylmaleimide-sensitive factor and GluA2 contribute to effects of glucocorticoid hormones on AMPA receptor function in the rodent hippocampus. *Hippocampus* 26:848-856. <https://doi.org/10.1002/hipo.22567>.
 34. Prieto M, Folci A, Poupon G, Schiavi S, Buzzelli V, Pronot M, Francois U, et al. (2021) Missense mutation of *Fmr1* results in impaired AMPAR-mediated plasticity and socio-cognitive deficits in mice. *Nat Commun* 12:1557. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21820-1>.

Author contributions

MP performed all the live imaging experiments and the immunocytochemistry. MP, GP, QL and LP performed biochemical experiments. GP and MPri prepared viral particles. MP, LS, MPri, AF and GP prepared neuronal cultures. FBr provided support for the imaging experiments. MP, CG and SM contributed to hypothesis development and data interpretation. SM provided the overall supervision, the funding and wrote the original draft. All authors discussed the data and commented on the manuscript.

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Figure legends

Fig. 1 Activity-dependent redistribution of GFP-SENPI into spines

(A) Representative confocal images of a time-lapse recording of a GFP-SENPI expressing rat hippocampal secondary dendrite in control and DHPG (50 μ M)-stimulated conditions as indicated. (B) Quantification of time lapse experiments showing the variation of normalized fluorescence intensity \pm SEM in spines (n = 38) and shafts (n = 11). (C) Histograms showing the mean GFP-SENPI fluorescence intensity \pm s.e.m. in spines in control, DHPG plateau (50-55'; 1.094 \pm 0.021) and washout (1.028 \pm 0.042). Statistics: One-way ANOVA with Tukey post-hoc test. P-values are indicated on the bars. ns, non-significant.

Fig 2. Differential MAPK phosphorylation upon type 1 mGluRs activation

(A) Representative immunoblotting using anti-phospho- and total ERK antibodies of total proteins extracted from cortical neurons preincubated or not with a mGlu1R antagonist JNJ16259685 (0.1 μ M), mGlu5R antagonist MPEP (33 μ M) or ERK antagonist PD98059 (1 μ M) and treated for 10 min with 100 μ M DHPG. ERK total was used as a loading control. (B) Summary histograms show means \pm s.e.m. of three independent experiments. Statistics: Unpaired t-test between treated conditions and the corresponding controls. P-values are indicated on the bars. ns, non-significant

Fig 3. The constitutive activity of mGlu1Rs participates in the steady state regulation of the synaptic SENPI content

(A) Representative confocal images of a time-lapse recording of a GFP-SENPI expressing rat hippocampal secondary dendrite in JNJ16259685 (0.1 μ M)-stimulated conditions as indicated. (B) Quantification of time lapse experiments showing the variation of normalized fluorescence intensity \pm SEM in spines (n = 30) and shafts (n = 30). (C) Histograms showing the mean GFP-SENPI fluorescence intensity \pm s.e.m. in spines in control, plateau (50-55'; 1.092 \pm 0.020) and washout (1.094 \pm 0.022). Statistics: Paired, non-parametric one-way ANOVA with Tukey post-hoc test. P-values are indicated on the bars. ns, non-significant.

Fig 4. Blockade of mGlu1R activation during type 1 mGluR stimulation leads to a sharp accumulation of GFP-SENPI in dendritic spines

(A) Representative confocal images of a time-lapse recording of a GFP-SEN1 expressing rat hippocampal secondary dendrite in JNJ16259685 (0.1 μ M) + DHPG (50 μ M)-stimulated conditions as indicated. (B) Quantification of time-lapse experiments showing the variation of normalized fluorescence intensity \pm SEM in spines (n = 31) and shafts (n = 30). (C) Histograms showing the mean GFP-SEN1 fluorescence intensity \pm s.e.m. in spines in control, plateau (50-55'; 1.277 ± 0.018) and washout (1.223 ± 0.024). Statistics: Paired, non-parametric one-way ANOVA with Tukey post-hoc test. P-values are indicated on the bars. ns, non-significant.

Fig. 5 Activation of either PKC and CaMKII is required for the accumulation of SEN1 at synapses.

(A) Representative confocal images of a time-lapse recording of a GFP-SEN1 expressing rat hippocampal secondary dendrite preincubated 10 min with JNJ16259685 (0.1 μ M) and either PKC antagonists Chelerythrine (5 μ M) or CaMKII antagonist KN93 (1 μ M) and treated for 25 min with DHPG (50 μ M) as indicated. (B) Histograms showing the mean GFP-SEN1 fluorescence intensity \pm s.e.m. in spines at the plateau (20-25 min of treatment) in control, DHPG+ JNJ16259685 (1.171 ± 0.010) and Chelerythrine+DHPG+ JNJ16259685 (1.004 ± 0.018) conditions. (C) Histograms showing the mean GFP-SEN1 fluorescence intensity \pm s.e.m. in spines at the plateau (20-25 min of treatment) in control, DHPG+ JNJ16259685 (1.168 ± 0.012) and KN93+ JNJ16259685+DHPG (1.008 ± 0.012) conditions. Statistics: Ordinary one-way ANOVA with Tukey post-hoc test. P-values are indicated on the bars. ns, non-significant.

Fig. 6 Blockade of mGlu1R activation during type 1 mGluR stimulation leads to an accumulation of endogenous SEN1 in dendritic spines.

(A) Immunolabelling of fixed primary hippocampal neurons for SEN1 and PSD95 in control, DHPG (40 min) and JNJ+DHPG (40 min) conditions. Scale bar = 1 μ m. (B) Quantitative representation \pm s.e.m. of control-normalized colocalization of SEN1 within PSD-95 area (Pearson's Correlation coefficient: control [0.384 ± 0.012], DHPG [0.412 ± 0.010], DHPG+ JNJ16259685 [0.460 ± 0.010] from 3 independent cultures with dendrites of control (n = 17); DHPG (n = 19); DHPG+ JNJ16259685 (n = 17). Statistics: Non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis test. ns, not significant.

Fig. 7 Blockade of mGlu1R activation during type 1 mGluR stimulation leads to a sharp accumulation of SENP1 in a more integrated system

(A) Step-by-step scheme of synaptosomal isolation. (B) Immunoblots of the different Synaptosomal purification steps with specific markers for the postsynaptic compartments (PSD-95 and Homer1), presynaptic terminals (Synapsin1a/b), the nucleus (Coilin), and the golgi (GM130). Lanes were labelled as follows: total homogenate (HO), supernatant (S1), pellet 1 (P1), Synaptic Fraction (Syn). Each lane was loaded with 10 μ g of proteins. (C) Representative SENP1 immunoblot performed on synaptosomal fractions from control, JNJ16259685; 10 min DHPG and 10 min DHPG+ JNJ16259685-treated P14 rat brain slices. 25 μ g of protein was loaded per lane. Ponceau S staining was used as a loading/normalization control. (D) Mean histogram \pm s.e.m. of SENP1 levels in synaptosomes (JNJ16259685 [1.33 ± 0.212], DHPG [1.61 ± 0.123], DHPG+JNJ16259685 [1.87 ± 0.219]) obtained from 5 independent experiments. Statistics: Ratio paired t-test. P-value is indicated on the bars.

Fig. 8 Schematic model of the bidirectional regulation of SENP1 accumulation by type 1 mGluRs at the mammalian synapse.

Supplemental material

Journal: Cellular and Molecular Life Sciences

Bidirectional regulation of synaptic desumoylation by Group 1 metabotropic glutamate receptors

Marie Pronot¹, Gwénola Poupon¹, Lara Pizzamiglio¹, Lenka Schorova¹, Alessandra Folci¹, Marta Prieto¹, Carole Gwizdek¹, Frédéric Brau¹, and Stéphane Martin^{2,*}

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, France.

² Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France.

*Correspondence to: Stéphane Martin (martin@ipmc.cnrs.fr)

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7275, Université Côte d'Azur, 660 route des lucioles, 06560 Valbonne, France.

Supplementary information

Supplementary figures

Supplementary fig. 1 Control time-lapse recordings on GFP-SEN1-expressing hippocampal neurons.

(A) Representative confocal images of a GFP-SEN1-expressing rat hippocampal secondary dendrite for 75 min at 37°C. (B) Curves represent the mean variation \pm s.e.m. of GFP-SEN1 fluorescence in spines (n = 20) and shafts (n = 10) over time. (C) Bar graph shows mean fluorescence intensity \pm s.e.m. in spines during the 0-10 min (0.9986 ± 0.001), 10-55 min (0.9991 ± 0.006) and washout (1.004 ± 0.008) incubation periods. Statistics: One-way ANOVA with Tukey post-hoc test. P-values are indicated on the bars.

Supplementary videos

Supplementary video 1

Time-lapse imaging (0.033 Hz; 30 fps) of GFP-SEN1 showing the redistribution of the desumoylation enzymes into spines in basal condition and upon neuronal activation with bicuculline.

Supplementary video 2

Comparative time-lapse imaging (0.033 Hz; 30 fps) of the synaptic GFP-SEN1 fluorescence in basal and JNJ16259685-treated conditions.

Supplementary video 3

Time-lapse imaging experiments (0.033 Hz; 30 fps) of the synaptic GFP-SEN1 fluorescence variation in basal and [JNJ16259685 + DHPG]-treated conditions.

Supplementary video 4

Comparative time-lapse imaging (0.033 Hz; 30 fps) of the synaptic accumulation of GFP-SEN1 in [JNJ16259685+DHPG] \pm Chelerythrine or KN93.

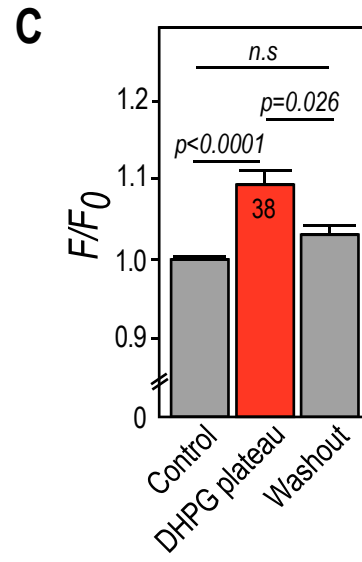
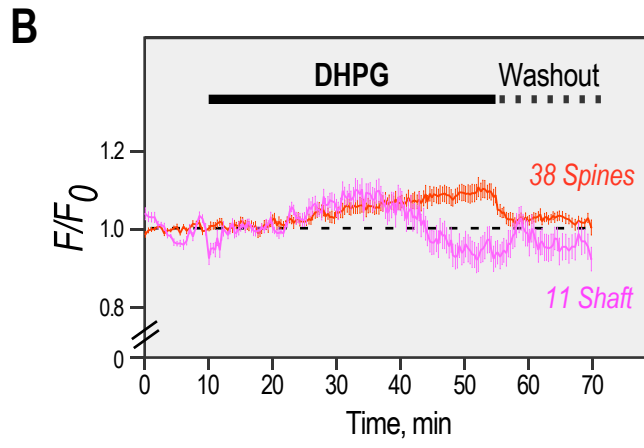
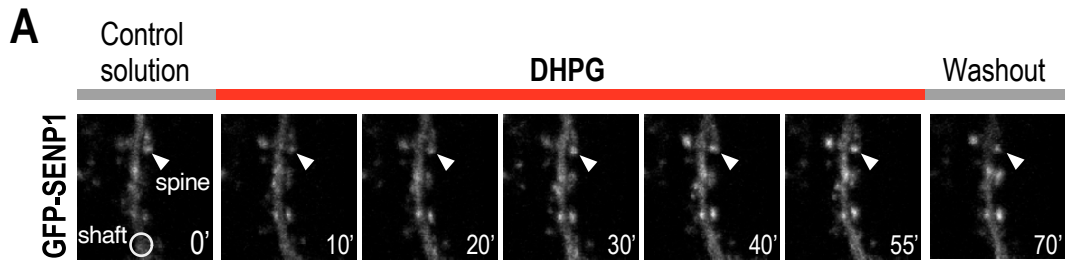


Figure 1

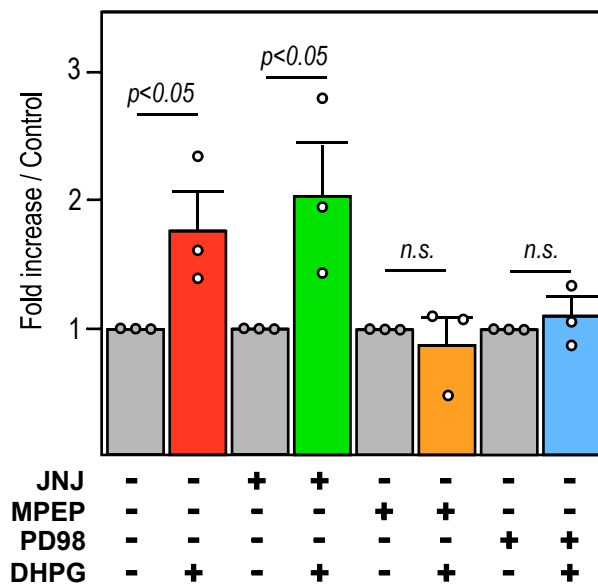
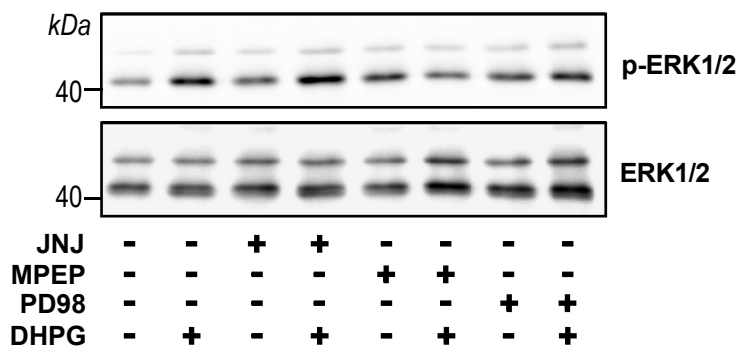


Figure 2

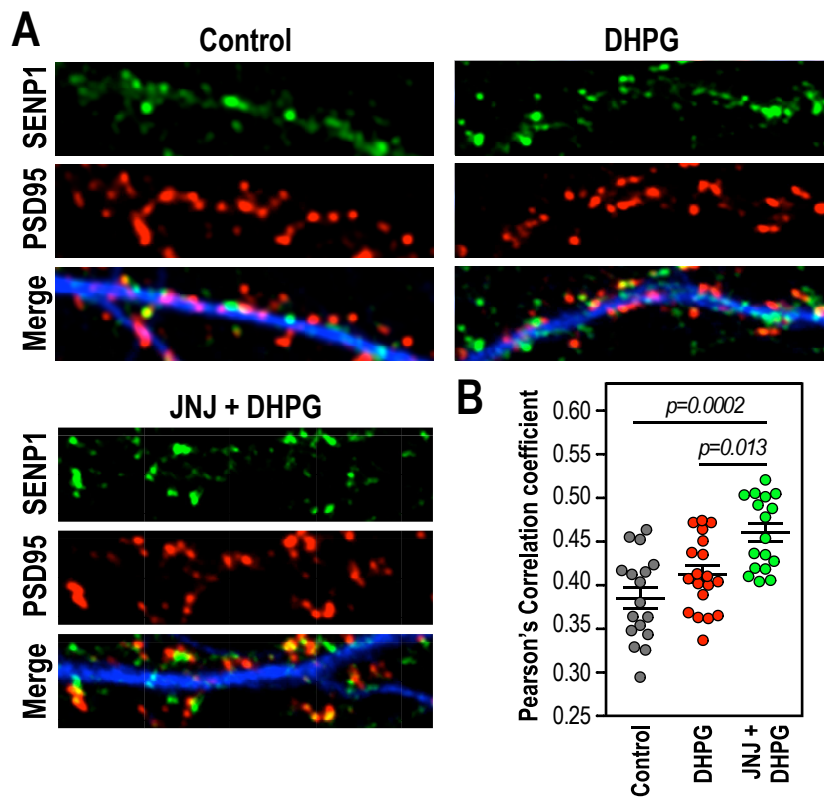


Figure 6

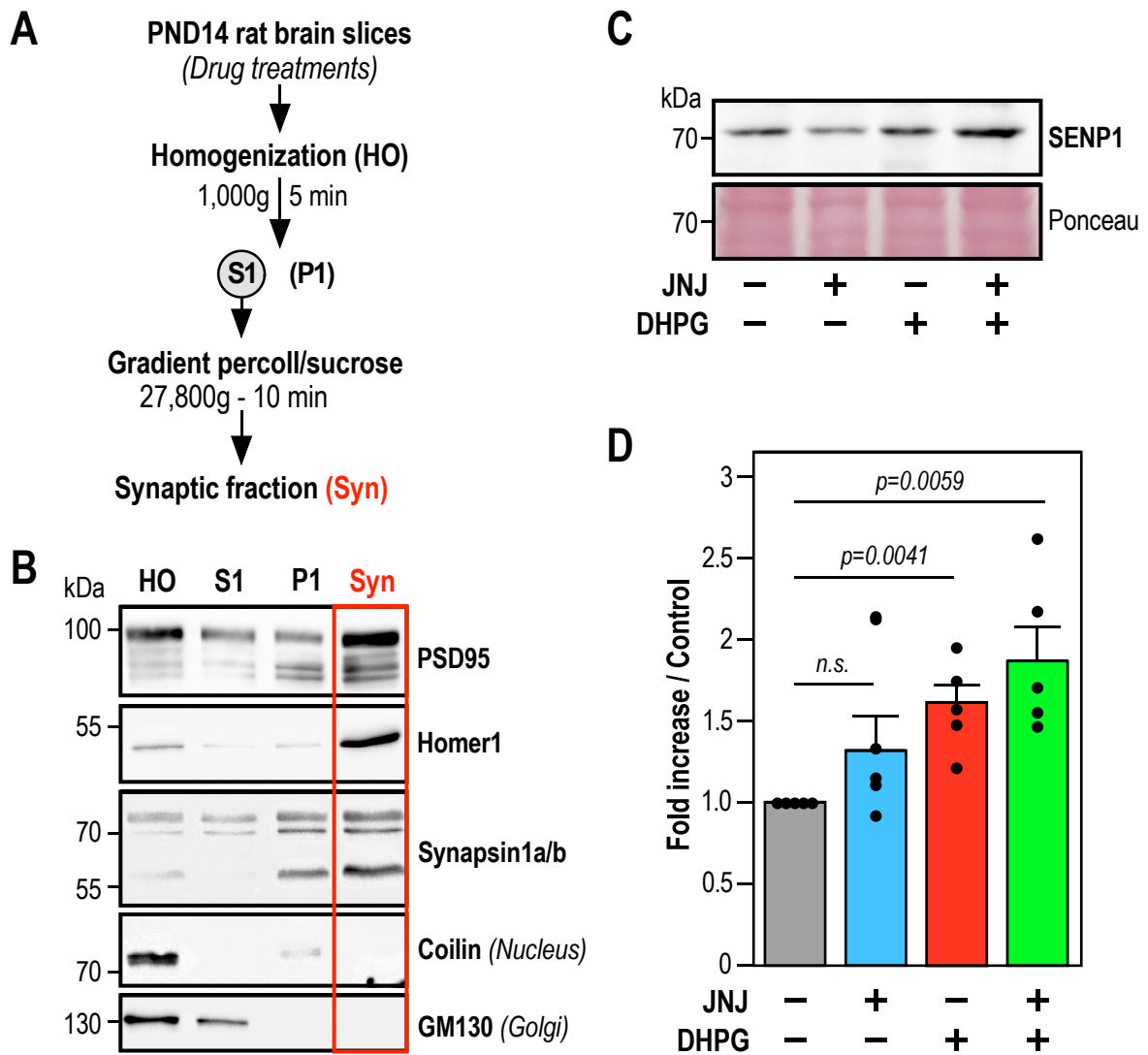


Figure 7

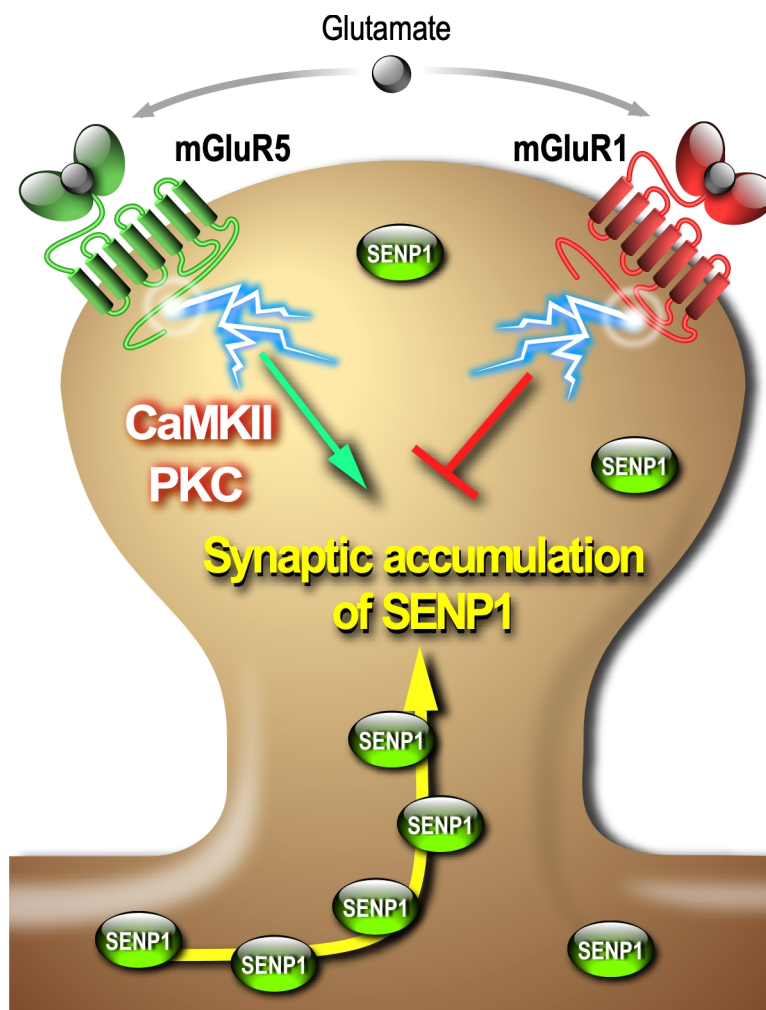
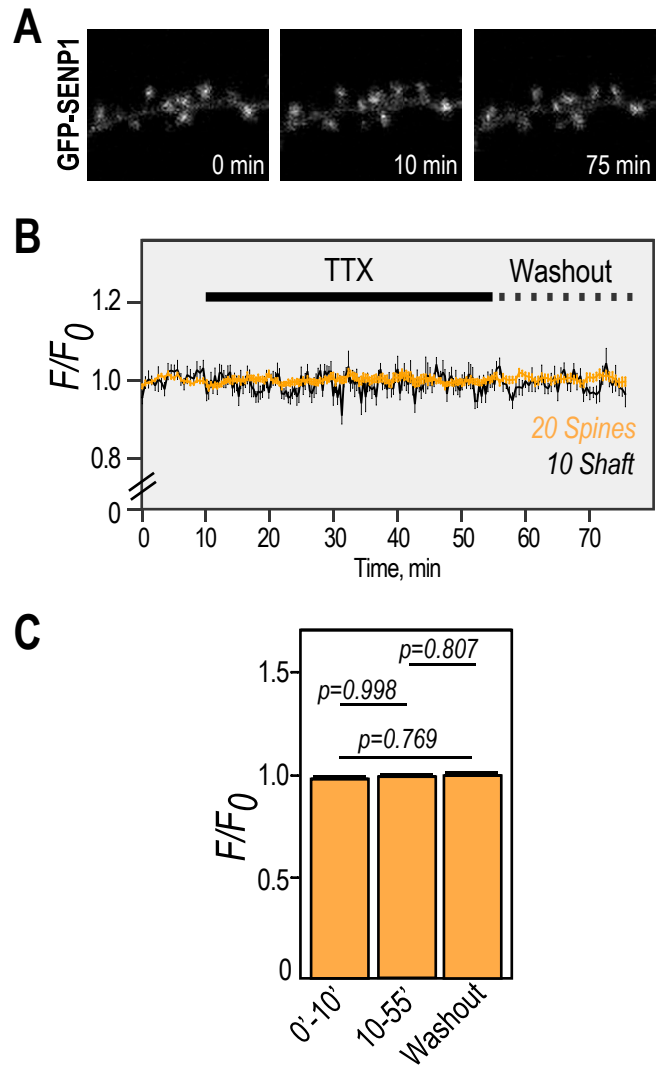


Figure 8



Supplementary Figure 1

Annexe 5

Proteomic identification of endogenous synaptic SUMOylome in developing rat brain.

(En préparation)

Pronot M¹, Kieffer F¹, Gay A-S¹, Debayle D¹, Forquet R¹, Poupon G¹, Schorova L¹, Martin S^{2#} and Gwizdek C^{1#}.

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, France.

² Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France.

Equal contribution

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle dynamique qui consiste en la conjugaison enzymatique covalente de la protéine SUMO (Small Ubiquitin-like MODifier) sur des résidus lysine spécifiques de protéines cibles. Au cours des dix dernières années, la SUMOylation est apparue comme un régulateur important de la fonction neuronale, jouant un rôle dans le développement du cerveau, l'excitabilité neuronale, la transmission synaptique et la plasticité. Il est important de noter que les altérations du processus d'homéostasie de la SUMOylation sont associées à une variété de troubles cérébraux. Néanmoins, le répertoire disponible des substrats SUMOylés identifiés au niveau des synapses est encore extrêmement limité. Cette identification de substrats SUMOylés synaptiques endogènes est rendue difficile en raison notamment des faibles niveaux de protéines SUMOylées au niveau des synapses mais dépend aussi de l'âge de développement étudié. Pour surmonter ces difficultés, nous avons combiné des approches de fractionnement subcellulaire à partir de cerveaux de rats à P14, période où la SUMOylation synaptique est à son maximum, avec des immunoprécipitations SUMO2/3 spécifiques pour purifier et enrichir nos échantillons en protéines synaptiques SUMO2/3-ylées. Ensuite, en utilisant la spectrométrie de masse, nous avons identifié 803 protéines synaptiques SUMO2/3-ylées, y compris les cibles SUMO Ubc9, CASK et Synapsin1 précédemment identifiées dans la littérature. Ces données représentent la première cartographie détaillée des cibles SUMO2/3 au niveau des synapses et identifient de nombreuses nouvelles cibles synaptiques de la SUMOylation, dont Flotilline-1 et SynGAP. Il est intéressant de noter que de nombreuses protéines identifiées sont également directement impliquées dans des troubles neurologiques, ce qui suggère que la dérégulation des processus de SUMOylation pourrait participer à l'étiologie de ces maladies cérébrales.

Proteomic identification of an endogenous synaptic SUMOylome in the developing rat brain.

Marie Pronot¹, Félicie Kieffer¹, Anne-Sophie Gay¹, Delphine Debayle¹, Raphaël Forquet¹, Gwénola Poupon¹, Lenka Schorova¹, Stéphane Martin^{2,#} & Carole Gwizdek^{1,#}

¹Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, France.

²Université Côte d'Azur, Inserm, CNRS, IPMC, France.

*Email: Carole Gwizdek (gwizdek@ipmc.cnrs.fr)

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique,
UMR7275, Université Côte d'Azur, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.

Phone: (33) 49395-3462; Fax: (33) 49395-7708

#These authors contributed equally: Stéphane Martin, Carole Gwizdek

Abstract

Synapses are highly specialized structures that interconnect neurons to form functional networks dedicated to neuronal communication. During brain development, synapses undergo activity-dependent rearrangements leading to both structural and functional changes. Many molecular processes are involved in this regulation, including post-translational modifications by the Small Ubiquitin-like MOdifier SUMO. To get a wider view of endogenous synaptic SUMO-modified proteins in the mammalian brain, we combined subcellular fractionation of rat brains at the post-natal day 14 with denaturing immunoprecipitation using anti-SUMO2/3 antibodies and tandem mass spectrometry analysis. Our screen identified 803 candidate SUMO2/3 targets, which represents about 18 % of the synaptic proteome. Our dataset includes neurotransmitter receptors, transporters, adhesion molecules, scaffolding proteins as well as vesicular trafficking and cytoskeleton-associated proteins, defining SUMO2/3 as a functional regulator of the synaptic organization.

Introduction

A functional neuronal network relies on the coordinated organization of billions of highly specified contact points called synapses that interconnect neurons allowing communication in the mammalian brain. During the brain development, synapses undergo constant activity-dependent protein content rearrangements leading to both structural and functional changes. Many processes are involved in this modulation, including protein, mRNA and organelle transports along axons and dendrites, synaptic vesicular trafficking, synapto-dendritic exchanges, local translation and protein degradation. Post-translational modifications (PTM) such as SUMOylation regulate protein function as well as the shaping of macromolecular complexes.

SUMOylation consists in the covalent but reversible attachment of one or more SUMO peptide (around 100 amino acids, *i.e.* 11 kDa) on lysine residues of target proteins. SUMO conjugation is achieved by the sole E2 SUMO-conjugating enzyme Ubc9. Substrate recognition by Ubc9 is either direct or mediated by bridging proteins called E3 ligases. There are three SUMO paralogs (SUMO 1, 2 and 3) in the mammalian brain. SUMO2 and SUMO3 are nearly identical except three additional N-terminal residues in the SUMO3 sequence and are generally referred to SUMO2/3. SUMO1 shares around 50% identity with SUMO2/3 and even though SUMO1 and SUMO2/3 have an overlapping set of targets and functions, they differ in their subcellular abundance and their properties to form poly-SUMO chains^{1,2}. SUMOylation is readily reversible upon the activity of specific deSUMOylation enzymes called SENPs.

At the molecular level, protein SUMOylation can inhibit interactions by promoting a steric hindrance or contribute to new protein-protein interactions by providing an additional binding site for partners presenting SUMO-Interacting Motifs (SIMs)^{1,2}. The consequences of SUMOylation are diverse. For instance, it can regulate the activity or the subcellular localization of some target proteins and/or enhance or inhibit protein degradation via its crosstalk with the Ubiquitin system. SUMOylation can also impact protein solubility and/or aggregation^{3,4} and acts as a spatiotemporal shaping of protein-protein interactions within macromolecular complexes⁵.

The SUMOylation process was initially characterized in the nucleus, where the SUMO substrates are far more abundant. However, it is now clear that SUMOylation also plays important roles extracellularly, for instance in mitochondrial fusion/fission⁶, cytoskeleton organization⁷ or in cellular trafficking⁸. In the brain, expression of the SUMO machinery and the profile of protein SUMOylation varies according to brain areas⁹, cell types¹⁰ and sub-cellular compartments¹¹⁻¹⁴ and evolves with brain maturation and neuronal activity^{11,12,15-20}. As expected, the nuclear compartment of neuronal cells is highly enriched in SUMO enzymes and substrates^{11,13}. In synapses, the levels of SUMOylated proteins are much lower, with the highest levels occurring during the synaptogenesis

period in childhood¹¹. The presence of synaptic SUMOylated proteins has been questioned despite the multiple reports demonstrating the functional and physiological impact of specific SUMOylated proteins at synapses^{3,21-26}. In line with these reports, recent work using super resolution microscopy confirmed the presence of SUMO1, SUMO2/3, Ubc9 and SENPs in both pre- and post-synaptic compartments^{13,14}.

SUMOylation regulates several synaptic proteins^{3,24} involved in spine formation²⁷, neuronal excitability²⁸, presynaptic neurotransmitter release^{29,30} and the synaptic communication and plasticity^{15,31,32}. In addition, neuronal activity often acts as a trigger to promote SUMOylation^{12,15,33} leading to a fine tuning of the synaptic function.

Although the repertoire of identified SUMO substrates at synapses is regularly expanding, a broader view of the SUMO-modified proteins at the mammalian synapse is still missing. Here, we used subcellular fractionation on post-natal day (PND) 14 rat brain, denaturing immunoprecipitations with specific anti-SUMO2/3 antibodies and mass spectrometry analysis to identify a panel of SUMO2/3-modified proteins at the mammalian synapse. We then validated some SUMO-modified proteins among the 803 identified SUMO2/3 targets. This unique dataset represents about 18% of the synaptic proteome and includes neurotransmitter receptors, transporters, adhesion molecules, scaffolding proteins as well as vesicular trafficking and cytoskeleton-associated proteins, revealing a central regulatory function of the mammalian synapse by the SUMOylation process.

Results

Strategy to identify endogenous synaptic SUMO2/3-modified proteins

The expression levels of SUMO-modified substrates as well as the components of the sumoylation machinery are developmentally and spatially regulated in the mammalian brain, with a peak of SUMO2/3-ylated proteins at post-natal days (PND) 14 during the synaptogenesis period³⁴ (Figure 1A,B). PND 14 rat brains were thus subjected to biochemical fractionation to purify the synaptosomal fraction. The quality of the fractionation was then assessed by immunoblotting using antibodies against specific markers for different subcellular compartments (Supplementary Figure 1A). As expected, the synaptosomal fraction was highly enriched in synaptic markers such as PSD95, Synaptotagmin and Homer compared to the other fractions. Synaptosomes also contain mitochondria and some endoplasmic reticulum. In line with this, the respective markers for mitochondria and endoplasmic reticulum, CoxIV and Calnexin, were also detected in the synaptosomal fractions.

Importantly, synaptosomes were totally devoid of nuclear markers confirming the high quality of the fractionation process.

Four independent synaptosomal preparations from PND 14 rat brains were subjected to proteomics analysis. We established a list of 4379 proteins detected in at least 3 of the 4 preparations (Supplementary Table 1). This protein list was then used as our synaptic proteome reference. More than 88% of the proteins listed were found in at least three previously published synaptic proteomes and 97% were detected at least once as synaptic components (Supplementary Table 2). Gene Ontology (GO) terms enrichment analysis showed that 10 of the top 20 for GO Cellular Components terms are associated to synapses whereas the other terms are linked to mitochondria and vesicular structures. Consistently, the top 20 for GO Biological Processes terms revealed the involvement of the identified proteins in synapse organization, vesicle organization and trafficking, mitochondria organization as well as nucleotide metabolic processes (Supplementary Figure 1B,C). Altogether, these data confirmed the enrichment of the samples in synaptic components further highlighting the quality of the synaptosomal purification.

Previous proteomic studies on brain SUMOylation were performed using adult and/or whole brain extracts³⁵⁻³⁹ and consequently, identified a majority of nuclear proteins as neuronal SUMO targets. To elaborate the most efficient protocol to assess synaptic SUMO2/3-ylation, we compared the levels of SUMO2/3-ylated proteins between synaptosomes and the other subcellular fractions of the brain (Figure 1C). As expected, the SUMO2/3 immunoreactivity was maximum in the nuclear fraction, whereas the synaptic SUMO2/3-ylation levels represented less than 1% of the total brain SUMO2/3-ylation. Considering the dynamic range of the Orbitrap Q-Exactive Plus mass spectrometer used in this study, it was absolutely necessary to enrich the preparations in synaptic materials prior to isolate SUMO2/3-ylated proteins by denaturing immunoprecipitation⁴⁰ and identification by mass spectrometry.

To specifically isolate synaptic SUMO2/3-modified proteins, we performed immunoprecipitation using a commercially available mouse monoclonal SUMO-2/3 antibody (Clone 12F3) that binds an epitope within the peptide CQIRFRFDGQPINE in SUMO2/3 (Ref⁴⁰; Supplementary Figure 2). This antibody specifically recognized proteins conjugated to SUMO2 but not conjugated to SUMO1 (Supplementary Figure 2A). Besides, peptide competition experiments monitored by dot blot using recombinant SUMO2 confirmed that free CQIRFRFDGQPINE peptides interfere between SUMO2 and the monoclonal SUMO2 antibody (Supplementary Figure 2B). We then showed that SUMO2/3 antibodies are able to specifically immunoprecipitate SUMO2/3-ylated proteins from rat brain in denaturing conditions (Supplementary Figure 2C,D). We then performed a SUMO2/3

immunoprecipitation combined with a peptidic elution⁴⁰ to purify SUMO2/3-ylated proteins from denatured rat synaptosomes. Solubilisation in 1% SDS efficiently extracted proteins from synaptic membranes, in particular those embedded in detergent resistant compartments such as the post-synaptic density⁴¹. Given the low levels of SUMO2/3-modified proteins at synapses, we performed immunoprecipitation experiments on synaptosomal lysates purified from a total of 10 PND 14 rat brains per MS analysis. To assess the quality of this process, 10% of the proteins isolated with anti-SUMO2/3 antibodies or mouse IgG as negative control were separated on gradient SDS-PAGE and silver stained (Figure 1D, left panel) or immunoblotted for SUMO2/3 (Figure 1D, right panel). Eluates from SUMO2/3 antibody-mediated immunoprecipitation showed a clear enrichment in SUMOylated proteins compared to eluates from matching IgG controls confirming that this approach allows to efficiently purify synaptic SUMO2/3-ylated proteins.

Four synaptic SUMO2/3 immunoprecipitation assays and their IgG controls were performed independently. After protein separation by SDS-PAGE and in gel Trypsin digestion, samples were analyzed by LC-MS/MS. MS data were processed using Proteome Discoverer 2.2 against the Swissprot Rattus Norvegicus database and only Master Proteins with 1% False Discovery Rate (FDR) for both peptides and proteins were considered. The hierarchical clustering according to the protein composition clearly showed that eluates from SUMO2/3 and IgG immunoprecipitations cluster separately, thus reflecting the specificity of our approach (Figure 1E). Then, the list of synaptic SUMO2/3-ylated proteins was built using the following selection criteria: *i*) for each SUMO2/3 immunoprecipitation experiment, proteins present in the respective IgG control were subtracted from the proteins identified following the SUMO2/3 immunoprecipitation and *ii*) the proteins present in at least 3 of the 4 filtered lists were selected as candidate SUMO2/3 targets. This finally led to a list of 803 synaptic SUMO2/3-ylated proteins with 291 (36%) present in all four experiments (Supplementary Table 3).

Insights into the synaptic SUMO2/3-ylome

To analyze the relevance of the synaptic SUMO2/3-ylome, we first compared the list of SUMO2/3-ylated target proteins with reference components of synapse-specific databases or with previously published proteomic datasets obtained from synaptosomes or subspecific components of synaptosomal fractions (Figure 2 and Supplementary Table 4). We showed that more than 97% of the SUMO2/3-ylome were detected in at least five synaptic datasets with, on average over the different selected PSD proteomes, about 40% of the candidate SUMO2/3 target proteins associated with the Post-Synaptic Density (Supplementary Table 4). Thus, the list of SUMO2/3-ylated candidate proteins

identified largely overlapped with previously characterized synaptosomal protein datasets, demonstrating that the SUMO2/3-ylome is directly connected to the synaptic compartment.

Noteworthy, our dataset presented many proteins found to be SUMOylated in previous target specific studies such as mitochondrial proteins (DJ-1/Park7⁴², Sirt3⁴³), constituents or regulatory factors of the cytoskeleton (β -actin, α -Tubulin, RhoGDI, Septins)^{7,44}, signaling molecules (RAS⁴⁵, β -catenin⁴⁶, CYLD⁴⁷), proteins involved in cellular trafficking (Flotillin-1⁴⁸, EDH3⁴⁹, hnRNPA2B1⁵⁰) as well as the well described SUMO-conjugating enzyme Ubc9^{11,35}, the PKC- α and PKC- ϵ ^{3,51} or SOD1⁵².

To go deeper in the validation of the proteomic screen, we next verified the endogenous SUMOylation profile of a selection of candidate SUMO2/3 targets by immunoprecipitation/blotting with specific target antibodies. We first analyzed the modification of the SUMO conjugating enzyme Ubc9 that was previously reported to be SUMOylated in the brain by both SUMO1 and SUMO2/3^{11,35}. In PND14 synaptosomes, free Ubc9 is slightly detected as 18 kDa protein and appears mainly as a modified form (Figure 3A, left panel) that corresponds to a SUMO1-conjugated form¹¹. Several SUMO-targeted lysines were identified in Ubc9 by proteomics or target specific approaches^{11,35,53}. Here, we showed at least four bands upper to the unmodified Ubc9 by immunoprecipitation assays on PND14 synaptosomal lysates using anti-SUMO2/3 antibodies followed by anti-Ubc9 immunoblot (Figure 3A, middle panel). Similar results were obtained in converse experiments where anti-Ubc9 immunoprecipitation was combined with SUMO2/3 immunoblotting (Figure 3A, right panel), thus confirming the modification of Ubc9 by SUMO2/3 at synapses.

Using a similar approach based on conversed and complementary immunoprecipitations, we analyzed the SUMO2/3-ylation profile of Flotillin-1/Reggie-2 (Figure 3B). Flotillin-1 is a multifunctional protein involved in signaling, actin cytoskeleton remodeling or receptor endocytosis/trafficking⁵⁴. In the brain, it participates in synapse formation and neurite branching⁵⁴. Flotillin-1 has been shown to be SUMOylated on several target lysines in cell lines³⁵ and in a cellular model of cancer⁴⁸. Our data indicate that Flotillin-1 is also modified by SUMO2/3 at synapses, presenting multiple conjugated forms in line with the previous reports (Figure 3B).

We next examined the SUMO2/3-ylation of Synaptic Ras-GTPase-activating protein SynGAP (Figure 3C). SynGAP is a downstream effector of NMDA receptors that tunes down the activity of Ras and Rap GTPases and impacts AMPA receptor trafficking within postsynaptic membranes⁵⁵. SynGAP is predominantly localizes at the PSD where it interacts with the scaffolding protein PSD-95. Both SUMO2/3 immunoprecipitation on synaptosomal extracts followed by SynGAP immunoblotting and its converse experiment allowed the detection of a 140-150 kDa SUMO2/3-ylated form of the protein (Figure 3C).

In addition to these biochemical validations, we compared our dataset to two previously published rodent brain SUMO2/3-ylomes^{35,36}. Thirty-six proteins of our synaptic SUMO2/3-ylome (i.e. 4.5%) were formerly shown to be modified by SUMO2/3 in the Central Nervous System (Supplementary Table 5). This narrow overlap is largely explained by the fact that these proteomic analyses were performed on whole adult brain extracts without any synaptic enrichments and as such, essentially identified nuclear SUMOylated conjugates. Interestingly, an extended comparison with SUMOylomes obtained from 15 previous proteomics analysis in other cellular models indicates that 62% of our identified SUMO targets were also found in these studies. The overlap increased to 74% when alternative approaches were included (Supplementary Table 5). Altogether, these analyses further validated the SUMO immunoprecipitation approach on synaptosomal-enriched fractions from PND14 brains.

SUMO2/3, a functional regulator of the synaptic organization

We identified 803 SUMO2/3-modified protein candidates, which represents around 18% of our reference synaptic proteome (Figure 2 and Supplementary Table 4). To assess the biological meaning of this synaptic SUMO2/3-ylome, we performed Gene Ontology terms as well as KEGG and Reactome pathways enrichment analysis (Figure 4). Consistent with the clear overlaps with known synaptic proteomes and sub-proteomes (Figure 2 and Supplementary Table 4), the top 20 of enriched GO Cellular Components C terms were connected to synapses, mitochondria and vesicles. Regarding GO Biological Processes or KEGG/Reactome pathways (Figure 4C,D), the synaptic SUMO2/3-modified proteome was enriched in proteins associated with neuronal development, organization and function, such as dendritic development (30 genes/proteins found in the SUMO2/3 dataset over 301 genes/proteins in the category), axon guidance (19/218), post-synapse organization (27/205), long-term potentiation (14/65) or depression (13/62), as well as glutamatergic (21/115), dopaminergic (19/129) and GABAergic synapses (14/87). In line with an enrichment in glutamatergic synapses, the synaptic SUMO2/3-ylome was also highlighted for the molecular function of glutamate receptors (12/67) and ionotropic glutamate receptor binding (9/44; Figure 4B). Besides, vesicle-associated pathways as well as mitochondrial organization and processes, closely related to the synaptic function, clearly emerged in these analyses. Interestingly, the regulation of the actin cytoskeleton, which is involved in the shaping and intracellular trafficking at synapses as well as the proteasome, which participates in synaptic protein homeostasis, were also featured (Figure 4C,D). Cellular Components and Biological Processes enrichment analysis using the synapse specific annotation database SynGO⁵⁶ clearly corroborated the involvement of the synaptic SUMO2/3-ylome in synaptic organization, transmission and plasticity (Figure 4E,F).

Synaptic subdomains are organized around large dynamic protein networks. One of the main roles of SUMOylation is the modulation of protein-protein interactions. Since proteins subjected to SUMOylation are highly interconnected⁵⁷, we tested the interconnectedness of the synaptic SUMO2/3-ylome using the STRING tool. As illustrated in Figure 5A, the synaptic SUMO2/3 targets assembled in a highly organized network. 74% of all identified proteins (599/803) were connected at high STRING confidence with an average node degree of 5.61, and 98% (551/803) of the proteins belonged to the core cluster. Using the Cytoscape resource, proteins connected according to experiments interaction source were extracted and the new network was submitted to clusters analysis (Figure 5B). Our settings highlight eight sub-complexes with an average node degree superior or equal to 3. The four prevalent clusters comprised numerous functionally related proteins from the cytoplasmic and mitochondrial ribosomes, the NADH deshydrogenase and the proteasome. Consistent with these findings, modification of the proteasomal subunits was robustly reported in different SUMO proteomes⁵⁷⁻⁵⁹ (Supplementary Table 5). In addition to the proteasome, ribosomes were also detected as one of the most dominant clusters in SUMOylome networks analysis^{57,58} and many mitochondrial ribosomal proteins were detected as SUMO substrates in several proteomics analysis (Supplementary Table 5). The other clusters were composed of proteins of the PSD, some members of the cytoplasmic dynein complex as well as the retromer complex involved in intracellular trafficking, or some aminoacyl t-RNA synthetases (ARS) associated with the ARS-interacting multi-functional protein 2.

In the above sections, we highlighted an enrichment in SUMO2/3-modified proteins dataset in KEGG pathways referring to addiction and neurodegenerative diseases. To get a broader view of the connections between the synaptic SUMO2/3-ylome and human brain disorders, we interrogated diseases databases using the ToppGene web tool. We found that 318 proteins out of the 803, which corresponds to about 40% of the SUMO2/3-ylome, are connected with at least one brain disease (Supplementary Table 6). In the enrichment analysis, the first 25 hits displayed many neurodevelopmental, psychiatric or neurodegenerative disorders, including, but not restricted to, schizophrenia, autism, epilepsy, Alzheimer's and Parkinson's diseases (Figure 6).

Discussion

During the formation of a functional neuronal network, synapses undergo massive molecular, structural and functional changes. Post-translational modifications dynamically control protein-protein interactions, impacting their functions and are thus, key determinants for these essential processes. In the present study, we identified 803 SUMO2/3-modified proteins at the synapses of PND 14 rat brains.

The main difficulties classically encountered in the identification of endogenous SUMOylated proteins are the reversible nature of the SUMO conjugation process and the low proportion of modified protein for most SUMO substrates. In the case of synapses, the levels of SUMOylation are very low in comparison to the levels detected in other subcellular compartments. We estimate here that the nuclear fraction shows SUMOylation levels of more than one hundred-fold higher than in the synapse. In addition, the overall volume of the synaptic compartment is minimal compared to the rest of the cell. Synapses also present highly cohesive subdomains like the postsynaptic density, compromising the efficient biochemical protein extraction. To circumvent these difficulties, there is an absolute need to enrich biochemical preparations in synaptic proteins and use a substantial amount of starting materials. We thus purified SUMO2/3-ylated proteins by denaturing immunoprecipitation on synaptic preparations from 10 PND14 rat brains per point *i.e.*, when the synaptic SUMO levels are at their maximum, prior to the identification of SUMO2/3-ylated by tandem mass spectrometry. These conditions should be considered as a gold standard to efficiently identify synaptic SUMO targets at the mammalian synapse. Among the 803 synaptic SUMO2/3 target proteins identified, which represents around 18% of the whole set of synaptic proteins, we experimentally validated three of them, Ubc9, Flotillin-1 and SynGAP. Moreover, a bioinformatic analysis revealed that many proteins of this dataset are found SUMOylated in previous target specific studies. The comparison of our list of proteins to other available SUMOylomes characterized by proteomics or by alternative approaches revealed that there is an overlap of more than 70% with the current dataset.

Surprisingly, our protein list contains a few proteins traditionally referenced as nuclear SUMO targets. This is the case for instance for RanGAP1, one of the most abundant and stable SUMO targets, predominantly associated to the nuclear envelope. Interestingly, RanGAP1 has been observed in the nucleus of neurons but localized also in their axons and dendrites^{60,61} where it may regulate the availability of factors involved in axonal growth or anterograde transport by controlling the GTP-bound state of the small GTPase Ran. The current list of proteins also contains Trim28/Kap1, a transcriptional repressor and a ubiquitin and SUMO ligase able to auto-SUMOylate⁶². Yet, Trim28/Kap1 has been shown to ubiquitylate targets out of the nucleus such as the vacuolar protein sorting Vps34⁶³ or the mitochondrial BCL2A1⁶⁴. Importantly, both RanGAP1 and Trim28 have been referenced in synaptic datasets (Supplementary Table 2) and it is thus not surprising to have also identified some SUMO2/3 target proteins initially linked to the nucleus in the present synaptic SUMOylome.

The network analysis of SUMO targets as well as the identification of the cellular compartments and the biological pathways enriched in our dataset revealed that many protein clusters

are regulated by SUMO at the synapses including ribosomal and proteasomal protein complexes. These two machineries play an essential role in synaptic protein homeostasis, ribosomes by promoting local translation, and the proteasome, by driving protein degradation. Components of both complexes were frequently identified in SUMO proteomics analysis⁵⁷⁻⁵⁹. However, the functional role of SUMO in the regulation of these complexes is still poorly defined. These protein assemblies combining multivalent but dynamic interactions are perfect candidates for SUMOylation⁶⁵. Indeed, collective SUMOylation of protein subunits may stabilize and/or modulate these complex assemblies, SUMO acting as a glue to hold the components together through intermolecular SUMO-SIM interactions.

In addition, several proteins located in the post-synaptic density has been identified as SUMOylated in the MS analysis. For instance, the PSD is composed of hundreds of different proteins including neurotransmitters receptors, scaffold proteins, and many signaling molecules. The PSD is organized as a thickly packed but highly dynamic interconnected assembly of many proteins, creating a defined synaptic subdomain. Recent studies suggest that the assembly and activity-dependent modulation of the PSD composition involves liquid-liquid phase separation (LLPS)⁶⁶. LLPS governs the formation of many membraneless compartments or macromolecular structures as the nucleolus, the PML bodies and stress or mRNA transport granules⁶⁷. Interestingly, increasing evidences point out a central role of SUMOylation in the composition of LLPS-based structures. One of the best-characterized examples is its role in the tuning of PML bodies formation⁶⁷. More recently, SUMO has been involved in the regulation of the LLPS promoted SOP-2 bodies⁶⁸ and in stress granules assembly and disassembly⁶⁹. It is interesting to note that intrinsically disordered regions (IDR) that are key drivers to LLPS, are the preferential domains targeted by SUMO⁷⁰. At synapses, LLPS would also be involved in the organization of the PSD notably through interactions between PSD95 and SynGAP⁶⁶. Since we showed that SynGAP is SUMO2/3-ylated at synapses, it would be of interest to examine whether its modification could interfere within its interaction with PSD95 and thus, participate in the regulation of the synaptic organization. LLPS may also play a role in the clustering of the reserve pool of synaptic vesicles through Synapsin 1-mediated interactions or via the formation of active zone complexes containing RIM1 α and RIM-binding proteins⁶⁶. Strikingly, RIM1 α and synapsin1 are known SUMO targets; Synapsin 1 being modified in its IDR at the lysine 687 (Refs^{29,71}). Since the present dataset includes numerous proteins associated with the PSD as well as components of synaptic vesicles, we can easily speculate that SUMOylation of some of these proteins represents an effective way to modulate the dynamic formation and/or elimination of synaptic LLPS mediated protein complexes.

The MS screen also identified many mitochondrial proteins as SUMO2/3 targets. The results are consistent with the presence of SUMOylation and deSUMOylation enzymes as well as SUMOylated

proteins associated with mitochondria in cell line models or in cultured neurons^{9,43,72}. In addition, a number of studies dedicated to elucidate the function of specific mitochondrial SUMO targets indicated that SUMOylation participates in mitochondrial biogenesis, regulates their fusion/fission processes⁴² and contributes to the metabolic adaptation of mitochondria to stress⁴³. It is thus not surprising that SUMO2/3 substrates are also identified at synapses as mitochondria are natural components of this compartment. Interestingly, mutations of the mitochondrial SUMO target DJ-1, also identified in the present screen, are associated with early-onset familial Parkinson's disease (PD). The most deleterious DJ-1 mutation associated with PD leads to the aberrant SUMOylation of DJ-1 compromising the function and solubility of the protein⁴², which reinforced the idea that SUMOylation is essential to the synaptic mitochondrial function in physiological conditions.

The overall SUMO system is essential for the proper development and function of the brain. Indeed, disruption of the SUMOylation/deSUMOylation balance in animal models leads to deleterious effects such as neurodegeneration, seizure, impairments in learning and memory and/or dysfunctional behaviors⁷³⁻⁷⁵. In the context of hypothermia, hibernation or ischemia, SUMOylation levels are significantly increased as part of a physiological neuroprotective response to stressful events. Thus, many efforts have been arrayed to pharmacologically modulate the SUMOylation machinery to protect the brain from damages caused by cerebral ischemia⁷⁶. Several studies have also highlighted a tight link between SUMO and brain disorders^{24,77}. In neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, several proteins involved in the etiology of these diseases are modified by SUMO⁷⁷. In addition, human AD brains present an increased SUMOylation level both in cortical tissue and synaptosomal lysates²⁶. Consistent with these findings, diseases annotation connects the present SUMO2/3 dataset to a large spectrum of neurological disorders, from neurodevelopmental pathologies to neurodegenerative diseases including schizophrenia, autism, epilepsy, Alzheimer's and Parkinson's diseases. By enlarging the repertoire of pathophysiological processes potentially affected by SUMOylation, our results provide additional perspectives to propose new biological markers or complementary therapeutic strategies. In particular, considering the neuroprotective effect of SUMO in response to cellular stresses, one can imagine to target brain pathologies involving altered SUMOylation levels using drugs modulating the SUMO system.

To conclude, we report here that around 18% of the synaptic proteome is detected as SUMO2/3-ylated and propose that this post-translational modification regulates a wide range of cellular processes from synapse formation to synaptic transmission and plasticity. SUMO2/3 targets functionally connected synaptic proteins, suggesting that protein-group SUMOylation occurs at synapses and contributes to the modulation of synaptic multimeric complexes. A broader view would now require the characterization of the SUMO1-ylome as well as the identification of synaptic proteins

presenting SUMO-interacting motifs. Moreover, SUMOylation evolving with brain development and life span, it would be particularly interesting to follow the SUMOylation profile of synaptic proteins over the age. With the current work, we finally propose an overall picture of the SUMO2/3 landscape at the mammalian synapse. Recent advances in imaging techniques allow to spatially and functionally map individual synapses according to their content in specific markers⁷⁸ revealing that synapses are much more diverse than anticipated with each brain region having specific signatures regarding their synaptic composition. It is likely that PTM also participate in this identity card. In this context, detecting the SUMOylation status of specific target proteins in the brain at the single cell level is likely one of the most promising challenge in the future.

Methods

Rat Strain

Wistar rats were exclusively from a commercial source (Janvier, St Berthevin, France). All animals were handled and treated in accordance with the ARRIVE Guidelines. Animals had free access to water and food. Lightening was controlled as a 12h light and dark cycle and the temperature maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$. For brain retrieval, PND 14 pups were euthanized by decapitation according to a protocol approved by the Animal Care and Ethics Committee and forebrains were immediately excised and used.

Synaptosomal preparation

Synaptosomal preparation was adapted from previously published protocols¹⁵. Fresh forebrains of four PND 14 rats were homogenized in 26 mL of ice-cold Sucrose Buffer (0.32 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail Roche, 20 mM NEM) using a 30 ml glass-Teflon homogenizer with 12 gentle strokes. The homogenate (total fraction, Tot) was centrifuged at 1000 g for 5 min at RT in a JA4.2 rotor (Beckman). The supernatant (cytoplasmic fraction, Cyt) was then layered by 2 ml on the top of a four-step Percoll-sucrose density gradient (2 mL of 20% Percoll, 2 mL of 10% Percoll, 2 mL of 6% Percoll, and 2 mL of 2% Percoll in Sucrose Buffer) and centrifuged at 18 000 rpm for 10 min at 4°C in a SW41Ti rotor (Beckman). Synaptosomal fraction was recovered at the 10-20% interface Percoll layers. This fraction was then washed in 10 mL of HEPES Buffer (5 mM HEPES, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail Roche, 10 mM NEM) and centrifuged at 10,000 g for 10 min in JA25.5 rotor (Beckman). The synaptosomal pellet was resuspended in

Denaturing Lysis Buffer (20 mM Sodium Phosphate buffer pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, 1% SDS, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail Roche, 10 mM NEM), supplemented with 50 mM DTT and boiled for 10 min at 95°C. Protein concentration was determined using standard Bradford assay.

Antibodies immobilization on Protein-G Sepharose beads

For IP beads preparation, 60 µL of Protein-G Sepharose beads (Sigma, P3296) were washed 3 times and incubated in PBS for 45 min at RT with a ratio of 2 µg of anti-SUMO-2/3 mouse monoclonal antibody (Clone 12F3, Cytoskeleton) or mouse IgG antibody as a negative control per 100 µg of synaptosomes. After two washes in 20 mM Sodium Phosphate buffer (NaPi) pH7 and two washes in Triethanolamine Buffer (200 mM Triethanolamine, pH 8.2), beads were incubated for 1h at RT in 30 mM dimethylpimelidate (DMP) freshly resuspended in Triethanolamine Buffer to crosslink the antibodies to the beads. The crosslinking step was stopped by resuspension of the beads in 50 mM Tris-HCl pH8. Finally, the beads were washed once with 200 mM Glycine pH2.9 and twice with 20 mM NaPi pH8.

Immunoprecipitation experiments

The denaturing immunoprecipitation protocol was adapted from Ref⁴⁰. Briefly, the denatured synaptosomal fractions were diluted in Dilution Buffer (20 mM NaPi pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail Roche, 10 mM NEM) to obtain a final concentration of 0.1% SDS. The lysate was centrifuged for 10 min at 20,000 g at 4°C. 8 mg of proteins, corresponding to synaptosomes isolated from ten PND14 rat brains, were incubated with 160 µg of immobilized anti-SUMO-2/3 mouse monoclonal antibody, or mouse IgG antibody as a negative control, overnight at 4°C under soft rotation. Beads were washed 3 times for 5 minutes at 4°C in Wash Buffer (20 mM NaPi pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, 0.1% SDS, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail Roche). Beads were additionally washed in Wash Buffer containing 500 mM NaCl for 30 min at 37°C. Proteins bound to the beads were then eluted 3 times for 30 min at 37°C with 200 µl of Wash Buffer supplemented with 0.5 mg/mL of SUMO2 peptide (CQIRFRFDGQPINE). Eluates were pooled and subjected to TCA precipitation prior to quality controls and mass spectrometry analysis.

SUMO2/3-ylated proteins immunoprecipitation from total brain extracts were performed as described above with few modifications: Beads were coated after antibody immobilization in Coating Buffer (PBS 1X, BSA 5 mg/mL, Dextran 40 kDa, 5 mg/mL, Gelatin 1 mg/mL). Proteins bound to the beads were eluted in 2X Laemmli buffer + 5% β-mercaptoethanol.

Target immunoprecipitation: For the validation of SUMO targets, synaptosomal fractions were denatured in Denaturation buffer (20 mM NaPi pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1% SDS, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail Roche, 10 mM NEM) for 15 min at 56°C. The denatured synaptosomal fraction was diluted in Dilution Buffer to obtain a final concentration of 0.1% SDS. Lysates were centrifuged for 15 min at 20,000g à 4°C. 800 µg of proteins were incubated with immobilized anti-Ubc9 or not immobilized anti-SynGAP or anti-Flotillin-1 on coated Protein-G Sepharose beads, overnight at 4°C under rotation. The corresponding IgG antibody was used as a negative control. The beads were then washed 3 times at 4°C in Wash Buffer. Proteins were eluted in Laemmli Buffer supplemented with 5% β-mercaptoethanol.

Mass spectrometry analysis

Sample preparation: Proteins from immunoprecipitation eluates were separated on SDS-PAGE on Bis-Tris gradient gel (4-20%, Mini-PROTEAN®, BioRad) and colored by Coomassie staining (Imperial blue). Each lane was manually excised into 10 bands. Proteins contained into gel slices were reduced/alkylated and digested by a treatment with DTT/IAA and trypsin. Tryptic peptides were isolated by successive extractions in 1% formic acid (FA), in water and in acetonitrile (ACN). Peptides extracts from adjacent bands were pooled two by two prior to LC-MS/MS analysis, concentrated under vacuum and solubilised in 15 µL of aqueous 0.1% formic acid. The resulting five peptides mix were then subjected to LC-MS/MS analysis.

NanoHPLC-Q-exactive plus analysis: Peptide separations were carried out on a nanoHPLC (ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific). 5 µl of peptidic solution was injected and concentrated on a µ-Precolumn Cartridge Acclaim PepMap 100 C18 (i.d. 5 mM, 5 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) at a flow rate of 10 µL/min and using solvent containing H₂O/ACN/FA 98%/2%/0.1%. Next, peptides separation was performed on a 75 µm i.d. x 500 mM (3 µm, 100 Å) Acclaim PepMap 100 C18 column (Thermo Fisher Scientific) at a flow rate of 200 nL/min. Solvent systems were: (A) 100% water, 0.1%FA, (B) 100% acetonitrile, 0.08% FA. The following gradient was used t = 0 min 4% B; t = 3 min 4%B; t = 170 min, 35% B; t = 172 min, 90% B; t = 180 min 90% B (temperature set at 35°C). The nanoHPLC was coupled via a nanoelectrospray ionization source to a Hybrid Quadrupole-Orbitrap High Resolution Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific). MS spectra were acquired at a resolution of 70 000 (200 m/z) with a scan range of 150–1800 m/z, an AGC target value of 5e5 and a maximum injection time of 50 ms. 10 most intense precursor ions were selected and isolated with a window of 2 m/z and fragmented by HCD (Higher energy C-Trap Dissociation) with normalized collision energy (NCE) of 27. MS/MS spectra were acquired in the ion trap at a resolution of 17 500 (200 m/z) with an AGC target value of 2e5 and a maximum injection time of 100 ms.

Protein identification: Data were reprocessed using Proteome Discoverer 2.2 equipped with Sequest HT. Files were searched against the Swissprot Rattus Norvegicus Reviewed and Unreviewed FASTA database. A mass accuracy of ± 10 ppm was used to precursor ions and 0.02 Da for product ions. Enzyme specificity was fixed to trypsin with two missed cleavages allowed. Because of previous chemical modification, carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification and only oxidation of methionine was considered as dynamic modification. Reverses decoy databases were included for all searches to estimate false discovery rates, and filtered using Percolator algorithm with a 1% FDR.

SDS-PAGE and Western Blotting

Samples from the anti-SUMO2/3 immunoprecipitations and the associated IgG negative control were resolved by SDS-PAGE followed by silver staining (Silver Quest Kit; Invitrogen) for quality control or Coomassie staining (Imperial blue) prior to in gel trypsin digestion and mass spectrometry analysis. For immunoblotting, proteins separated by SDS-PAGE were transferred onto nitrocellulose membrane (BioTrace NT, Pall Corporation) and immunoblotted using the following primary antibodies at the indicated dilution: mouse anti-SUMO2/3 (clone 12F3, Cytoskeleton, ASM23) 1/1000, rabbit polyclonal anti-SUMO2/3 (Dr Guillaume Bossis, IGGM, France) 1/750, mouse anti-SUMO1 (clone 21C7, DSHB) 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mouse anti-Synaptotagmin (Stressgen, SYA-148) 1/2000, rabbit anti-PSD95 (Millipore, AB9708) 1/2000, rabbit anti-Homer (Synaptic System, 160003) 1/1000, mouse anti-CoxIV (Abcam, ab14744) 1/2000, mouse anti-SOD2 (Santa Cruz, sc-137254) 1/2000, mouse anti-Calnexin (Santa Cruz, sc-23954), rabbit anti-GM130 (BD Biosciences, 610823) 1/500, mouse anti-Nopp140 (Santa Cruz, sc-374033) 1/700, mouse anti-Fibrillarin (Invitrogen, MA3-16771) 1/2000, rabbit anti-Histone H4 (Active Motif, 39269) 1/2000, mouse anti-Ubc9 (BD Biosciences, 610749) 1/250, rabbit anti-SynGAP (Synaptic System, 157002) 1/1000; mouse anti-Flotillin1 (BD Biosciences, 610820) 1/500. Primary antibodies were revealed using the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (GE healthcare) or True Blot (Rockland, Tebu-Bio). Proteins were then identified using Immobilon Western (Millipore), SuperSignal Femto chemiluminescence (ThermoScientific) or Western Lightning Ultra (Perkin Helmer) chemiluminescent solutions and images acquired on a Fusion FX7 system (Vilber Lourmat). Full-size blots for cropped gels can be found in Supplementary Figure 3.

Bioinformatics analysis

To compare proteome datasets, protein identifiers were converted to Entrez Gene identifiers using Uniprot, DAVID and db2db conversion tools. When rat datasets were compared to human or mouse datasets, human or mouse homologs to rat proteins were identified using the DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool or alternatively Blast. Hierarchical clustering of SUMO2/3 and control

immunoprecipitation eluates was performed using Euclidian distance according to the presence (score = 1) or the absence (score = 0) in each sample of all identified proteins. Gene Ontology (GO) terms enrichment analysis were performed using clusterProfiler (ontology level 2) on the web interface Proteore⁷⁹. KEGG and Reactome pathways enrichment analysis were performed using DAVID. Enrichment analysis using the synapse specific database SynGO⁵⁶ were performed against the “brain expressed” background, setting medium stringency and second level terms as labels for Cellular Component representation and top-levels terms as labels for Biological Pathways representation. Disease annotations were conducted with the ToppGene portal on the human homologs of the rat protein dataset. Network analysis were performed using the STRING web tool (v. 11.0) combined to the Cytoscape application (v.3.8.2) implemented by the StringApp plug-in. Details for enrichment analysis are available in Supplementary Table 6.

References

- 1 Chang, H. M. & Yeh, E. T. H. SUMO: From Bench to Bedside. *Physiol Rev* **100**, 1599-1619, doi:10.1152/physrev.00025.2019 (2020).
- 2 Cappadocia, L. & Lima, C. D. Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chem Rev* **118**, 889-918, doi:10.1021/acs.chemrev.6b00737 (2018).
- 3 Henley, J. M. *et al.* SUMOylation of synaptic and synapse-associated proteins: An update. *J Neurochem* **156**, 145-161, doi:10.1111/jnc.15103 (2021).
- 4 Janer, A. *et al.* SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7. *Hum Mol Genet* **19**, 181-195, doi: 10.1093/hmg/ddp478 (2010).
- 5 Matunis, M. J., Zhang, X. D. & Ellis, N. A. SUMO: the glue that binds. *Dev Cell* **11**, 596-597, doi:10.1016/j.devcel.2006.10.011 (2006).
- 6 Harder, Z., Zunino, R. & McBride, H. Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol* **14**, 340-345, doi:10.1016/j.cub.2004.02.004 (2004).
- 7 Alonso, A. *et al.* Emerging roles of sumoylation in the regulation of actin, microtubules, intermediate filaments, and septins. *Cytoskeleton (Hoboken)* **72**, 305-339, doi:10.1002/cm.21226 (2015).
- 8 Wasik, U. & Filipek, A. Non-nuclear function of sumoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 2878-2885, doi:10.1016/j.bbamcr.2014.07.018 (2014).
- 9 Akiyama, H., Nakadate, K. & Sakakibara, S. I. Synaptic localization of the SUMOylation-regulating protease SENP5 in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* **526**, 990-1005, doi:10.1002/cne.24384 (2018).
- 10 Maruyama, T., Wada, H., Abe, Y. & Niikura, T. Alteration of global protein SUMOylation in neurons and astrocytes in response to Alzheimer's disease-associated insults. *Biochem Biophys Res Commun* **500**, 470-475, doi:10.1016/j.bbrc.2018.04.104 (2018).
- 11 Loriol, C., Parisot, J., Poupon, G., Gwizdek, C. & Martin, S. Developmental regulation and spatiotemporal redistribution of the sumoylation machinery in the rat central nervous system. *PLoS One* **7**, e33757, doi:10.1371/journal.pone.0033757 (2012).
- 12 Schorova, L. *et al.* The synaptic balance between sumoylation and desumoylation is maintained by the activation of metabotropic mGlu5 receptors. *Cell Mol Life Sci* **76**, 3019-3031, doi:10.1007/s00018-019-03075-8 (2019).
- 13 Colnaghi, L. *et al.* Super Resolution Microscopy of SUMO Proteins in Neurons. *Front Cell Neurosci* **13**, 486, doi:10.3389/fncel.2019.00486 (2019).
- 14 Colnaghi, L. *et al.* Neuronal Localization of SENP Proteins with Super Resolution Microscopy. *Brain Sci* **10**, doi:10.3390/brainsci10110778 (2020).
- 15 Loriol, C. *et al.* mGlu5 receptors regulate synaptic sumoylation via a transient PKC-dependent diffusional trapping of Ubc9 into spines. *Nat Commun* **5**, 5113, doi:10.1038/ncomms6113 (2014).
- 16 Josa-Prado, F., Luo, J., Rubin, P., Henley, J. M. & Wilkinson, K. A. Developmental profiles of SUMOylation pathway proteins in rat cerebrum and cerebellum. *PLoS One* **14**, e0212857, doi:10.1371/journal.pone.0212857 (2019).
- 17 Ficulle, E., Sufian, M. D. S., Tinelli, C., Corbo, M. & Feligioni, M. Aging-related SUMOylation pattern in the cortex and blood plasma of wild type mice. *Neurosci Lett* **668**, 48-54, doi:10.1016/j.neulet.2018.01.004 (2018).
- 18 Andreou, A. M. & Tavernarakis, N. Roles for SUMO modification during senescence. *Adv Exp Med Biol* **694**, 160-171, doi:10.1007/978-1-4419-7002-2_12 (2010).
- 19 Craig, T. J. & Henley, J. M. Protein SUMOylation in spine structure and function. *Curr Opin Neurobiol* **22**, 480-487, doi:10.1016/j.conb.2011.10.017 (2012).
- 20 Watanabe, M., Takahashi, K., Tomizawa, K., Mizusawa, H. & Takahashi, H. Developmental regulation of Ubc9 in the rat nervous system. *Acta Biochim Pol* **55**, 681-686 (2008).
- 21 Daniel, J. A. *et al.* Analysis of SUMO1-conjugation at synapses. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.26338 (2017).

- 22 Wilkinson, K. A. *et al.* Commentary: Analysis of SUMO1-conjugation at synapses. *Front Cell Neurosci* **11**, 345, doi:10.3389/fncel.2017.00345 (2017).
- 23 Lee, L., Sakurai, M., Matsuzaki, S., Arancio, O. & Fraser, P. SUMO and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* **15**, 720-736, doi:10.1007/s12017-013-8257-7 (2013).
- 24 Schorova, L. & Martin, S. Sumoylation in Synaptic Function and Dysfunction. *Front Synaptic Neurosci* **8**, 9, doi:10.3389/fnsyn.2016.00009 (2016).
- 25 Liu, F. Y. *et al.* SUMOylation in Neurological Diseases. *Curr Mol Med* **16**, 893-899, doi:10.2174/1566524017666170109125256 (2017).
- 26 Marcelli, S. *et al.* Targeting SUMO-1ylation Contrasts Synaptic Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* **54**, 6609-6623, doi:10.1007/s12035-016-0176-9 (2017).
- 27 Khayachi, A. *et al.* Sumoylation regulates FMRP-mediated dendritic spine elimination and maturation. *Nat Commun* **9**, 757, doi:10.1038/s41467-018-03222-y [pii] (2018).
- 28 Plant, L. D., Dowdell, E. J., Dementieva, I. S., Marks, J. D. & Goldstein, S. A. SUMO modification of cell surface Kv2.1 potassium channels regulates the activity of rat hippocampal neurons. *J Gen Physiol* **137**, 441-454, doi:10.1085/jgp.201110604 (2011).
- 29 Girach, F., Craig, T. J., Rocca, D. L. & Henley, J. M. RIM1alpha SUMOylation is required for fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell Rep* **5**, 1294-1301, doi:10.1016/j.celrep.2013.10.039 (2013).
- 30 Tang, L. T., Craig, T. J. & Henley, J. M. SUMOylation of synapsin Ia maintains synaptic vesicle availability and is reduced in an autism mutation. *Nat Commun* **6**, 7728, doi:10.1038/ncomms8728 (2015).
- 31 Choi, J. H. *et al.* Regulation of mGluR7 trafficking by SUMOylation in neurons. *Neuropharmacology* **102**, 229-235, doi:10.1016/j.neuropharm.2015.11.021 (2016).
- 32 Martin, S., Nishimune, A., Mellor, J. R. & Henley, J. M. SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* **447**, 321-325, doi:10.1038/nature05736 (2007).
- 33 Loriol, C., Khayachi, A., Poupon, G., Gwizdek, C. & Martin, S. Activity-dependent regulation of the sumoylation machinery in rat hippocampal neurons. *Biol Cell* **105**, 30-45, doi:10.1111/boc.201200016 (2013).
- 34 Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. & Noble-Haeusslein, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* **106-107**, 1-16, doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001 (2013).
- 35 Hendriks, I. A. *et al.* Site-specific characterization of endogenous SUMOylation across species and organs. *Nat Commun* **9**, 2456, doi:10.1038/s41467-018-04957-4 (2018).
- 36 Yang, W. *et al.* Small ubiquitin-like modifier 3-modified proteome regulated by brain ischemia in novel small ubiquitin-like modifier transgenic mice: putative protective proteins/pathways. *Stroke* **45**, 1115-1122, doi:10.1161/STROKEAHA.113.004315 (2014).
- 37 Tirard, M. *et al.* In vivo localization and identification of SUMOylated proteins in the brain of His6-HA-SUMO1 knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 21122-21127, doi:10.1073/pnas.1215366110 (2012).
- 38 Matsuzaki, S. *et al.* SUMO1 Affects Synaptic Function, Spine Density and Memory. *Sci Rep* **5**, 10730, doi:10.1038/srep10730 (2015).
- 39 Stankova, T., Piepkorn, L., Bayer, T. A., Jahn, O. & Tirard, M. SUMO1-conjugation is altered during normal aging but not by increased amyloid burden. *Aging Cell* **17**, e12760, doi:10.1111/accel.12760 (2018).
- 40 Becker, J. *et al.* Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 525-531, doi:10.1038/nsmb.2526 (2013).
- 41 Jordan, B. A., Fernholz, B. D., Neubert, T. A. & Ziff, E. B. in *The Dynamic Synapse: Molecular Methods in Ionotropic Receptor Biology* *Frontiers in Neuroscience* (eds J. T. Kittler & S. J. Moss) (2006).
- 42 Guerra de Souza, A. C., Prediger, R. D. & Cimarosti, H. SUMO-regulated mitochondrial function in Parkinson's disease. *J Neurochem* **137**, 673-686, doi:10.1111/jnc.13599 (2016).
- 43 He, J., Cheng, J. & Wang, T. SUMOylation-Mediated Response to Mitochondrial Stress. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21165657 (2020).

- 44 Feng, W. *et al.* SUMOylation of alpha-tubulin is a novel modification regulating microtubule dynamics. *J Mol Cell Biol* **13**, 91-103, doi:10.1093/jmcb/mjaa076 (2021).
- 45 Choi, B. H., Philips, M. R., Chen, Y., Lu, L. & Dai, W. K-Ras Lys-42 is crucial for its signaling, cell migration, and invasion. *J Biol Chem* **293**, 17574-17581, doi:10.1074/jbc.RA118.003723 (2018).
- 46 Karami, S. *et al.* Novel SUMO-Protease SENP7S Regulates beta-catenin Signaling and Mammary Epithelial Cell Transformation. *Sci Rep* **7**, 46477, doi:10.1038/srep46477 (2017).
- 47 Kobayashi, T., Masoumi, K. C. & Massoumi, R. Deubiquitinating activity of CYLD is impaired by SUMOylation in neuroblastoma cells. *Oncogene* **34**, 2251-2260, doi:10.1038/onc.2014.159 (2015).
- 48 Jang, D., Kwon, H., Choi, M., Lee, J. & Pak, Y. Sumoylation of Flotillin-1 promotes EMT in metastatic prostate cancer by suppressing Snail degradation. *Oncogene* **38**, 3248-3260, doi:10.1038/s41388-018-0641-1 (2019).
- 49 Cabasso, O., Pekar, O. & Horowitz, M. SUMOylation of EHD3 Modulates Tubulation of the Endocytic Recycling Compartment. *PLoS One* **10**, e0134053, doi:10.1371/journal.pone.0134053 (2015).
- 50 Villarroja-Beltri, C. *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* **4**, 2980, doi:10.1038/ncomms3980 (2013).
- 51 Zhao, X., Xia, B., Cheng, J., Zhu, M. X. & Li, Y. PKCepsilon SUMOylation Is Required for Mediating the Nociceptive Signaling of Inflammatory Pain. *Cell Rep* **33**, 108191, doi:10.1016/j.celrep.2020.108191 (2020).
- 52 Fei, E. *et al.* SUMO-1 modification increases human SOD1 stability and aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* **347**, 406-412, doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.092 (2006).
- 53 Knipscheer, P. *et al.* Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol Cell* **31**, 371-382, doi:10.1016/j.molcel.2008.05.022 (2008).
- 54 Kwiatkowska, K., Matveichuk, O. V., Fronk, J. & Ciesielska, A. Flotillins: At the Intersection of Protein S-Palmitoylation and Lipid-Mediated Signaling. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21072283 (2020).
- 55 Jeyabalan, N. & Clement, J. P. SYNGAP1: Mind the Gap. *Front Cell Neurosci* **10**, 32, doi:10.3389/fncel.2016.00032 (2016).
- 56 Koopmans, F. *et al.* SynGO: An Evidence-Based, Expert-Curated Knowledge Base for the Synapse. *Neuron* **103**, 217-234 e214, doi:10.1016/j.neuron.2019.05.002 (2019).
- 57 Hendriks, I. A. *et al.* Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 927-936, doi:10.1038/nsmb.2890 (2014).
- 58 Pfammatter, S., Bonneil, E., McManus, F. P. & Thibault, P. Gas-Phase Enrichment of Multiply Charged Peptide Ions by Differential Ion Mobility Extend the Comprehensiveness of SUMO Proteome Analyses. *J Am Soc Mass Spectrom* **29**, 1111-1124, doi:10.1007/s13361-018-1917-y (2018).
- 59 Im, E. & Chung, K. C. Precise assembly and regulation of 26S proteasome and correlation between proteasome dysfunction and neurodegenerative diseases. *BMB Rep* **49**, 459-473, doi:10.5483/bmbrep.2016.49.9.094 (2016).
- 60 Yudin, D. *et al.* Localized regulation of axonal RanGTPase controls retrograde injury signaling in peripheral nerve. *Neuron* **59**, 241-252, doi:10.1016/j.neuron.2008.05.029 (2008).
- 61 Mencarelli, C. *et al.* RanBP1 Couples Nuclear Export and Golgi Regulation through LKB1 to Promote Cortical Neuron Polarity. *Cell Rep* **24**, 2529-2539 e2524, doi:10.1016/j.celrep.2018.07.107 (2018).
- 62 Cheng, C. T., Kuo, C. Y. & Ann, D. K. KAPtain in charge of multiple missions: Emerging roles of KAP1. *World J Biol Chem* **5**, 308-320, doi:10.4331/wjbc.v5.i3.308 (2014).
- 63 Yang, Y. *et al.* Acetylated hsp70 and KAP1-mediated Vps34 SUMOylation is required for autophagosome creation in autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 6841-6846, doi:10.1073/pnas.1217692110 (2013).

- 64 Lionnard, L. *et al.* TRIM17 and TRIM28 antagonistically regulate the ubiquitination and anti-apoptotic activity of BCL2A1. *Cell Death Differ* **26**, 902-917, doi:10.1038/s41418-018-0169-5 (2019).
- 65 Jentsch, S. & Psakhye, I. Control of nuclear activities by substrate-selective and protein-group SUMOylation. *Annu Rev Genet* **47**, 167-186, doi:10.1146/annurev-genet-111212-133453 (2013).
- 66 Wu, X., Cai, Q., Feng, Z. & Zhang, M. Liquid-Liquid Phase Separation in Neuronal Development and Synaptic Signaling. *Dev Cell* **55**, 18-29, doi:10.1016/j.devcel.2020.06.012 (2020).
- 67 Bratek-Skicki, A., Pancsa, R., Meszaros, B., Van Lindt, J. & Tompa, P. A guide to regulation of the formation of biomolecular condensates. *FEBS J* **287**, 1924-1935, doi:10.1111/febs.15254 (2020).
- 68 Qu, W., Wang, Z. & Zhang, H. Phase separation of the *C. elegans* Polycomb protein SOP-2 is modulated by RNA and sumoylation. *Protein Cell* **11**, 202-207, doi:10.1007/s13238-019-00680-y (2020).
- 69 Marmor-Kollet, H. *et al.* Spatiotemporal Proteomic Analysis of Stress Granule Disassembly Using APEX Reveals Regulation by SUMOylation and Links to ALS Pathogenesis. *Mol Cell* **80**, 876-891 e876, doi:10.1016/j.molcel.2020.10.032 (2020).
- 70 Hendriks, I. A. *et al.* Site-specific mapping of the human SUMO proteome reveals co-modification with phosphorylation. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 325-336, doi:10.1038/nsmb.3366 (2017).
- 71 Craig, T. J., Anderson, D., Evans, A. J., Girach, F. & Henley, J. M. SUMOylation of Syntaxin1A regulates presynaptic endocytosis. *Sci Rep* **5**, 17669, doi:10.1038/srep17669 (2015).
- 72 Braschi, E., Zunino, R. & McBride, H. M. MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep* **10**, 748-754, doi:10.1038/embor.2009.86 (2009).
- 73 Henley, J. M., Carmichael, R. E. & Wilkinson, K. A. Extranuclear SUMOylation in Neurons. *Trends Neurosci* **41**, 198-210, doi:10.1016/j.tins.2018.02.004 (2018).
- 74 Yu, S. *et al.* Small ubiquitin-like modifier 2 (SUMO2) is critical for memory processes in mice. *FASEB J* **34**, 14750-14767, doi:10.1096/fj.202000850RR (2020).
- 75 Huang, D., Liu, H., Zhu, A., Zhou, Y. & Li, Y. Forebrain excitatory neuron-specific SENP2 knockout mouse displays hyperactivity, impaired learning and memory, and anxiolytic-like behavior. *Mol Brain* **13**, 59, doi:10.1186/s13041-020-00591-8 (2020).
- 76 Bernstock, J. D. *et al.* SUMOylation in brain ischemia: Patterns, targets, and translational implications. *J Cereb Blood Flow Metab* **38**, 5-16, doi:10.1177/0271678X17742260 (2018).
- 77 Anderson, D. B., Zanella, C. A., Henley, J. M. & Cimarosti, H. Sumoylation: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Adv Exp Med Biol* **963**, 261-281, doi:10.1007/978-3-319-50044-7_16 (2017).
- 78 Zhu, F. *et al.* Architecture of the Mouse Brain Synaptome. *Neuron* **99**, 781-799 e710, doi:10.1016/j.neuron.2018.07.007 (2018).
- 79 Nguyen, L., Brun, V., Combes, F., Loux, V. & Vandenbrouck, Y. Designing an In Silico Strategy to Select Tissue-Leakage Biomarkers Using the Galaxy Framework. *Methods Mol Biol* **1959**, 275-289, doi:10.1007/978-1-4939-9164-8_18 (2019).
- 80 Boisvert, F. M., Lam, Y. W., Lamont, D. & Lamond, A. I. A quantitative proteomics analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage. *Mol Cell Proteomics* **9**, 457-470, doi:10.1074/mcp.M900429-MCP200 (2010).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the 'Fondation pour la Recherche Médicale' for the PhD fellowships #FDT202012010480 to MP and #ECO201906008982 to FK. We also thank the 'Fondation pour la Recherche sur le Cerveau' (FRC AO2009) to SM for financial support. This work was also supported by grants from the French government via the 'Investments for the Future' LabEx 'SIGNALIFE' (ANR-11-LABX-0028-01) and the IDEX UCAJedi ANR-15-IDEX-01 as well as the CG06 (AAP santé) and 'Région Provence-Alpes-Côte d'Azur' for the Proteomic platform funding.

Author contributions

MP performed the biochemical experiments with the help of GP and LS. FK, RF and CG performed the bioinformatics. ASG and DB performed the Mass Spectrometry. MP, SM and CG contributed to hypothesis development and data interpretation. SM provided the overall supervision, the funding and human resources. CG wrote the original draft. All authors discussed the data and commented on the manuscript.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Figure legends

Figure 1. Identification of the synaptic SUMO2/3-ylome. **A.** Workflow to identify the synaptic SUMO2/3-ylome. 14PND rat brains, presenting intense synaptogenesis, neurotransmission and high levels of SUMO2/3-ylation, were subjected to biochemical subcellular fractionation to prepare synaptosomes. Denaturing immunoprecipitations were performed on the synaptosomal fractions using specific anti-SUMO2/3 antibodies and peptidic elution. Isolated proteins were then identified by LC-MS/MS. The SUMO2/3-ylation profile of several selected targets was analyzed by biochemical approaches and the biological significance of the synaptic SUMO2/3-ylome was brought out by bioinformatics analysis. **B.** Immunoblotting of SUMO2/3ylation levels in PND14 and adult brain for SUMO2/3 (left panel). Ponceau-S staining was used stain total proteins normalization (right panel). **C.** SUMO2/3-ylation levels detected by immunoblotting on 20 µg of proteins from indicated subcellular fractions. After low-speed centrifugation of the total brain lysate (Tot), the supernatant corresponding to the cytoplasmic fraction (Cyt) was loaded on sucrose percoll gradients to isolate the synaptosomal fraction (Syn)¹⁵ and the nuclear fraction (Nuc) in the pellet was purified on sucrose cushions⁸⁰. **D.** Ten percent of the SUMO2 12F3 or control IgG immunoprecipitated proteins were subjected to silver staining (left panel) or SUMO2 immunoblotting (right panel). **E.** The different immunoprecipitation experiments were hierarchically clustered by aggregation according to their protein composition using the Euclidian average distances. Uncropped images are available in Supplementary Figure 3.

Figure 2. Venn diagrams showing overlap between the synaptic SUMO2/3-ylome and the indicated proteomes. Numbers indicate the number of proteins specifically present in the present study (blue), in the referenced previous studies (grey) and at the intersection of the protein sets. Details in the Supplementary Table 4.

Figure 3. SUMO2/3-ylation profile of Ubc9, Flotillin-1 and SynGAP at synapses. **(A)** Immunoblot anti-Ubc9 of cytoplasmic and synaptic extracts from PND 14 rat brain (left panel). Representative immunoblot using anti-Ubc9 of synaptic SUMO2/3 or control IgG immunoprecipitated proteins (middle panel; n=3 independent experiments) and immunoblot using anti-SUMO2/3 antibody of synaptic Ubc9 or control IgG immunoprecipitated (right panel; n=3 independent experiments). Similarly to **(A)**, immunoblot of cytoplasmic and synaptic extracts from PND 14 rat brain (left panel), synaptic SUMO2/3 or control IgG immunoprecipitated proteins (middle panel; n=3 independent experiments) and the converse immunoprecipitation (right panel; n=3 independent experiments) were done for Flotillin-1

(B) and SynGAP (C). Black arrows indicate SUMO2/3-ylated forms of the different SUMO targets. Uncropped images are available in Supplementary Figure 4.

Figure 4. Terms enrichment analysis of the synaptic SUMO2/3-ylome according to the Gene Ontology, KEGG, Reactome and SynGO knowledge bases. A-D. The list of the SUMO2/3-modified synaptic proteins was subjected to enrichment analysis for GO Cellular Components (A), GO Molecular functions (B), GO Biological Pathways terms (C), for KEGG and Reactome pathways (D) against the rat proteome. Categories were classified according to the $-\log_{10}$ of the *P* value adjusted using the Benjamini-Hochberg method. The number of counts compared to category hits is indicated. The list of the SUMO2/3-modified synaptic proteins was subjected to enrichment analysis for Cellular Components (E) or Biological Pathways (F) using the SynGO synaptic component curator tool. Details are available in Supplementary table 6.

Figure 5. Network organization of the synaptic SUMO2:3-ylome. (A) STRING network analysis of all identified SUMO2/3-ylated protein candidates, with a STRING interaction confidence of 0.7 or greater on all active interaction sources. (B). STRING network was imported into the Cytoscape application implemented by the StringApp plug-in and further filtered for experiments edges with a confidence of 0.4 or greater. The resulting sub-complex (346 components) was subjected to MCL clustering at granularity 4, which resulted in 96 sub-complexes including 8 clusters with an average degree superior or equal to 3 illustrated here. Node size reflects the average node degree within the network.

Figure 6. Diseases annotation enrichment analysis of the synaptic SUMO2/3-ylome. A-B. Proteins from the SUMO2/3 dataset were analyzed for correlation with diseases using ToppGene with the full gene set as background. Categories were classified according to the $-\log_{10}$ of the *P* value adjusted using the Benjamini-Hochberg method. The number of counts compared to category hits is indicated. Details are available in Supplementary table 6.

Supplementary information

Supplementary Figure 1: Quality control of the synaptic proteome. **A.** Western blot analysis of brain subcellular fractions. Tot = total brain lysate, Cyt = cytoplasmic fraction, Nuc = nuclear fraction, Syn = synaptosomal fraction. The list of the identified synaptic proteins was subjected to enrichment analysis for the GO Cellular Components terms (**B**) or the GO Biological Pathways terms (**C**) against the rat proteome. Categories were classified according to the $-\text{Log}_{10}$ of the p -value adjusted using the Benjamini-Hochberg method. The number of counts compared to category hits is indicated. Enrichment details are available in Supplementary Table 6.

Supplementary Figure 2: Characterization of the 12F3 mouse monoclonal anti-SUMO2/3 antibody. **A.** Western blotting on bacterial extract from BL21 bacteria containing (+) or not (-) a SUMOylation system specifically expressing and conjugating SUMO1 or SUMO2. **B.** Dot blot performed on immobilized recombinant SUMO2 protein detected by anti-SUMO2/3 12F3 antibody (dilution 1/2000) pre-incubated (right panel) or not (left panel) with the CQIRFRFDGQPINE peptide at final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. **C-D.** Western blotting on SDS eluate from denaturing immunoprecipitation on whole PND 14 rat brain extracts (input lane) using immobilized mouse IgG antibody (IgG lane) or 12F3 monoclonal mouse anti-SUMO2/3 antibody (S2/3 lane). Immunopurified proteins (IP) were detected using the 12F3 mouse monoclonal anti-SUMO2/3 antibody (**C left panel**), polyclonal rabbit SUMO2/3 (**C right panel**) or the 21C7 mouse monoclonal anti-SUMO1 antibody (**D**).

Supplementary Figure 3: Original uncropped blots. Orange boxed regions represent the portion used in the main and supplementary figures.

Supplementary Table 1: PND 14 rat brain synaptic proteome.

10 µg of proteins from four independent synaptosomal preparations were separated on gradient SDS-PAGE, subjected to in gel Trypsin digestion and analyzed by LC-MS/MS analysis. Protein identification from raw data was performed using Proteome Discover 2.0. Only Master Proteins with 1% FDR for both peptides and proteins and detected in at least 3 of the 4 preparations were selected to establish the reference PND 14 synaptic proteome.

Supplementary table 2: Synaptic proteome identified in the present study vs selected published synaptic proteomes and databases.

Supplementary table 3: Synaptic SUMO2/3-ylome

Proteins eluted from four independent denaturing immunoprecipitations using anti-SUMO2/3 antibodies or mouse IgG as negative control were separated on gradient SDS-PAGE, subjected to in gel Trypsin digestion and analyzed by LC-MS/MS analysis. Protein identification from raw data was performed using Proteome Discover 2.0. Only Master Proteins with 1% FDR for both peptides and proteins were considered for further analysis. For each immunoprecipitation, proteins identified in mouse IgG eluate were withdrawn in the concomitant anti-SUMO2/3 eluate. The proteins present in at least 3 of the 4 filtrated lists were selected as synaptic candidates for SUMO2/3 modification.

Supplementary table 4: Synaptic SUMO2/3-ylome vs selected published synaptic proteomes and databases.

Supplementary table 5: Synaptic SUMO2/3-ylome vs selected published SUMOylomes.

Supplementary table 6: Details for enrichment analysis.

Remarque : *Les 'Supplementary tables' ne sont pas incorporées dans mon manuscrit de thèse car leurs volumes et dimensions sont trop importantes.*

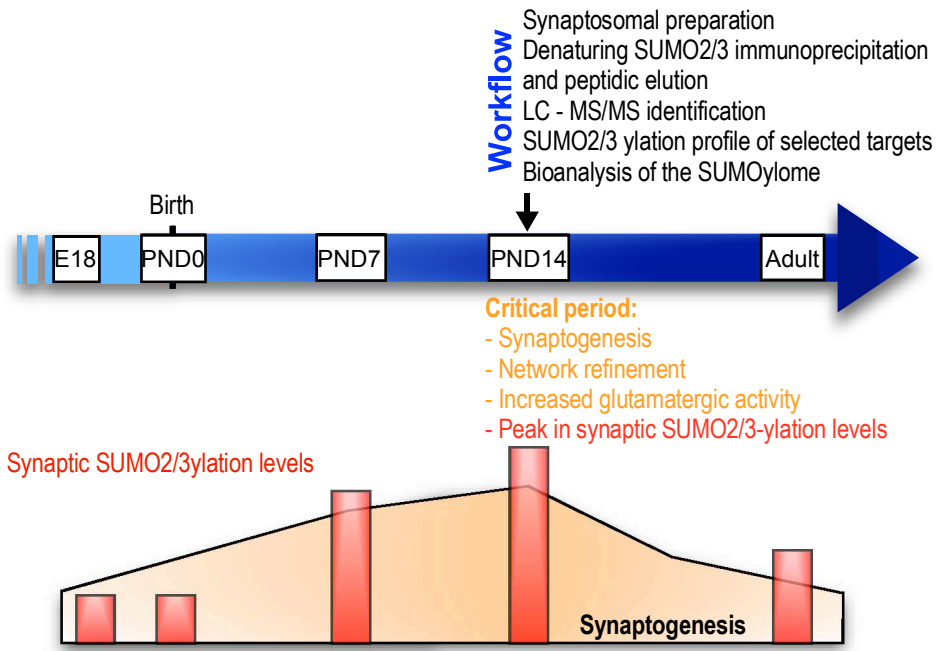
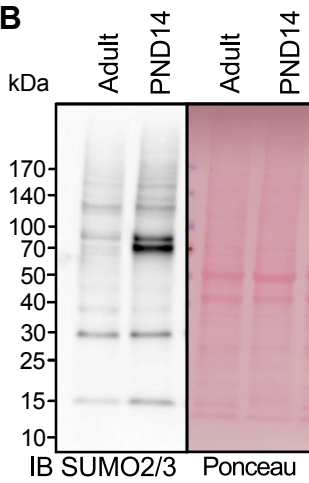
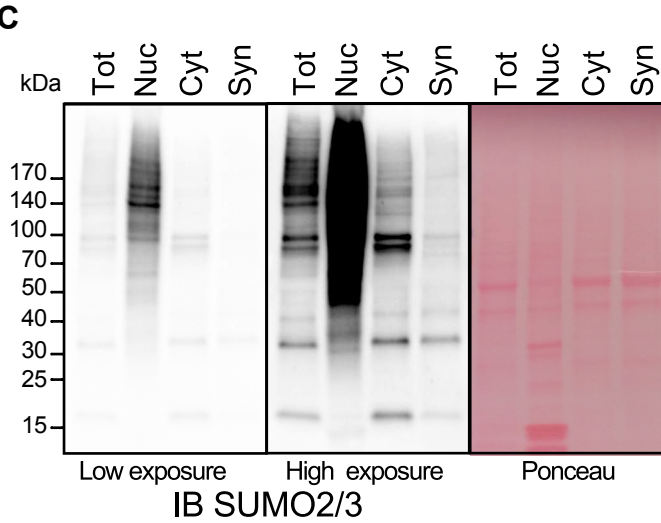
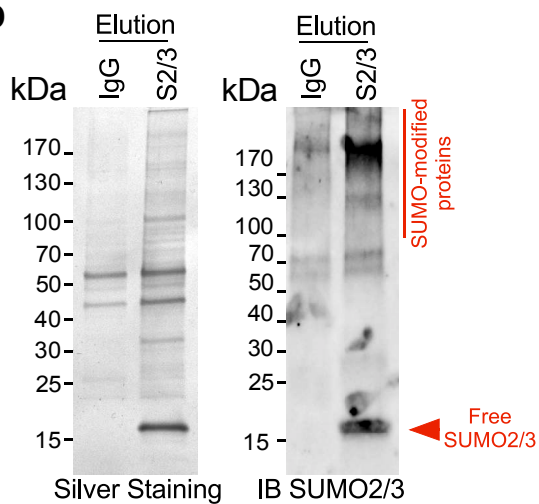
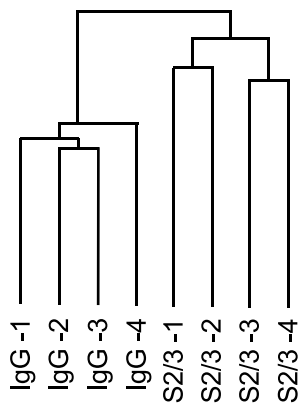
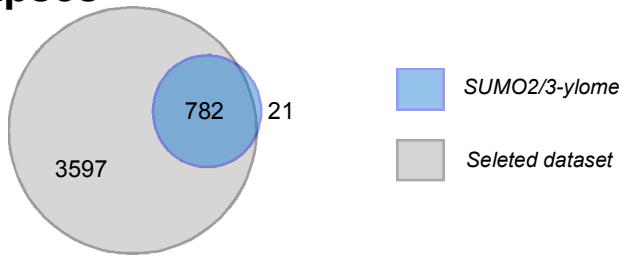
A**B****C****D****E**

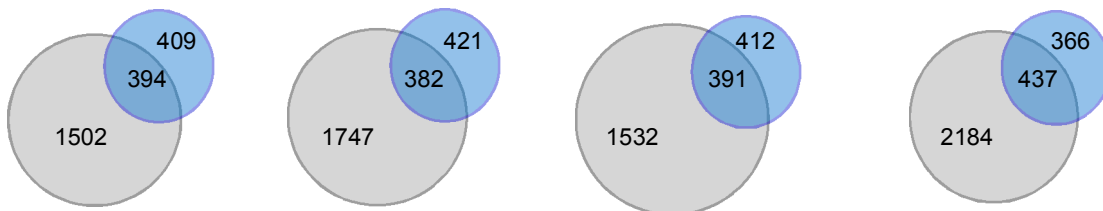
Figure 1

Synapses



Pronot et al., this study

Post-synaptic density



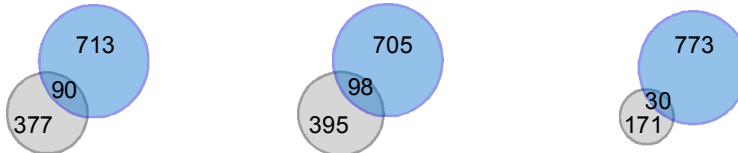
Wilson et al., 2019

Bayes et al., 2017

Pandya et al., 2017

Zhou et al., 2015

Pre-synaptic zone

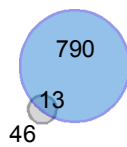


Weingarten et al., 2014

Boyken et al., 2013

Abul-Husn et al., 2009

Synaptic cleft



Cijsouwe et al., 2018

Synaptic mitochondrion



Stauch et al., 2019

Graham et al., 2017

Figure 2

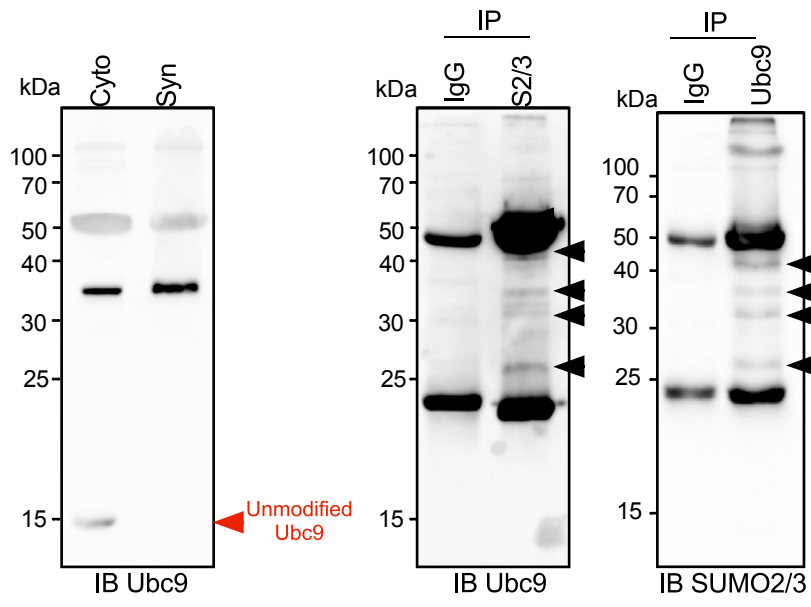
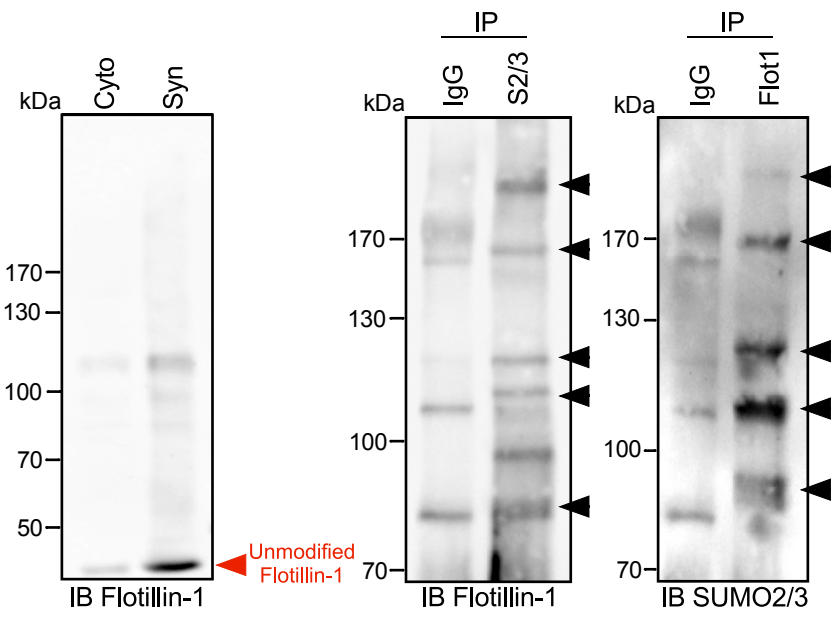
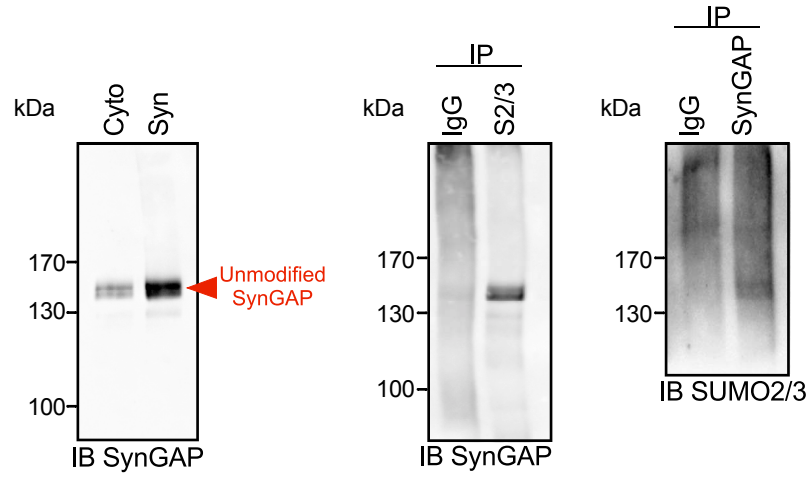
A**B****C**

Figure 3.

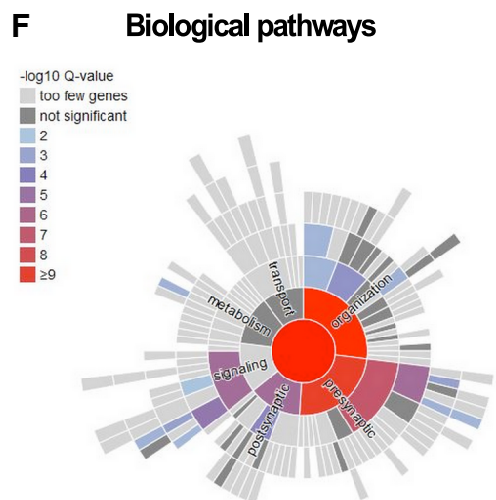
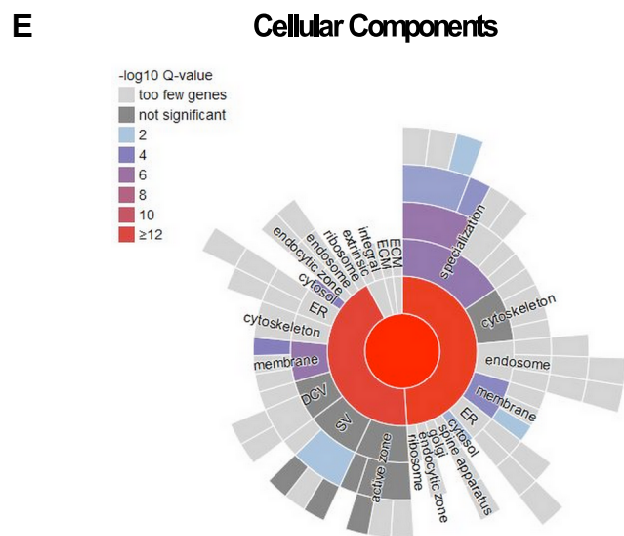
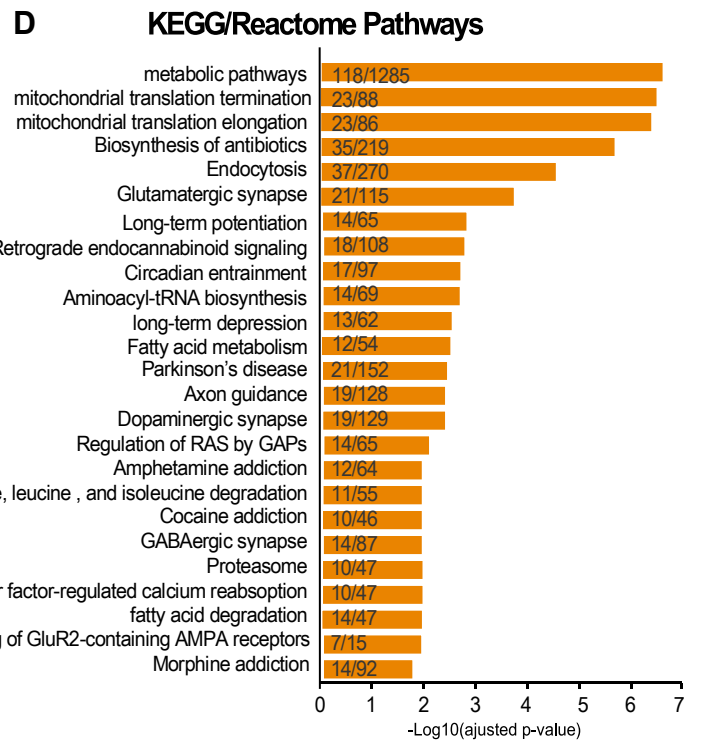
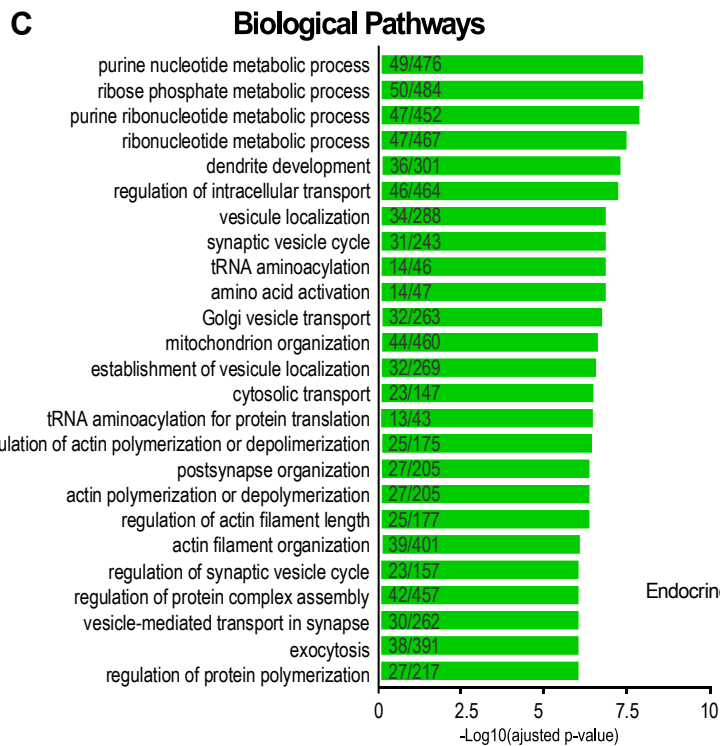
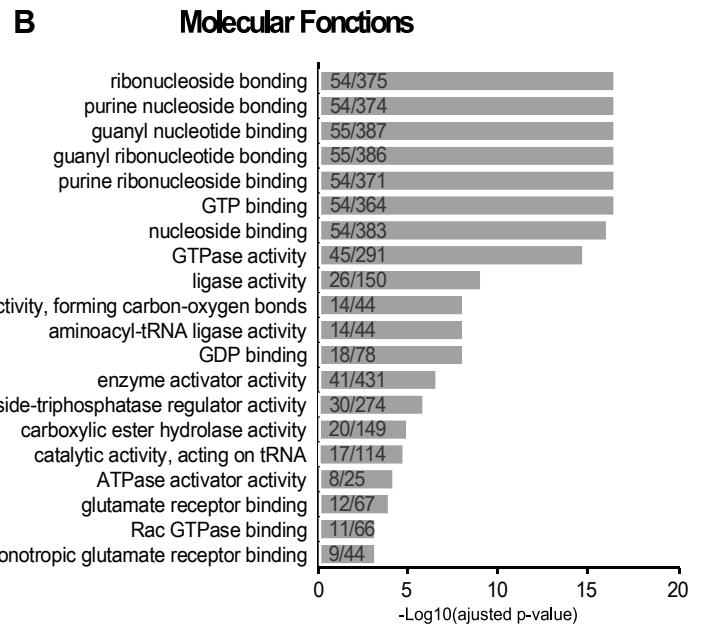
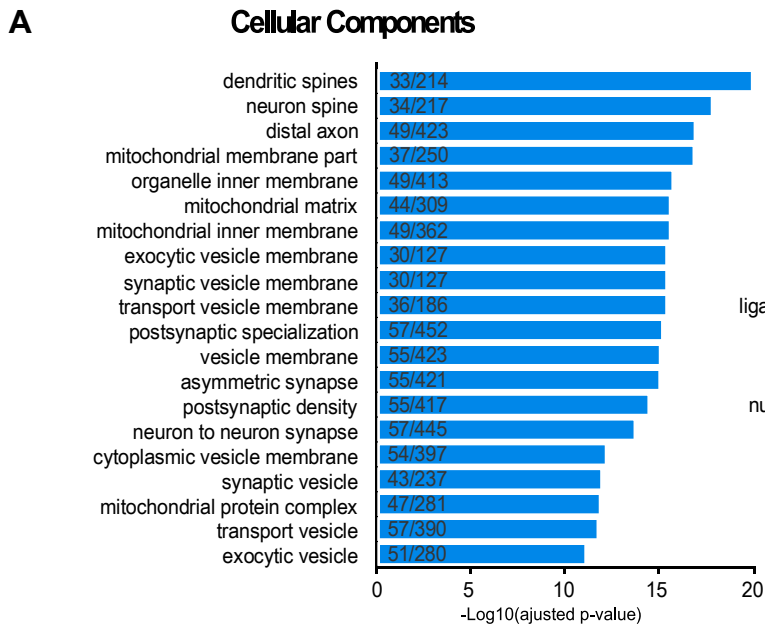
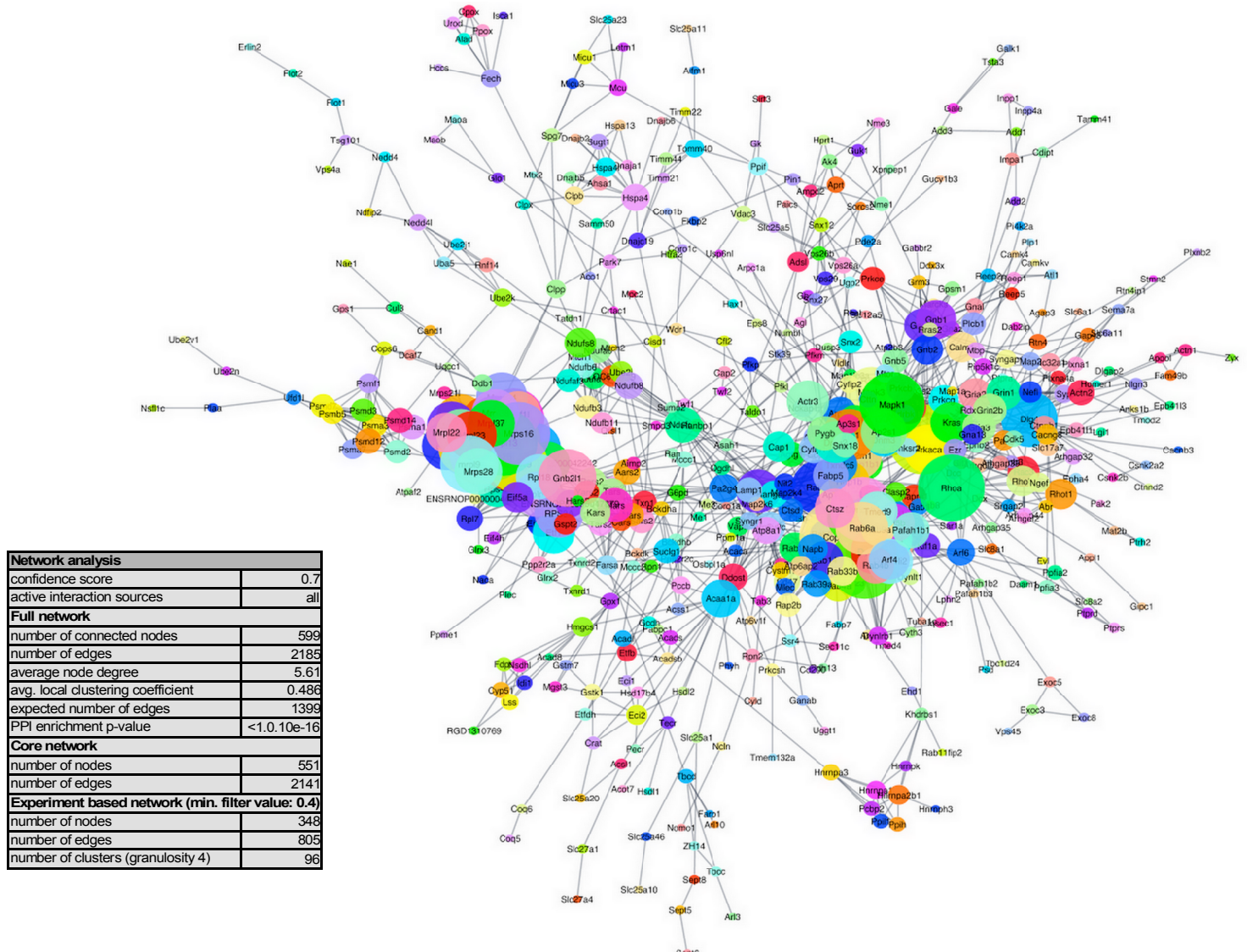


Figure 4.

A



B

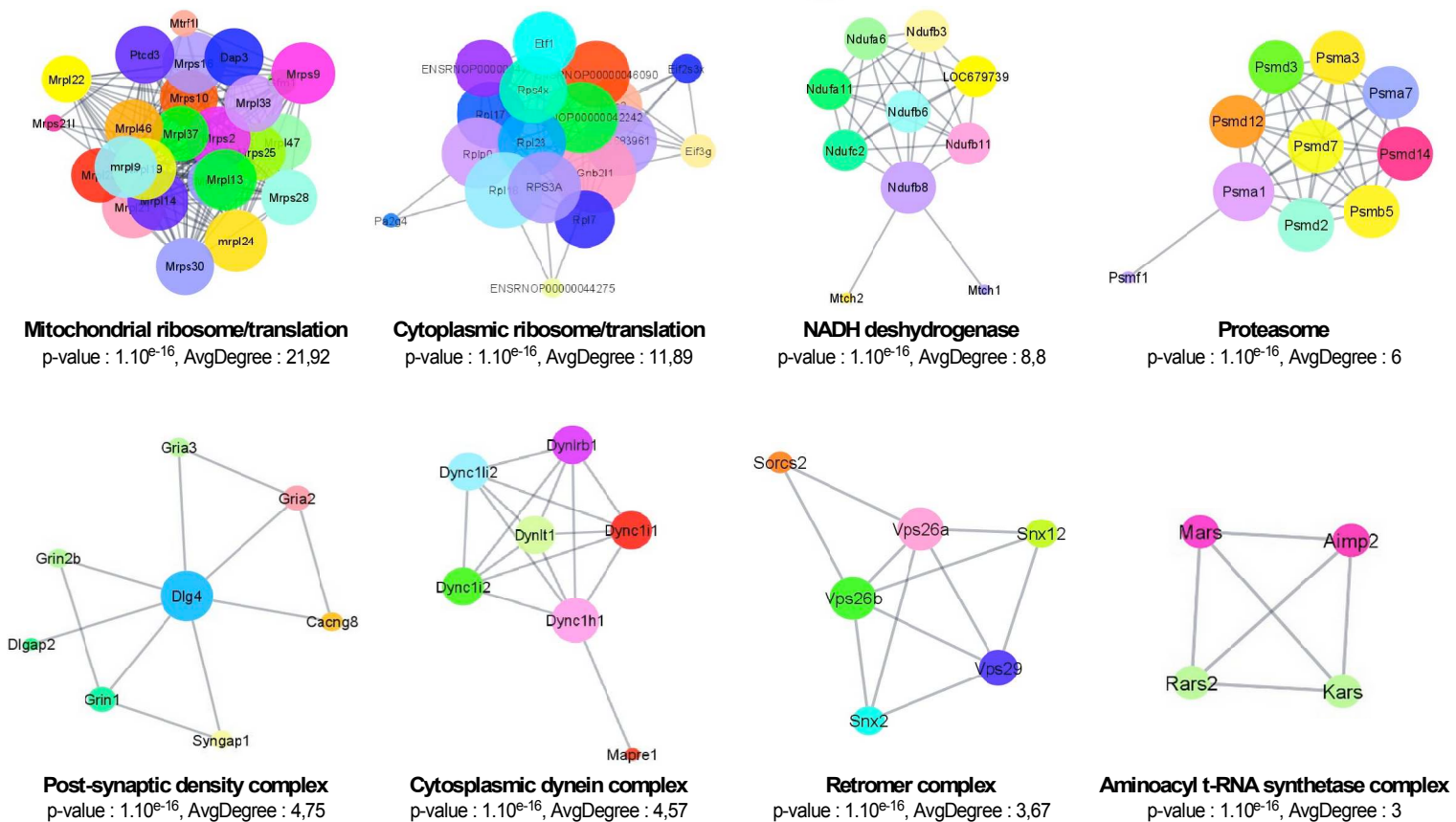


Figure 5.

Human diseases

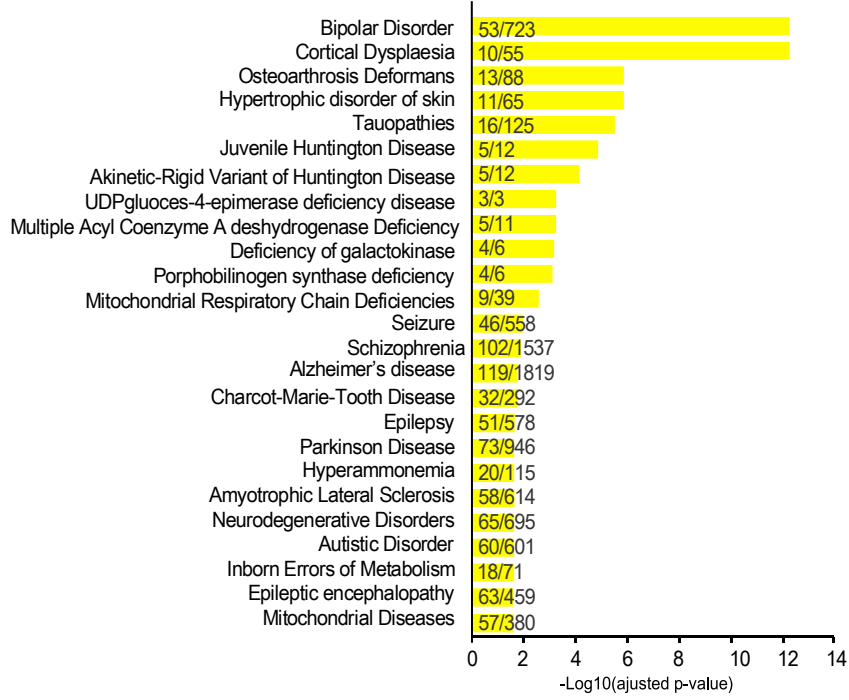
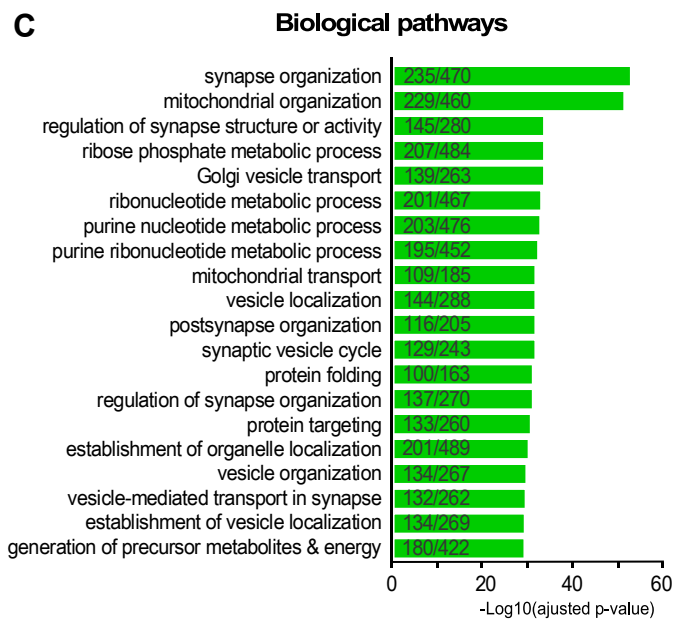
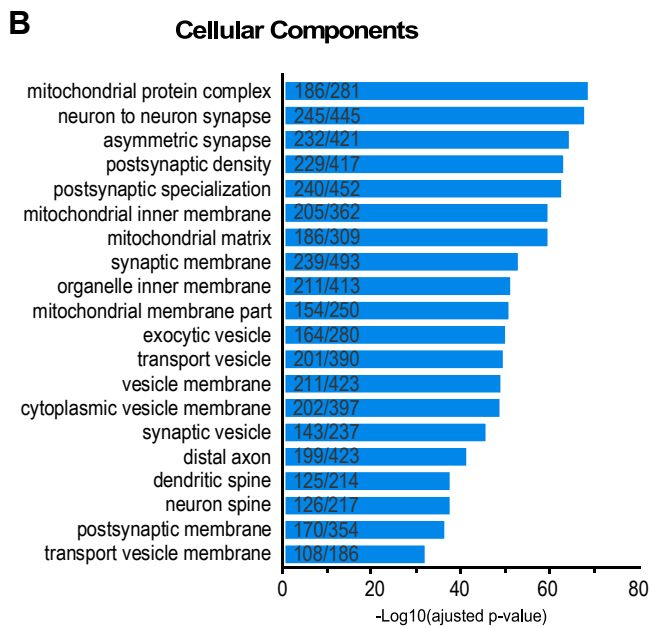
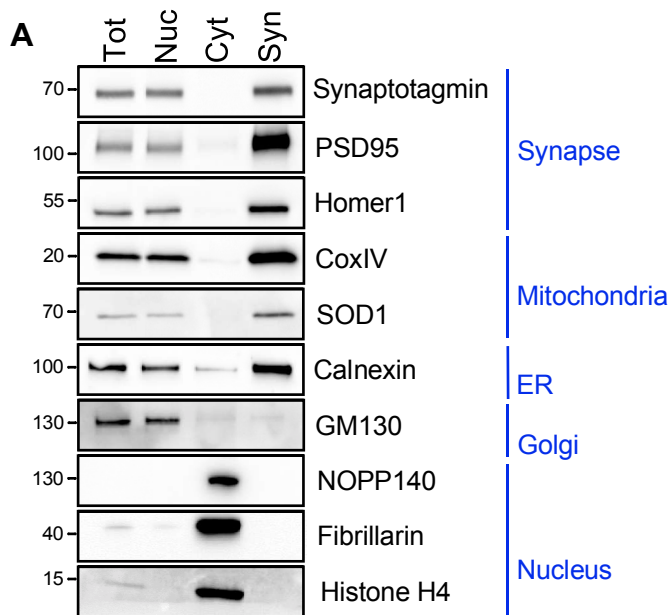
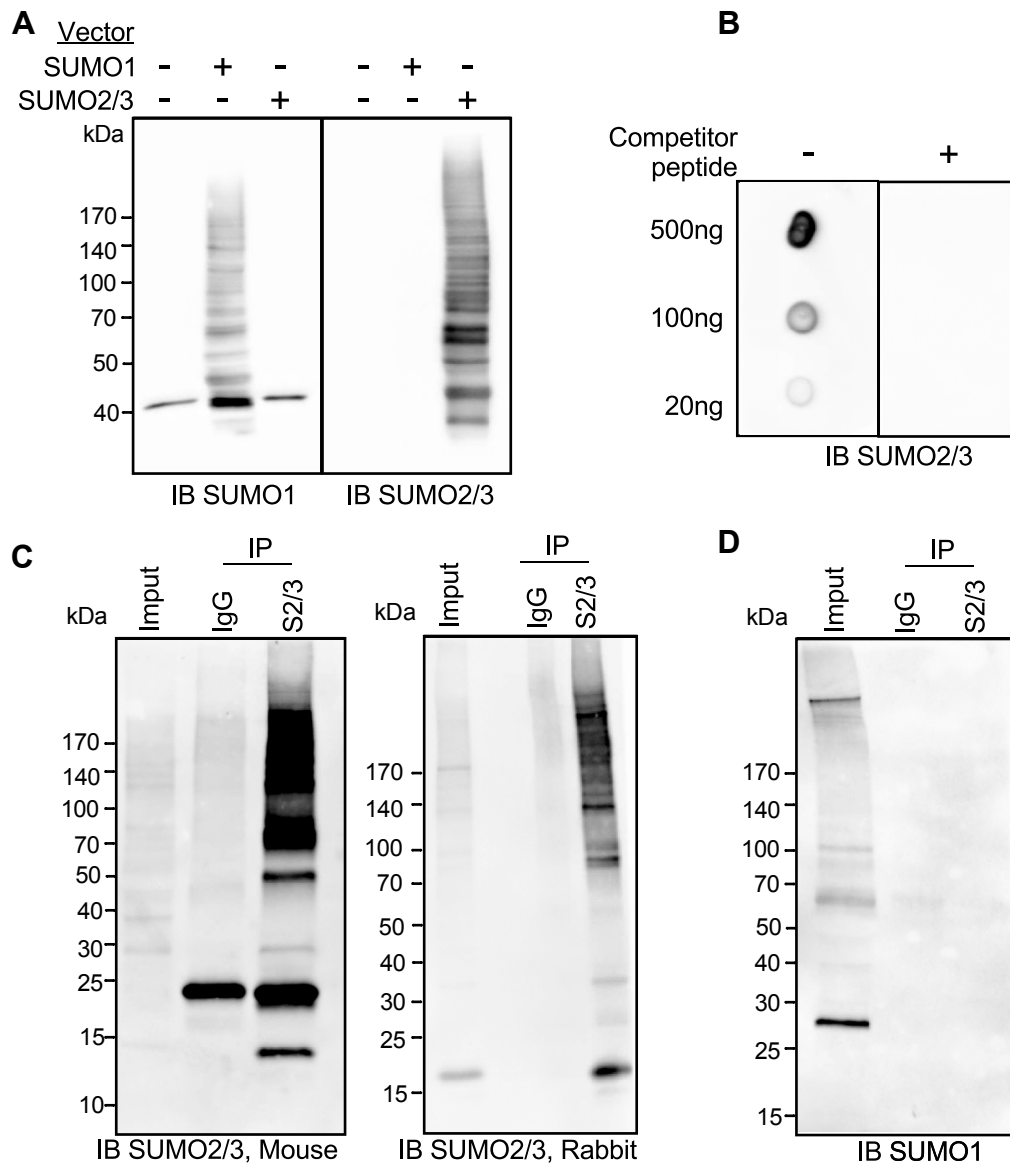


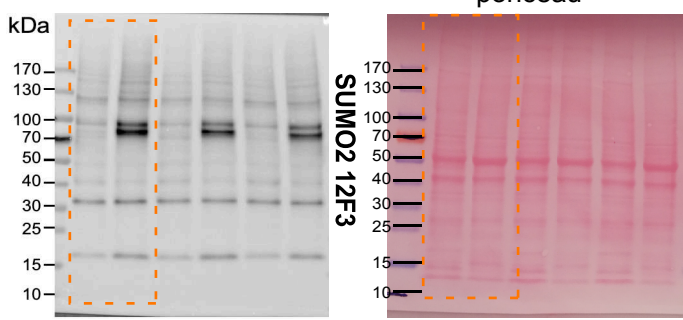
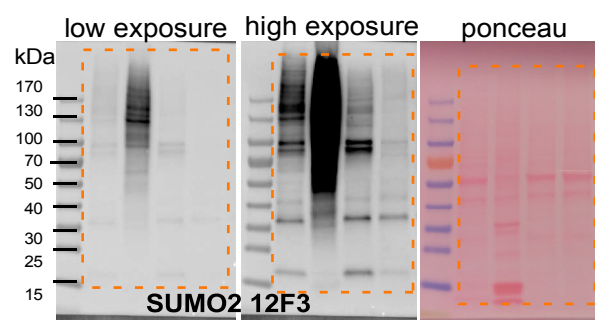
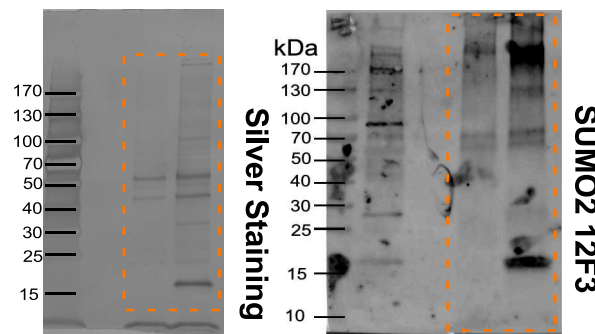
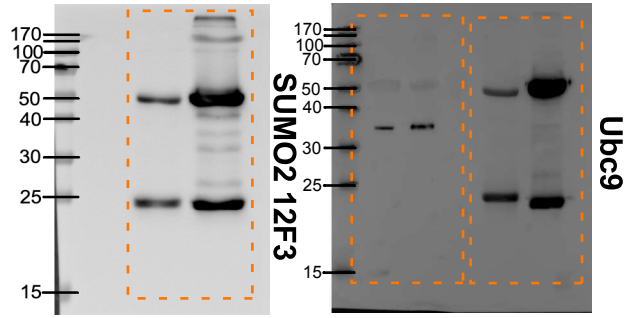
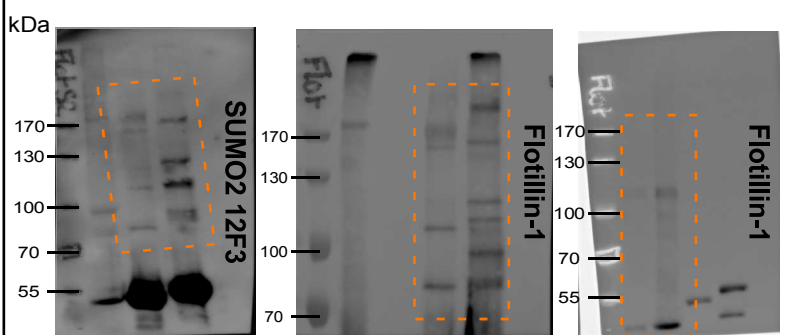
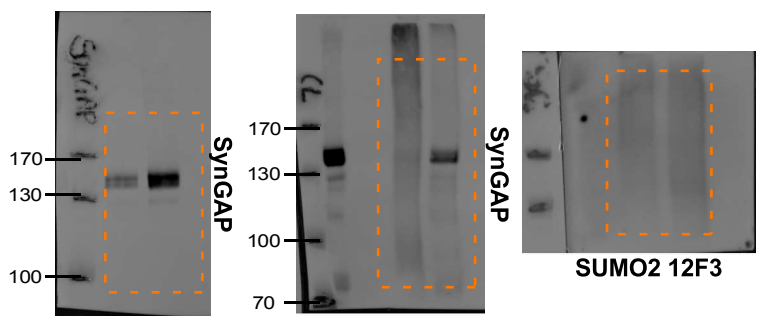
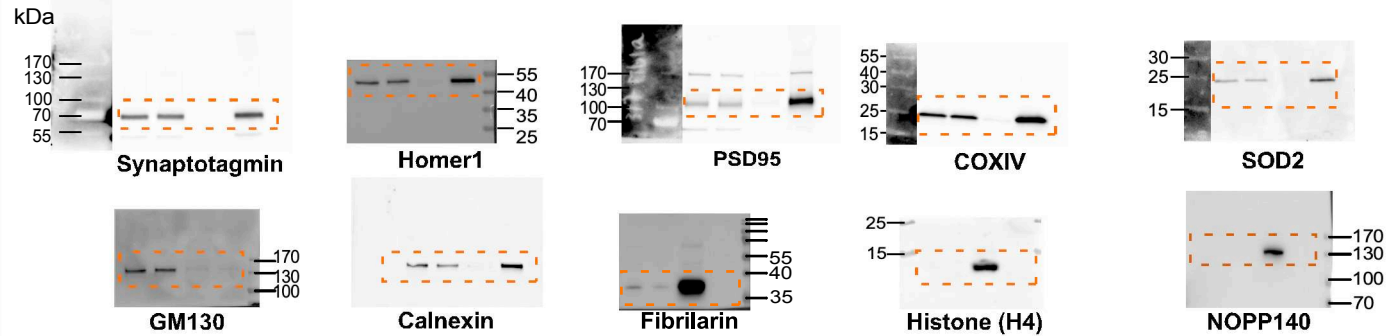
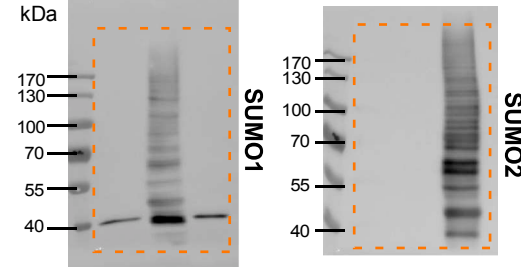
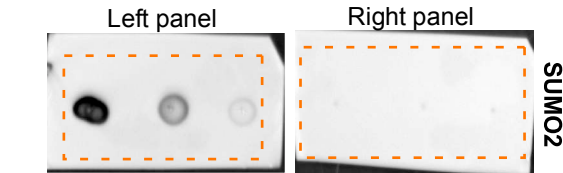
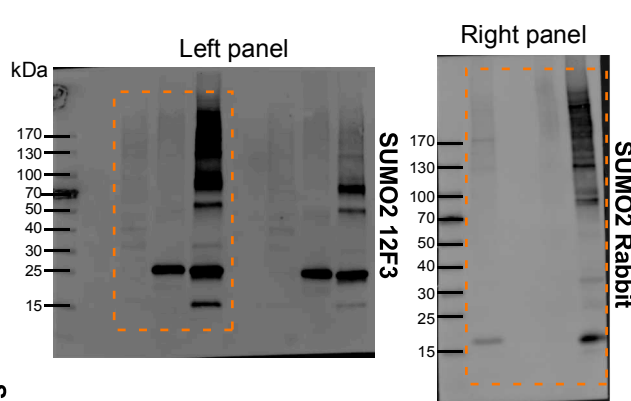
Figure 6.



Supplementary Fig 1



Supplementary Figure 2

Figure 1 B**Figure 1 C****Figure 1 D****Figure 3 A****Figure 3 B****Figure 3 C****Supplementary Figure 1 A****Supplementary Figure 2 A****Supplementary Figure 2 B****Supplementary Figure 2 C****Supplementary Figure 2 D**