

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE
Ecole doctorale BIOLOGIE SANTE

Année 2013

N° 18

Rôle de la molécule adaptatrice CD3zeta et de la voie de co-stimulation CTLA4/CD80-CD86 dans le développement et la plasticité neuronale.

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, médecine et santé

Spécialité : Neurosciences

Présentée

et soutenue publiquement par

Antoine LOUVEAU

Le 16 Octobre 2013, devant le jury ci-dessous

Président : Patricia PARNET, Directeur de Recherche, Nantes
Rapporteurs : Laurent GROG, Directeur de Recherche, Bordeaux
Stéphane HUNOT, Directeur de Recherche, Paris
Directeur de thèse : Hélène BOUDIN, Chargée de Recherche, Nantes

Je remercie chaleureusement Laurent GROC et Stéphane HUNOT d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, mais également Patricia PARNET d'avoir examiné et évalué ce travail.

Je tiens à remercier Ignacio ANEGON, directeur de l'unité INSERM U1064, pour son accueil au sein de l'unité.

Je remercie aussi Philippe NAVEILHAN de m'avoir accueilli au sein de l'équipe NEURO, mais aussi Sophie BROUARD et David LAPLAUD pour m'avoir permis de finir ma thèse au sein de leur équipe.

Un grand merci à Hélène, pour m'avoir soutenu et encadré pendant ces presque 5 années passées ici, pour m'avoir inculqué le goût de la science bien faite et m'avoir accordé votre confiance. Merci de m'avoir permis, au cours de ma thèse, de faire ces séjours à l'étranger qui auront été extrêmement enrichissant.

Je tiens spécialement à remercier Stéphane, sans ce premier stage avec toi où tu m'as fait découvrir CD3 ζ , je n'aurais très certainement pas fait cette thèse. Un merci particulier à Julie, pour tout ce que tu m'as appris, techniquement et scientifiquement, pour ta bonne humeur, tes conseils et tes encouragements.

Un grand *merci* à toute l'ex-équipe NEURO, à Véro pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta disponibilité, Xavier pour m'avoir montré ce qu'est « être un NEURO », à Faustine, Laurent pour vos précieux conseils. Merci à Reynald pour ton aide précieuse en biologie moléculaire malgré mes questions souvent stupides et ta maîtrise complète des problèmes de génotypage.

Un *merci* particulier à Elo M, ma binôme de NEURO, on aura tenu bon dans notre équipe de 2.

Merci à tous les gens du bureau, anciens et nouveaux, Sév B, Elo P, Elo M, Jérôme, Anne, Virginie, Claire, Sabrina, Anne-Laure, pour tous ces petit-déj, ces commérages et cette bonne ambiance quotidienne. Mention spéciale à Sev B pour toutes nos discussions et tous tes conseils scientifiques pendant la thèse et encore plus pendant la rédaction de ce manuscrit.

Un grand *merci* à l'équipe 10, pour tous ces verres, soirées, sorties et autre weekend end plus ou moins foireux qui resteront des souvenirs (cachés) mais extra. *Merci* à Alex, ma femme de travail pour

tout, les cinés et autres karaokés, ton oreille attentive pour me laisser me plaindre et ta présence inébranlable. Un grand *merci* à Anne, pour toutes ces conversations au détour d'une porte ou d'un PSM, ton soutien et ton amitié. *Merci* à tous mes amis du labo, Marion, Sev B, Elo M, Elo P, Justine, Angélique, Annie, Laura, Laëtitia, Mélanie N, Athé, Gaëlle, sans vous cette thèse n'aurait pas été la même. Je n'ai pas toujours été très cool mais vous êtes restées là.

Un immense *merci* à tous les gens du labo sans qui rien ne serait possible, Laurent T, Flora C, Caro, Fabie, Claire V, Laure-Helene, Gaëlle T, Fred, Laurence, Gaëlle B, Sylvie, Paulette, Joëlle(s) et tous les autres, votre bonne humeur quotidienne aura été un plaisir.

Un grand *merci* à Claire et Manu pour tous ces bons moments à l'animalerie. Manu, toutes les bêtises que tu peux raconter vont me manquer. C'était toujours un plaisir de descendre au -1.

Merci à mes amis chiliens, Pablo, Cecilia, Pablo chico, Henny, Louis, Gonzalo, Beatriz, Eduardo, Betsi et tous les autres, je me souviendrais (ou plutôt ne me souviendrais pas ☺) longtemps de cette expérience sud-américaine.

Merci au petit Casino pour m'avoir fourni en délices chocolatés qui m'ont accompagnés durant l'écriture (et merci à Juju de t'être dévouée pour que je ne mange pas tout).

Merci à tous les rats et souris, utilisés dans cette étude qui m'ont occupé pendant de longues journées et soirées.

Merci à Delphine, Elodie, JB, Jocelyn et Virginie pour nos restos menstruels qui se sont fait plus rares mais qui vont me manquer.

Merci à Catin, ma coloc de toujours, à quand le prochain road-trip dans les montagnes enneigées ?

Merci à ma famille, à mes parents et ma sœur, pour avoir toujours été présent pour moi, m'avoir soutenu dans cette démarche, croire en moi et me laisser suivre mon chemin.

Ste 666

Table des matières

TABLE DES MATIERES	4
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
TABLE DES TABLEAUX.....	9
ABREVIATIONS UTILISEES	10
AVANT PROPOS.....	13
INTRODUCTION.....	16
I- LE DEVELOPPEMENT NEURONAL.....	16
A- GENERALITES	16
B- EMERGENCE DES PREMIERS NEURITES	19
C- ELONGATION DES NEURITES.....	22
1- STRUCTURES CELLULAIRES IMPLIQUEES DANS L'EMERGENCE ET L'ELONGATION DES NEURITES.	22
a- Les lamellipodes et filopodes	22
b- Le cône de croissance.....	22
2- MECANISMES CELLULAIRES DE L'ELONGATION NEURITIQUE	23
a- Régulation de l'actine.....	25
b- Régulation des microtubules.....	26
c- Coordination entre l'actine et les microtubules.....	27
II- LA PLASTICITE SYNAPTIQUE	30
A- LA SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE	30
1- LES RECEPTEURS METABOTROPIQUES	31
2- LES RECEPTEURS IONOTROPIQUES.....	32
B- LES DIFFERENTES FORMES DE PLASTICITE SYNAPTIQUE	35
1- LA PLASTICITE SYNAPTIQUE	35
a- Potentialisation à long terme	36
<i>a.1- Potentialisation dépendante des récepteurs NMDA.....</i>	<i>36</i>
<i>a.1.1- Potentialisation des récepteurs AMPA.....</i>	<i>37</i>
<i>a.1.2- Potentialisation des récepteurs NMDA.....</i>	<i>38</i>
<i>a.2- Potentialisation indépendante des récepteurs NMDA.....</i>	<i>38</i>
b- Dépression à long terme	39
<i>b.1- Dépression dépendante des récepteurs NMDA</i>	<i>39</i>
<i>b.2- Dépression dépendante des récepteurs mGluR</i>	<i>40</i>

2- LA PLASTICITE COMME MECANISME CELLULAIRE DE LA MEMOIRE.....	40
C- MECANISMES MOLECULAIRES DE LA POTENTIALISATION DEPENDANTE DES RECEPTEURS NMDA.	42
1- ACTIVATION DES RECEPTEURS NMDA.....	42
2- ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION.....	45
a- Recrutement et phosphorylation de la CaMKII.....	45
b- Phosphorylation de PKA et PKC.....	47
3- PHOSPHORYLATION ET RECRUTEMENT DES RECEPTEURS AMPA.....	48
4- MAINTIEN DE LA POTENTIALISATION.....	52
<u>III- IMPLICATION DE L'IMMUNITE ET DE SES MOLECULES DANS LE DEVELOPPEMENT NEURONAL,</u>	
<u>L'HOMEOSTASIE SYNAPTIQUE ET LES FONCTIONS COGNITIVES.....</u>	57
A- ROLES DES CELLULES IMMUNITAIRES	57
1- LES MICROGLIES.....	58
a- Microglies et développement neuronal.....	58
b- Microglies et plasticité.....	61
2- LES LYMPHOCYTES T.....	65
3- LES MACROPHAGES	69
B- ROLE DE L'EXPRESSION NEURONALE DE MOLECULES DE L'IMMUNITE	69
1- MOLECULES DE L'IMMUNITE INNEE	70
a- La famille des récepteurs toll-like (TLR)	70
b- Molécules de la cascade du complément	73
2- MOLECULES DE L'IMMUNITE ADAPTATIVE	74
C- CD3ζ	79
1- STRUCTURE DU CD3 ζ	79
2- RECEPTEURS COUPLES A CD3 ζ ET FONCTIONS ASSOCIEES.....	81
a- Le TCR (T Cell Receptor)	81
b- Les récepteurs des cellules NK	83
c- Le récepteur CXCR4.....	85
3- SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DECLENCHEE PAR L'ACTIVATION DE CD3 ζ	86
4- ROLE DU CD3 ζ DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	87
D- LA VOIE DE CO-STIMULATION CD28/CD80-CD86/CTLA4.....	90
1- LA VOIE D'ACTIVATION CD28/CD80-CD86	91
a- Signalisation dans le lymphocyte T	91
b- Signalisation induite dans la CPA.....	93
2- LA VOIE D'INHIBITION CTLA4/CD80-CD86	94
a- Signalisation induite dans le lymphocyte T	94

b- Signalisation induite dans la CPA.....	95
3- LA VOIE DE CO-STIMULATION CD28/CD80-CD86/CTLA4 DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	97
<u>OBJECTIFS DE LA THESE</u>	99
<u>RESULTATS.....</u>	102
<u>PROJET 1 : ETUDE DE LA MOLECULE ADAPTATRICE CD3ζ DANS LE SNC.....</u>	102
ARTICLE I: THE IMMUNE MOLECULE CD3 ζ AND ITS DOWNSTREAM EFFECTORS ZAP-70/SYK MEDIATE EPHRIN SIGNALING IN NEURONS TO REGULATE EARLY NEURITOGENESIS.	103
ARTICLE II: IMPAIRED SPATIAL MEMORY IN MICE LACKING CD3 ζ IS ASSOCIATED WITH ALTERED NMDA AND AMPA RECEPTORS SIGNALING BUT INDEPENDENT OF T CELL DEFICIENCY.	120
<u>PROJET 2 : LA VOIE DE CO-STIMULATION CTLA4/CD80-CD86 DANS LE SNC.....</u>	171
RESULTATS : ACTION NEUROTROPHIQUE DE CTLA4-IG PAR ACTIVATION DU RECEPTEUR CD86 MICROGLIAL	172
<u>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	202
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	216
<u>ANNEXE</u>	257
ARTICLE III: ECTOPIC EXPRESSION OF THE IMMUNE ADAPTOR PROTEIN CD3ZETA IN NEURAL STEM/PROGENITOR CELLS DISRUPTS CELL-FATE SPECIFICATION.....	257
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES:	269
COMMUNICATIONS ORALES:	269
POSTERS:	269

Table des Illustrations

Figure 1: Etablissement de la polarisation des neurones hippocampiques <i>in vitro</i>	17
Figure 2 : Polarisation neuronale <i>in vivo</i>	18
Figure 3 : Emergence des premiers neurites <i>in vitro</i>	19
Figure 4 : Modèle de l'émergence du premier neurite	21
Figure 5 : Immunomarquage de l'actine-F dans un cône de croissance neuritique.....	22
Figure 6 : Structure du cône de croissance.....	23
Figure 7 : Propriétés fondamentales des filaments d'actine et des microtubules.....	24
Figure 8 : Etapes de l'élongation du cône de croissance.....	25
Figure 9 : Régulation des protéines Rho GTPases	28
Figure 10 : Morphologie et composition de la synapse glutamatergique des neurones hippocampiques	31
Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs mGluR	32
Figure 12 : Représentation des récepteurs ionotropiques.....	34
Figure 13 : Représentation de l'activation des récepteurs NMDA durant la LTP.....	43
Figure 14 : Représentation des interactions spécifiques des sous-unités GluN2A et GluN2B et leurs implications dans la plasticité.....	44
Figure 15 : Représentation de la CaMKII et de son activation	46
Figure 16 : Représentation de l'activation des kinases lors de la LTP.....	47
Figure 17 : Représentation des molécules interagissant avec les sous-unités des récepteurs AMPA importantes pour la LTP.....	50
Figure 18 : Représentation de la phosphorylation et du recrutement synaptique des récepteurs AMPA durant la LTP.....	52
Figure 19 : Représentation de la mise en place de la phase tardive de la LTP.....	55
Figure 20 : Implication du BDNF dans la mise en place de la phase tardive de la LTP.....	56
Figure 21 : Représentation du rôle de la microglie dans le développement neuronal.....	60
Figure 22 : Mécanismes de modulation de la plasticité, la mémoire et la neurogénèse par la microglie	64
Figure 23 : Mécanismes pro-cognitifs des lymphocytes T.....	67
Figure 24 : Conséquences de l'expression neuronale des TLR sur le développement et la plasticité cérébrale	73

Figure 25 : Hypothèse d'action des molécules du complément dans la synaptogénèse.	74
Figure 26 : Représentation de la voie rétino-géniculée et du défaut développemental lié à l'absence du CMHI	76
Figure 27 : Structure du CD3 ζ	80
Figure 28 : Représentation de CD3 ζ et de son interaction avec le TCR	82
Figure 29 : Les récepteurs des cellules NK et leurs molécules adaptatrices	84
Figure 30 : Les voies de signalisation induites par l'activation de CD3 ζ dans le lymphocyte T	87
Figure 31 : Défaut développemental dans le LGN des souris déficientes pour CD3 ζ	88
Figure 32 : Images illustrant le rôle de CD3 ζ dans l'arborisation dendritique	89
Figure 33 : Principales voies de co-stimulation des lymphocytes T	90
Figure 34 : La voie CD28/CD80-CD86/CTLA4 dans l'activation des lymphocytes T	91
Figure 35 : Signalisation induite par l'activation du CD28	93
Figure 36 : Signalisation induite par l'activation de CTLA4	95
Figure 37 : Action différentielle de CTLA4 et CD28 sur la signalisation de CD80-CD86 dans les CPA	96
Figure 38 : Implication de CD3 ζ et des kinases ZAP-70/Syk dans la voie éphrine A1/EphA4	104
Figure 39 : Schéma du rôle de CD3 ζ dans les réorganisations moléculaires synaptiques durant la LTP	121
Figure 40 : Mécanismes d'inhibition de l'activation des lymphocytes T par CTLA4-Ig	172
Figure 41 : Schéma bilan de l'action du CTLA4-Ig sur la microglie	193
Figure 42 : Similarités de fonction de CD3 ζ entre le SI et le SNC	211
Figure 43 : Analogie de fonction de CD86 entre le SI et le SNC	212
Figure 44 : Hypothèse d'un lien fonctionnel entre le CD86 microglial et le CD3 ζ neuronal	213

Table des tableaux

Tableau 1 : Molécules régulatrices du cytosquelette d'actine dans le cône de croissance neuritique... 26
Tableau 2 : Molécules régulatrices des microtubules du cône de croissance neuritique..... 27
Tableau 3 : Facteurs sécrétés par la microglie modulant la plasticité, la neurogénèse et la mémoire... 62
Tableau 4 : Modèles montrant le lien entre lymphocytes T, cognition et neurogénèse 66

Abréviations utilisées

+TIP : Plus-end tracking protein	CRE : cAMP response element
TAP1 : Transporter antigen peptide 1	CREB : cAMP response element-binding protein
6-OHDA : 6-hydroxydopamine	CRMP2 : Collapsin response mediator protein
ACAMP : Apoptotic cell-associated molecular pattern	CTLA4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
ACF7 : Actin cross linking family 7	CX3CL1 : CX3C ligand 1
ADF : Actin depolymerizing faction	CX3CR1 : CX3C chemokine receptor 1
ADP : Adénosine diphosphate	CXCR4 : CXC chemokine receptor 4
Akt : Protéine kinase B	DAG : Diacylglycerol
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methylisoazol-4-propionate	DAMP : Danger-associated molecular pattern
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	DAP12 : DNAX activation protein of 12 kDa
AP1 :	DG : Gyrus denté
APC : Adenomatous Polyposis Coli	DHPG : Dihydroxyphenylglycine
Arc : Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	EIG : Early-immediate genes
ATP : Adénosine triphosphate	E-LTP : Phase précoce de la LTP
BAT3 : Antigen B-associated 3	ERK : Extracellular signal-regulated kinase
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor	GABA : Acide- γ -aminobutyrique
BM : Labyrinthe de Barnes	GADS : GRB2-related adaptor protein
BMP : Basic myelin protein	GAP : GTPase activating protein
BMT : Greffe de moelle osseuse	GDP : Guanosine diphosphate
Ca ²⁺ /CaM : Ca ²⁺ /calmoduline	GEF : Guanine nucleotide exchange factor
CaMKII : Ca ²⁺ /calmoduline-dependent protein kinase II	GFAP : Glial fibrillary acidic protein
CaMKIV : Ca ²⁺ /calmoduline-dependent protein kinase IV	GluA : Sous-unité des récepteurs AMPA
CBP : CREB binding protein	GluK : Sous-unité des récepteurs kaïnates
Cdc42 : Cell division cycle 42	GluN : Sous-unité des récepteurs NMDA
CLASP : Cytoplasmic linker associated protein	GRB2 : Growth factor receptor binding protein 2
CLIP : Cytoplasmic linker protein	GSK-3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta
CMHI : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I	GTP : Guanosine triphosphate
CMHII : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II	Hoxb8 : Homeobox B8
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	
CR3 : Récepteur au complément 3	

Iba1 : Ionized calcium-binding adapter molecule1	mGluR : Récepteur métabotropique au glutamate
IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase	MOG : Myelin oligodendrocyte glycoprotein
IGF-1 : Insulin-growth factor 1	MPTP : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tétrahydro pyridine
iGluR : Récepteur au glutamate ionotropique	MTOC : Centre organisateur des microtubules
IL-10 : Interleukine 10	MWM : Piscine de Morris
IL-12 : Interleukine 12	NAPDH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
IL-1 β : Interleukine 1 beta	NCK : Non-catalytic region of tyrosine kinase
IL-4 : Interleukine 4	NF70 : Neurofilament de 70kDa
IL-6 : Interleukine 6	NFAT : Nuclear factor of activated T-cells
IFN γ : Interferon gamma	NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
iNOS : Inducible NO synthase	NGF : Neuronal growth factor
IP3 : Inositol triphosphate	NK : Cellule natural killer
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif	NMDA : Acide-N-methyl-D-aspartatique
ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif	NO : Nitric oxyde
JNK : Jun kinase	NT : Neurotrophine
KIR : Killer-cell immunoglobulin-like receptor	PAK : p21-activated kinase
LAT : Linker of activated T cells	PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
Lck : Lymphocyte specific protein tyrosine kinase	PC : Plaque corticale
LCS : Labyrinthe en croix surélevé	PD-L1 : Programmed cell-death ligand 1
LGN : Noyau latéral géniculé	PI3K : Phosphoinositol 3 kinase
LIMK1 : LIM domain kinase 1	PICK1 : Protein interacting with protein kinase C alpha
L-LTP : phase tardive de la LTP	PIP2 : Phosphatidyl-inositol-diphosphate
LT : lymphocyte T	PirB : Paired immunoglobulin-like receptor B
LTD : Dépression à long terme	PKA : Protéine kinase A
LTP : Potentialisation à long terme	PKC : Protéine kinase C
M1 : Macrophage/microglie de type 1	PKM ζ : Protéine kinase M zeta
M2 : Macrophage/microglie de type 2	PLC : Phospholipase C
MAGUK : Membrane-associated guanylate kinase	PP1 : Protéine phosphatase 1
MAP : Microtubule-associated protein	PP2 : Protéine phosphatase 2
MAPK : Mitogen-associated protein kinase	PRR : Pattern recognition receptors
MB : Matière blanche	PSD : Densité postsynaptique
MECP-2 : Methyl CpG binding protein 2	PSD95 : Postsynaptic density protein 95
mEPSC : Miniature excitatory postsynaptic current	

PT : Prolongement de traîne
Pte : Prolongement de tête
Rac 1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1
RAG : Recombination activating gene
Ras-GRF1 : Ras-protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1
RAWM : Test de la piscine à 6 bras
Rho A : Ras homologous member A
Rho GTPase : Ras-homologous guanine triphosphatases
SAP102 : Synapse-associated protein 102
SAP97 : Synapse-associated protein 97
SCID : Severe Combined Immunodeficiency
SDF-1 : Stromal derived factor 1
sEPSC : Spontaneous excitatory postsynaptic current
SH2 : Src homology 2
SHP1 : Src homology protein tyrosine phosphatase 1
SHP2 : Src homology protein tyrosine phosphatase 2
SI : Système immunitaire
SLP76 : SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa
SNC : Système nerveux central

SOCS3 : Suppressor of cytokine signaling 3
STAT : Signal transducers and activators of transcription
Syk : Spleen tyrosine kinase
TARP: Transmembrane AMPA receptor regulating protein
TCR : Récepteur des lymphocytes T
TGF β : Transforming growth factor beta
TLR : Toll-like receptor
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TREM2 : Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TrkB : Tyrosine receptor kinase B
TSB : Test de sursaut au bruit
VASP : Vasodilator stimulated phosphoprotein
VEGF : Vascular endothelial growth factor
WASP : Wiskott-Aldricht syndrome protein
WAVE : WASP-family verpolin-homologous protein
ZAP-70 : zeta associated protein 70
ZI : Zone intermédiaire
ZM : Zone marginale
ZSV : Zone sous-ventriculaire
ZV : Zone ventriculaire

AVANT PROPOS

Le système nerveux central (SNC) et le système immunitaire (SI) sont deux systèmes majeurs et complexes avec des fonctions distinctes mais partageant de nombreuses similitudes au niveau développemental mais aussi au niveau du fonctionnement. De plus, ces deux systèmes sont capables d'agir l'un sur l'autre : le SNC est capable de moduler les réponses du SI adaptatif et le SI est un régulateur de certaines fonctions du SNC, notamment au niveau comportemental.

Une caractéristique développementale commune du SNC et du SI est l'importance du phénomène d'apoptose. Dans les deux systèmes, la quantité initiale de cellules formées excède le nombre de cellules présent dans le système mature. Dans le SI, les lymphocytes T qui ne rempliraient pas leur fonction sont éliminés au cours des sélections positive et négative. Durant le développement neuronal, les neurones excédentaires qui n'ont pas été inclus correctement dans le réseau neuronal seront, eux aussi, éliminés par apoptose.

Au niveau mécanistique, les deux systèmes utilisent un mode de communication commun, par l'intermédiaire de structures membranaires spécialisées appelées synapses. La synapse correspond à un système spécifique et local de communication finement régulé entre deux cellules, permettant l'agrégation spécifique de complexes moléculaires (récepteurs et molécules de signalisation) permettant la transmission d'informations d'une cellule à une autre. De plus, le SNC et le SI sont capables d'agir à distance de leur lieu d'origine, les neurones projetant leurs axones sur de longues distances et les cellules de l'immunité migrant vers le site d'intérêt. Les deux systèmes sont aussi particulièrement plastiques. Suivant les signaux environnementaux perçus, les cellules immunitaires et nerveuses modifient leur réponse par l'expression ou la sécrétion de molécules appropriées.

De plus, les deux systèmes sont en interaction, de manière bidirectionnelle. Le SI régule certaines fonctions du SNC par des molécules médiatrices, notamment les cytokines. Ces interactions apparaissent importantes pour la cognition. En conditions inflammatoires et pathologiques, les cellules de l'immunité peuvent être recrutées au niveau du SNC où elles vont interagir et modifier les cellules

gliales et neuronales. A l'inverse, le SNC régule le SI à deux niveaux : grâce au système nerveux périphérique qui innerve les organes lymphoïdes où il peut sécréter des facteurs régulant l'initiation et la polarisation de la réponse immunitaire, mais aussi lorsque les cellules immunes infiltrent le parenchyme cérébral. En effet, au cours d'une inflammation, l'activité des cellules de l'immunité infiltrées peut être modulée par les cellules du cerveau, qui peuvent restreindre ou stimuler la réponse immunitaire.

Les similitudes de mécanismes cellulaires et les interactions existant entre le SNC et le SI sont corrélées à l'existence d'un répertoire moléculaire commun aux deux systèmes. Hormis les cytokines et les chimiokines, dont les fonctions dans les deux systèmes sont assez bien connues et seront peu abordées dans cette thèse, l'expression et la fonction au niveau du SNC de molécules relatives à l'immunité adaptative, et en particulier celles impliquées dans l'activation lymphocytaire restent moins décrites et les études récentes sur ce sujet mettent en évidence des rôles majeurs de ces molécules sur le développement et la plasticité cérébrale. L'étude de la fonction cérébrale de ces molécules est particulièrement importante pour appréhender les mécanismes d'interaction entre les deux systèmes, et de ce fait, comprendre et prendre en compte les effets neurologiques parfois majeurs que peuvent avoir des traitements ciblant le SI sur le SNC.

L'objectif général de cette thèse est de caractériser les fonctions de la molécule CD3 ζ et de la voie de co-stimulation CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen4)/CD80-CD86 sur certains stades du développement neuronal et la plasticité cérébrale.

Dans l'introduction, j'aborderai tout d'abord les grandes étapes du développement neuronal en me focalisant sur les étapes précoces de formation des prolongements neuronaux. Dans une seconde partie, je traiterai des différentes formes de plasticité cérébrale et détaillerai les mécanismes moléculaires de la potentialisation à long terme. Enfin, dans une troisième partie, j'exposerai le rôle des cellules de l'immunité et de l'expression cérébrale de molécules dites immunes sur le développement et la plasticité cérébrale. L'introduction se terminera par la présentation des éléments majeurs étudiés au cours de cette thèse que sont CD3 ζ et la voie CTLA4/CD80-CD86.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I- Le Développement Neuronal

Avant de former un réseau fonctionnel, les neurones doivent franchir plusieurs étapes successives, de la neurogénèse à la maturation fonctionnelle en passant par leur migration et leur différenciation. Cette partie a pour objectif de décrire brièvement les différentes étapes du développement neuronal et d'approfondir spécifiquement celles étudiées au cours de ma thèse, qui sont les étapes précoces de la polarisation neuronale.

A- Généralités

Un réseau neuronal fonctionnel est constitué principalement de neurones polarisés établissant des connexions entre eux via des structures appelées synapses. La polarisation neuronale est à la fois morphologique et fonctionnelle. A l'état mature, les neurones présentent deux compartiments : un long et fin axone riche en vésicules permettant la transmission de signaux, et une ou plusieurs dendrites plus courtes et épaisses, contenant les récepteurs permettant la réception de ces signaux. La polarisation neuronale représente ainsi une étape majeure du développement neuronal. C'est durant cette étape que le neurone va acquérir tous les éléments nécessaires à la mise en place du réseau.

L'étude de la polarisation neuronale a pris son essor via les modèles de culture de neurones *in vitro*, notamment la culture de neurones hippocampiques décrite par l'équipe de Banker au début des années 90 (Dotti et al., 1988). Les cinq différentes étapes de la polarisation des neurones ont ainsi pu être décrites précisément (figure 1). Suite à leur dissociation à partir de cerveau embryonnaire de rongeur, les neurones hippocampiques forment dans un premier temps une fine membrane appelée lamellipode puis de nombreuses extensions très fines appelées filopodes (étape 1). Après quelques heures, de nombreux neurites immatures ou prolongements mineurs se développent (étape 2). Ces neurites, qui possèdent à leur extrémité des structures mobiles appelées cônes de croissance, sont de morphologie identique et suivent un processus d'allongement/rétractation répété et aléatoire qui n'est

possible que par le remaniement continu du cytosquelette. Un de ces neurites immatures commence à s'étendre plus rapidement et devient beaucoup plus long que les autres, c'est la différenciation axonale (étape 3). Les autres neurites continuent de suivre leur processus d'allongement/rétraction et maintiennent leur longueur avant de se différencier en dendrites au bout de quelques jours (étape 4). Après une semaine de culture environ, les neurones établissent les premiers contacts synaptiques entre les filopodes dendritiques et les terminaisons axonales créant ainsi un réseau neuronal fonctionnel (étape 5).

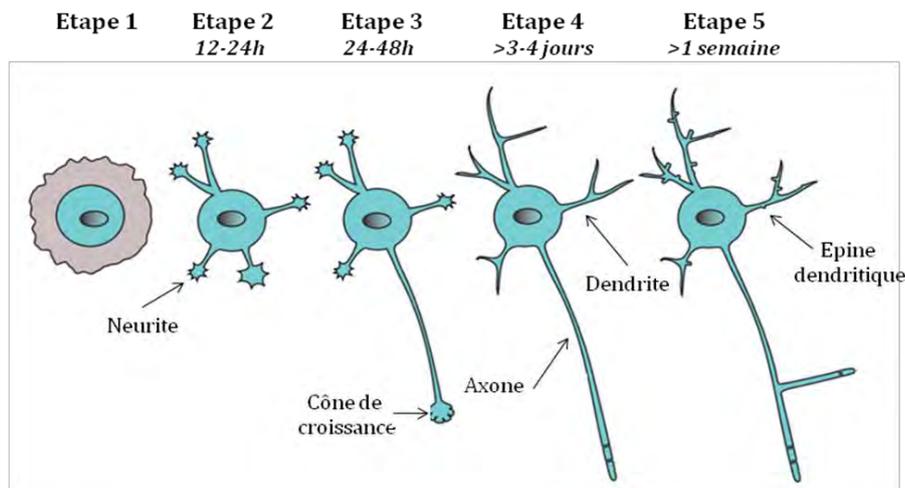


Figure 1: Etablissement de la polarisation des neurones hippocampiques *in vitro*. Représentation schématique de la polarisation neuronale de neurones hippocampiques de rat. Quelques minutes après ensemencement, les neurones forment une fine membrane appelée lamellipodes (Etape 1). De là vont se former des filopodes puis des neurites immatures (Etape 2). De ces neurites indifférenciés, l'un va former l'axone (Etape 3) alors que les autres se développeront ultérieurement en dendrites (Etape 4), cassant ainsi la symétrie morphologique. Au-delà d'une semaine de culture *in vitro*, les neurones créent des connexions synaptiques entre épines dendritiques et terminaisons axonales pour former un réseau neuronal fonctionnel (Etape 5). Adapté de Tahirovic and Bradke, 2009.

Dans ces modèles de cultures *in vitro*, la dissociation des neurones avant ensemencement entraîne la perte des prolongements existants et, ainsi, la polarisation s'effectue à partir d'une cellule artificiellement dépolarisée. De plus, les modèles de culture ne prennent pas en compte les contraintes environnementales, à la fois physique et biologique, du neurone *in vivo* qui ont été décrites comme importantes (Arimura and Kaibuchi, 2007; Fass and Odde, 2003). Les avancées technologiques telles que l'électroporation *in et ex utero* ont permis d'investiguer la polarisation des neurones *in vivo* notamment les neurones corticaux (Hand et al., 2005; Hatanaka and Murakami, 2002). Plusieurs

études ont ainsi pu mettre en évidence que l'acquisition de la polarité neuronale s'effectuait au cours de la migration des neurones (figure 2). Après la neurogénèse (Etape 1), les neurones vont adopter une morphologie multipolaire (Etape 2) puis commencer leur migration le long des cellules de la glie radiaire. Durant cette migration, les neurones pyramidaux présentent une morphologie bipolaire (Etape 3) avec un prolongement apical, appelé prolongement de traîne, qui deviendra l'axone et un prolongement basal, appelé prolongement de tête, qui donnera les dendrites (Etape 4) (Polleux and Snider, 2010). Une fois arrivé à leur emplacement définitif, les neurones vont pouvoir former des connexions synaptiques (Etape 5).

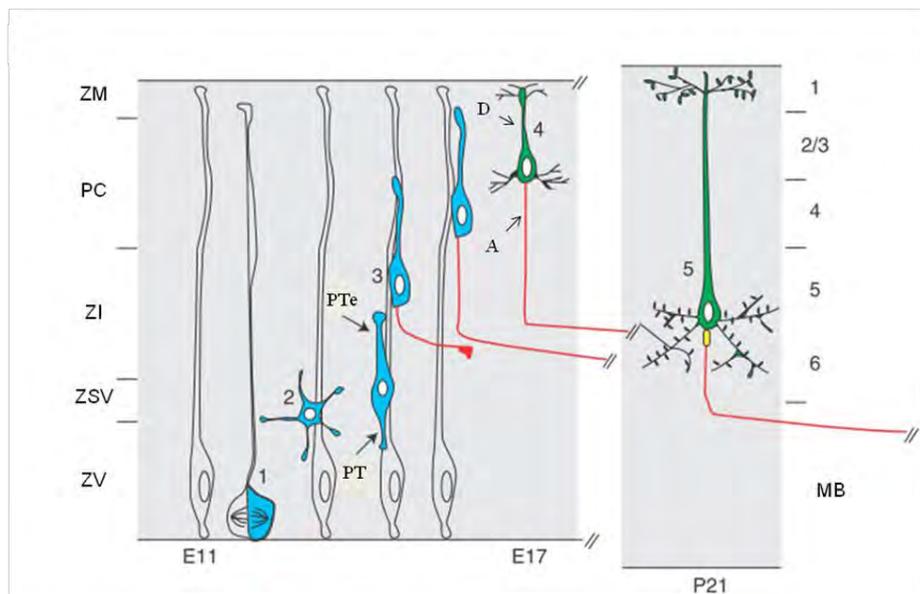


Figure 2 : Polarisation neuronale *in vivo*. L'émergence de l'axone (A) des neurones du néocortex se produit au cours de la migration radiaire au sein de la zone intermédiaire (ZI) à partir du prolongement de traîne (PT). L'émergence de la dendrite (D) a lieu, quant à elle, à la fin de la migration radiaire à partir du prolongement de tête (PTe). ZM : zone marginale ; PC : plaque corticale ; ZSV : zone sous-ventriculaire ; ZV : zone ventriculaire ; MB : matière blanche ; 1-6 : couches du cortex. Adapté de Polleux and Snider, 2010.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé particulièrement aux étapes précoces du développement neuronal avec la formation et l'élongation des premiers neurites. Je ne décrirai donc que ces étapes de la polarisation neuronale.

B- Emergence des premiers neurites

La croissance neuritique a été décrite pour la première fois par Ramon Y Cajal à la fin du XIX^{ème} siècle dans son étude sur les neurones embryonnaires de poulet. Alors que les axones et dendrites sont facilement nommés neurites du fait de leur longueur, la définition des neurites « mineurs » est plus compliquée. Dehmelt et Halpain ont défini les neurites comme étant des protrusions fines, capables de s'allonger, contenant une architecture microtubulaire et possédant à leur extrémité un cône de croissance riche en actine (Dehmelt and Halpain, 2004).

La croissance des neurites est plutôt bien connue et sera décrite dans le prochain paragraphe, mais la première étape, dont on ne connaît encore que peu de choses, est l'émergence des premiers neurites. En effet, les neurones en culture présentent une morphologie sphérique à l'ensemencement d'où va émerger un, puis plusieurs neurites (Dotti et al., 1988) (figure 3). Il en est de même *in vivo* où les neurones post-mitotiques présentent une morphologie sphérique avant de voir naître les premiers prolongements (Polleux and Snider, 2010). Le site d'émergence du premier neurite semble important puisqu'il détermine le site d'initiation du second neurite (qui apparaîtra du côté diamétralement opposé au premier) créant ainsi le phénotype bipolaire présenté par les neurones durant leur migration *in vivo* (Anda et al., 2008). De plus, ces premiers neurites sont importants pour la suite de la polarisation neuronale puisqu'il a été montré que dans 94% des cas, l'axone se différencie à partir du premier ou du second neurite émergeant (Anda et al., 2008).

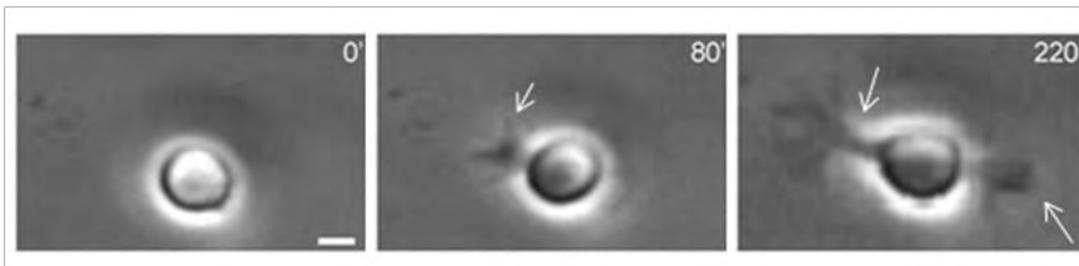


Figure 3 : Emergence des premiers neurites *in vitro*. Développement des premiers neurites à partir d'un neurone hippocampique isolé visualisé par vidéomicroscopie. Le premier neurite va émerger à partir d'un neurone sphérique, et sera suivi par l'émergence d'un second neurite, dont le site d'initiation sera diamétralement opposé au site d'initiation du premier neurite. Adapté de Menchón et al., 2011.

Il est aujourd'hui accepté que l'émergence du premier neurite fait appel à des facteurs à la fois externes et internes à la cellule (Da Silva and Dotti, 2002). En effet, des gradients de molécules d'adhésion (intrégrines et cadhérines), de molécules sécrétées (facteurs neurotrophiques) ou de molécules de la matrice extracellulaire (reelin) vont influencer la migration et la polarisation du neurone *in vivo* et *in vitro* (Dent et al., 2007; Gärtner et al., 2012a; Hoe et al., 2009; Labelle and Leclerc, 2000). Cependant, les neurones isolés en culture sont capables de développer un neurite à partir d'une cellule sphérique en l'absence de gradient moléculaire montrant ainsi l'implication de facteurs intrinsèques à la cellule permettant l'initiation du premier neurite (Dotti et al., 1988).

Au niveau intracellulaire, l'émergence du bouton neuritique fait appel à des modifications du cytosquelette d'actine. En effet, des études récentes ont montré que les neurites émergeaient via des structures riches en actine que sont les lamellipodes et filopodes (Dent et al., 2007; Flynn et al., 2012). De plus, les molécules Ena/VASP (Vasodilator stimulated phosphoprotein) mais aussi ADF (Actin depolymerizing factor)/Cofiline, impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine, ont été identifiées comme médiatrices de l'émergence du premier neurite, montrant ainsi l'importance de la réorganisation du cytosquelette d'actine dans l'émergence des neurites (Flynn et al., 2012; Kwiatkowski et al., 2007). Il a été montré que la combinaison d'une diminution de la densité de l'actine avec un envahissement des filopodes par les microtubules entraînait l'élargissement du filopode.

Une étude de l'équipe de Carlos Dotti a montré que le centrosome et l'appareil de Golgi étaient localisés de manière asymétrique dans le cytoplasme des neurones hippocampiques et se situaient préférentiellement du côté du site d'initiation du premier neurite, suggérant ainsi l'importance de ces structures dans l'émergence du premier neurite (de Anda et al., 2005). Cependant, des études réalisées notamment chez la drosophile mais aussi chez le rat sont venues remettre en cause ces résultats en montrant que des défauts d'assemblage ou l'ablation du centrosome par laser n'empêchaient pas la formation des neurites (Ge et al., 2010; Stuessi et al., 2010). De plus, des analyses poussées de microscopie ont mis en évidence que la localisation du centrosome et de l'appareil de Golgi au niveau

du site d'émergence du premier neurite n'apparaissait qu'après les premières déformations de la membrane associées à l'émergence du neurite (Gärtner et al., 2012a).

A ce jour, l'évènement le plus précoce observé avant l'émergence du premier neurite est l'accumulation de molécules d'adhésion au niveau du futur site d'initiation du neurite. Carlos Dotti et ses collaborateurs ont proposé un modèle selon lequel le neurone sphérique présenterait des microdomaines membranaires différents du reste du neurone de part leur composition et/ou l'organisation des récepteurs (Da Silva and Dotti, 2002). Des analyses réalisées à la fois *in vivo* et *in vitro* chez la drosophile et le rat semblent confirmer ce modèle. En effet, elles ont montré qu'il y avait une accumulation spécifique de molécules d'adhésion, et notamment de N-cadhérine, au niveau du site d'initiation du futur neurite avant toute modification membranaire (Gärtner et al., 2012a; Pollarolo et al., 2011). Elles ont aussi montré que, secondairement à l'agrégation de N-cadhérine, le centrosome et l'appareil de Golgi étaient recrutés au niveau du site d'émergence du premier neurite par l'intermédiaire de l'activation de la voie PI3K (Phosphoinositol 3 kinase) (figure 4) (Gärtner et al., 2012a).

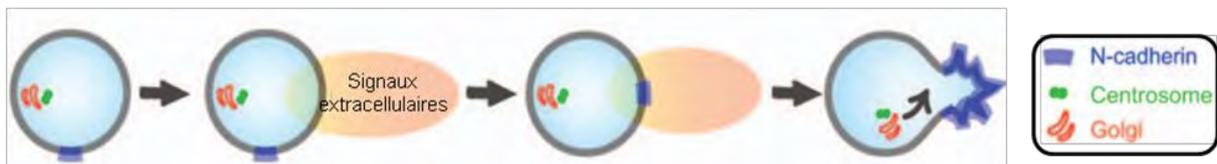


Figure 4 : Modèle de l'émergence du premier neurite. Le neurone sphérique présente des agrégats de N-cadhérine qui vont marquer le site d'initiation du premier neurite. En présence de signaux extracellulaires, il va y avoir orientation de ces agrégats qui vont initier l'émergence du premier neurite et engendrer le recrutement du centrosome et de l'appareil de Golgi au sein du site d'émergence. Adapté de Gärtner et al., 2012b.

C- Elongation des neurites

1- Structures cellulaires impliquées dans l'émergence et l'élongation des neurites.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'émergence mais aussi l'élongation des neurites se fait grâce à des domaines cellulaires riches en actine que sont, les filopodes, lamellipodes et cônes de croissance.

a- Les lamellipodes et filopodes

Les lamellipodes et filopodes sont des structures riches en actine localisées tout autour de la cellule lors de l'initiation des neurites et sont retrouvés par la suite au sein du cône de croissance (figure 5). Les lamellipodes, fines membranes planes, contiennent des filaments d'actine (actine-F) ramifiés et les filopodes, protrusions ressemblant à un doigt, sont constitués d'agrégats d'actine-F parallèles non ramifiés. Les filopodes sont extrêmement mobiles, ils s'allongent et se rétractent rapidement et continuellement en réponse à l'environnement qu'ils explorent.

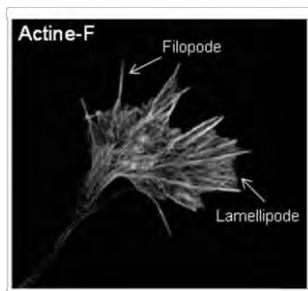


Figure 5 : Immunomarquage de l'actine-F dans un cône de croissance neuritique. Le marquage de l'actine-F permet la visualisation des structures riches en actine que sont les filopodes et les lamellipodes. Adapté de Dent et al, 2011.

b- Le cône de croissance

Le cône de croissance, présent aux extrémités des neurites, est un compartiment cellulaire très mobile. Cette structure permet la croissance du neurite en associant la perception de signaux environnementaux à des modifications cytosquelettiques (Lowery and Vactor, 2009; Vitriol and Zheng, 2012). Le cône de croissance peut être décomposé en trois parties, une partie périphérique hautement dynamique et riche en actine-F, contenant des lamellipodes et filopodes (domaine P), une région centrale constituée de microtubules, de vésicules et d'organelles (domaine C) et ces deux

parties sont séparées par une région transitoire composée à la fois de filaments d'actines et de microtubules (domaine T) (figure 6).

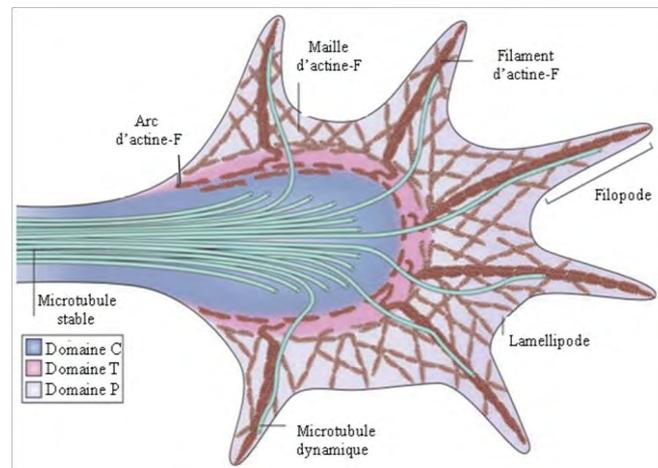


Figure 6 : Structure du cône de croissance. Le cône de croissance est organisé en 3 régions distinctes : le domaine périphérique (domaine P) riche en actine-F sous forme de filaments agrégés dans les filopodes et sous forme de mailles dans les lamellipodes, le domaine transitoire (domaine T) contenant des filaments d'actine sous forme d'arcs et des microtubules, et le domaine central (domaine C) riche en organelles et en microtubules. Adapté de Lowery and Vactor, 2009.

2- Mécanismes cellulaires de l'élongation neuritique

Le cytosquelette, composant les structures décrites précédemment, est primordial puisqu'il permet l'établissement et le maintien des prolongements neuronaux (Stiess and Bradke, 2011). L'actine-F et les microtubules ont des propriétés fonctionnelles uniques leur permettant d'établir et de réguler la polarité des neurones, mais aussi d'autres types cellulaires polarisés (Li and Gundersen, 2008). L'interaction coordonnée entre le cytosquelette d'actine et les microtubules est essentielle et primordiale pour l'extension des neurites (Schaefer et al., 2008). Les filaments d'actine et les microtubules sont des polymères polaires composés pour l'actine de monomères d'actine globulaire (actine-G) capables de lier et d'hydrolyser l'ATP (Adénosine triphosphate), et, pour les microtubules, de sous-unités hétérodimériques de tubuline α et β liant et hydrolysant le GTP (Guanosine triphosphate). La polarisation résulte de l'association de ces sous-unités protéiques de manière hélicoïdale qui s'alignent toutes dans la même direction. Ainsi l'actine-F et les microtubules possèdent deux extrémités distinctes, barbées et pointues pour l'actine-F ; positives et négatives pour les microtubules (figure 7).

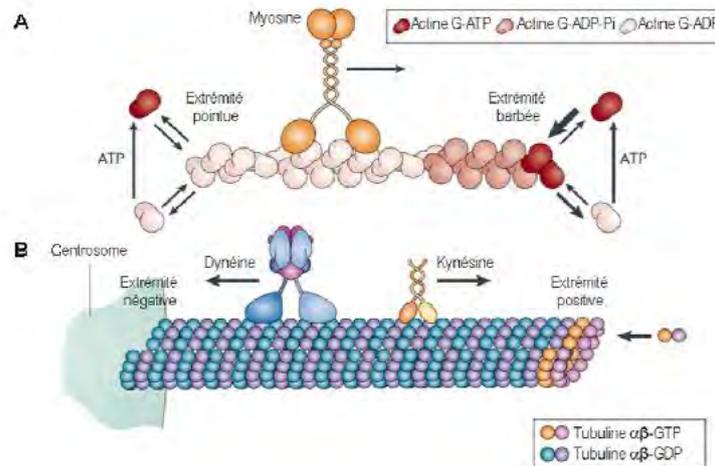


Figure 7 : Propriétés fondamentales des filaments d'actine et des microtubules. (A) Représentation schématique d'un filament d'actine. Les filaments d'actine, composés de sous-unités orientées toutes dans la même direction, présentent deux extrémités distinctes (barbée et pointue). La vitesse de dissociation et le type de monomère d'actine fixé diffèrent suivant l'extrémité. (B) Représentation schématique d'un microtubule. Les microtubules sont constitués de sous-unités $\alpha\beta$ hétérodimériques toutes orientées dans la même direction. Ils présentent deux extrémités différentes (positive et négative). A la fois pour l'actine et les microtubules, les protéines motrices, myosine (A), kinésines et dynéines (B) se déplacent de manière unidirectionnelle le long du filament. Adapté de Li and Gundersen, 2008.

Dans le cône de croissance, les extrémités barbées de l'actine-F à croissance rapide, sont orientées vers la périphérie du cône de croissance alors que les extrémités pointues, à croissance lente, sont orientées vers la base du cône de croissance. La dynamique des filaments d'actine est due à une balance entre l'intégration continue de sous-unités d'actine-G couplée à l'ATP au niveau des extrémités barbées et la dissociation des sous-unités d'actine-G liée à l'ADP (Adénosine diphosphate) au niveau des extrémités pointues. A la manière d'un tapis roulant, il existe un flux constant de monomères d'actine qui permet l'avancée du filament. Ce mécanisme est modulé par de nombreuses protéines comme la myosine et les régulateurs de l'actine (Dent et al., 2011; Vitriol and Zheng, 2012). Concernant les microtubules, la polymérisation, qui nécessite l'hydrolyse du GTP en GDP (Guanosine diphosphate), s'effectue au niveau du pôle positif orienté vers la zone transitoire du cône de croissance tandis que la dépolymérisation a lieu au niveau du pôle négatif, généralement ancré dans le centrosome ou dans d'autres centres organisateurs des microtubules (MTOC). Le mécanisme de régulation de la dynamique des microtubules s'appuie sur des phénomènes de stabilisation/déstabilisation de l'organisation des microtubules (Geraldo and Gordon-Weeks, 2009).

L'élongation du cône de croissance, permettant la pousse des neurites, se déroule en trois étapes : protrusion, engorgement et consolidation (figure 8). La protrusion s'opère par l'élongation rapide des dendrites ou de l'axone via la polymérisation de l'actine-F. Cette protrusion est par la suite envahie par les microtubules, amenant dans leur sillage des vésicules membranaires et des organelles. Cette étape est dite d'engorgement. La consolidation, qui vise à stabiliser le système, se produit une fois que l'actine-F entourant les microtubules disparaît, permettant à la membrane plasmique d'entourer le réseau de microtubules. Ces trois étapes se répètent dans cet ordre et permettent l'élongation des prolongements neuronaux (Dent et al., 2011). L'élongation neuritique fait donc appel à une régulation fine de l'actine et des microtubules.

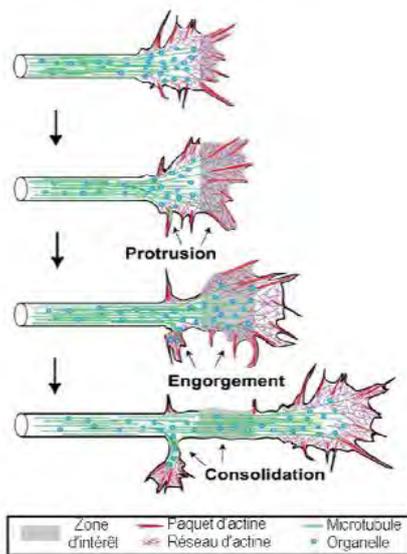


Figure 8 : Etapes de l'élongation du cône de croissance. Trois étapes de croissance régissent l'élongation neuritique. La protrusion est l'extension rapide du cône de croissance, suivie par l'invasion des microtubules, des vésicules membranaires et des organelles (engorgement). Enfin, la consolidation permet la stabilisation des microtubules et la formation du neurite. Adapté de Dent and Gertler, 2003.

a- Régulation de l'actine

Les protéines associées à l'actine sont importantes pour la régulation du stock d'actine dans la cellule. Elles permettent de réguler la polymérisation et d'organiser spatialement les filaments. Elles sont à leur tour contrôlées par des protéines régulatrices qui s'insèrent dans un réseau complexe interagissant avec toute la cellule. Plus d'une centaine de protéines ont été décrites comme protéines accessoires du cytosquelette d'actine permettant d'engendrer une réponse dynamique et adaptée de l'actine à l'environnement cellulaire (Pollard and Cooper, 2009). Parmi ces protéines, il existe des protéines dites de nucléation (Arp2/3 et formine) dont le rôle est d'initier la polymérisation, des

protéines de séquestration (profiline) qui permettent la régulation de la quantité d'actine-G dans le cytoplasme, et des protéines de fragmentation (cofiline) qui clivent l'actine-F (tableau 1).

<u>NOM</u>	<u>LOCALISATION</u>	<u>FONCTION</u>	<u>REFERENCES</u>
*Protéines de nucléation			
Arp2/3	lamellipode/filopode	initiation polymérisation actine ramifiée	(Ishikawa and Kohama, 2007; Korobova and Svitkina, 2008)
WAVE	lamellipode/filopode	promotion assemblage filaments actine	(Takenawa and Miki, 2001; Takenawa and Suetsugu, 2007)
Ena/VASP	lamellipode/filopode	promotion assemblage filaments actine	(Bear and Gertler, 2009; Bear et al., 2002)
*Protéine de séquestration			
Profiline	cône de croissance	activateur formation de monomères actine-G liée au GTP stabilisateur cytosquelette d'actine	(Kwiatkowski et al., 2003; Da Silva et al., 2003)
*Protéine d'assemblage			
Fascin	filopode	stabilisateur filaments d'actine en fibres parallèles	(Aratyn et al., 2007)
*Protéine de fragmentation			
ADF/Cofiline	cône de croissance	activateur dépolymérisation par liaison de l'actine G liée au GDP	(Pak et al., 2008)

Tableau 1 : Molécules régulatrices du cytosquelette d'actine dans le cône de croissance neuritique.

b- Régulation des microtubules

Les microtubules sont des polymères très instables suivant des phases alternatives de polymérisation et de dépolymérisation, ce qui leur confèrent l'aptitude à remodeler rapidement leur organisation en réponse à des signaux extracellulaires. Formés pour la plupart au sein du centrosome, ils sont la fondation structurelle des neurites et permettent le maintien de ces longs prolongements mais aussi le transport d'organelles et de cargos essentiels au fonctionnement et à la survie du neurone (Hirokawa et al., 2010). De manière similaire à l'actine, la stabilité des microtubules est régulée par un grand nombre de protéines stabilisatrices (plus-end tracking (+TIP) et les MAPs (microtubule associated proteins)), déstabilisatrices (Stathmine) et de protéines motrices (kinesine et dyneine) (tableau 2).

<u>NOM</u>	<u>FONCTION</u>	<u>REFERENCES</u>
*Protéines stabilisatrices + end tracking (+TIP)		
CLASP	stabilisation polymérisation microtubules	(Lee et al., 2004)
CLIP	augmentation polymérisation microtubules	(Galjart, 2005)
APC	régulation orientation du cône de croissance	(Koester et al., 2007)
*Autres protéines stabilisatrices		
MAP1B	régulation orientation du cône de croissance	(Mack et al., 2000)
CRMP2	stimulation assemblage microtubules	(Chae et al., 2009)
MAP2/tau	régulation du réseau de microtubules et transport moléculaire	(Dehmelt and Halpain, 2005)
Double-cortine	stabilisation microtubules	(Deuel et al., 2006)
*Protéines déstabilisatrices		
Stathmine	inhibition pousse	(Taranuk et al., 2006)
Spastine	inhibition embranchement	(Yu et al., 2008)
*Protéines motrices		
Kinesine 5	inhibition entrée des microtubules dans la région périphérique du cône de croissance	(Nadar et al., 2008)
Dyneine	Activation entrée des microtubules dans la région périphérique du cône de croissance	(Grabham et al., 2007)

Tableau 2 : Molécules régulatrices des microtubules du cône de croissance neuritique.

c- Coordination entre l'actine et les microtubules

La formation et l'élongation des neurites font appel à une action coordonnée du cytosquelette d'actine et des microtubules (Schaefer et al., 2008). Il est donc nécessaire d'avoir des molécules qui vont permettre la communication entre l'actine-F et les microtubules mais aussi coordonner la réception des signaux extracellulaires et les modifications cytosquelettiques. Plusieurs protéines de la famille des MAP, notamment MAP1B et MAP2c ont été montrées comme étant capables de s'associer à l'actine et pourraient donc permettre ce lien entre les deux systèmes (Dehmelt et al., 2003; Noiges et al., 2002). De même, la protéine ACF7 (Actin cross linking family 7) de la famille des spectraplakines est capable de réguler à la fois l'organisation des microtubules mais aussi la formation des filopodes (Sanchez-Soriano et al., 2009). Cependant, la famille protéique qui semble la plus prometteuse dans la coordination du cytosquelette d'actine et des microtubules est la famille des Rho GTPases (Ras homologous guanine triphosphatases). En effet, des études ont montré que les Rho GTPases agissaient comme des modules de signalisation spatiotemporels modulant l'organisation des microtubules mais aussi la communication avec le cytosquelette d'actine (Pertz, 2010). Les Rho GTPases les plus caractérisées sont les membres de la famille RhoA (Ras homologous member A), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1) et Cdc42 (Cell division cycle 42). Elles alternent entre deux états, un

état actif en étant lié au GTP et un état inactif en étant lié au GDP. De nombreuses protéines vont réguler la signalisation des Rho GTPases en facilitant la transition vers la forme active pour les GEF (Guanine nucleotide exchange factor) et en favorisant l'état inactif pour les GAP (GTPase activating protein) (figure 9).

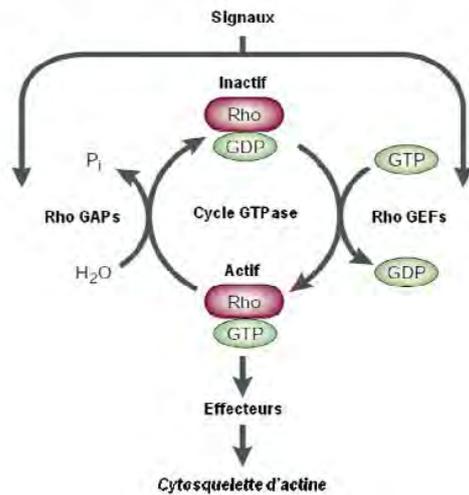


Figure 9 : Régulation des protéines Rho GTPases. Les Rho GTPases existent sous deux états : un état actif lorsqu'elles sont liées au GTP et un état inactif quand elles sont liées au GDP. Deux classes de molécules facilitent ce changement d'état : les GEF (guanine nucleotide exchange factor) qui vont permettre l'activation des Rho GTPases et les GAP (GTPase activating proteins) qui maintiennent les Rho GTPases dans un état inactif. Adapté de Luo, 2000.

RhoA est un régulateur négatif de la neuritogénèse et participe à de nombreuses voies de signalisation induisant l'effondrement du cône de croissance et la rétraction des neurites (Conde et al., 2010). Notamment, en activant LIMK1 (LIM domain kinase 1) et la profiline Ila, mais aussi en inactivant les voies Rac-Cdc42, RhoA agit sur la dynamique de l'actine et de ce fait sur la neuritogénèse (Conde et al., 2010; Rosso et al., 2004; Silva et al., 2003). Rac1 est exprimé au niveau du cône de croissance et participe à l'adhésion et à l'orientation de ce dernier (Lowery and Vactor, 2009). Rac1 participe à la formation des lamellipodes et à l'élongation des neurites en agissant sur la dynamique de l'actine via les voies PAK (p21-activated kinase)-cofiline et WAVE (WASP-family verpoin-homologous protein)-Arp2/3 (Ng and Luo, 2004). De manière intéressante, une des protéines régulatrices de Rac1, Tiam1 est impliquée dans la régulation de la dynamique de l'actine et a été récemment montrée comme interagissant aussi avec MAP1B, protéine associée aux microtubules (Montenegro-Venegas et al., 2010). Tiam1 apparaît donc comme un candidat intéressant dans l'association entre l'actine et les microtubules. Cdc42 participe à la formation des filopodes en agissant sur le complexe Arp2/3 via les protéines N-WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)

(Notarangelo and Ochs, 2003). Il apparaît donc que RhoA inhibe la pousse neuritique alors que Rac1 et Cdc42 la favorisent. Cependant cette vision commence à changer avec le développement de procédés dédiés à l'étude des changements spatiotemporels de l'activité des GTPases. Ces outils permettront l'émergence de modèles d'activation des Rho GTPases prenant en compte les effets que peuvent avoir certaines GTPases sur les autres, les interactions des Rho GTPases avec d'autres compartiments subcellulaires comme les microtubules et la membrane plasmique, mais aussi la multitude de signaux extracellulaires reçus par la cellule et agissant sur les voies des Rho GTPases.

En conclusion, ces premières étapes du développement neuronal sont hautement dépendantes de la coordination du cytosquelette d'actine et des microtubules. Ainsi, les molécules agissant, directement ou indirectement, avec l'une ou l'autre des structures vont potentiellement pouvoir influencer sur l'émergence et l'élongation des premiers neurites.

II- La Plasticité Synaptique

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le développement neuronal aboutit à la formation et la stabilisation de synapses, points de communications entre neurones, permettant un échange d'informations stable et efficace entre un neurone présynaptique et un neurone postsynaptique. L'arrivée d'un signal électrique dans l'extrémité présynaptique engendre la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs vont alors se fixer sur les récepteurs situés au niveau postsynaptique et permettre la génération d'un signal électrique via l'activation de canaux ioniques et les seconds messagers qui leur sont associés. Il existe un grand nombre de neurotransmetteurs qui vont spécialiser les synapses. Ils peuvent être divisés en deux grandes catégories : les neurotransmetteurs excitateurs comme le glutamate et les neurotransmetteurs inhibiteurs comme le GABA (Acide- γ -aminobutyrique). Dans le cadre de cette thèse, je m'intéresserai plus spécifiquement aux synapses excitatrices glutamatergiques.

A- La synapse glutamatergique

Les synapses glutamatergiques représentent les principales synapses excitatrices du système nerveux central (Watkins, 2000). Elles sont caractérisées au niveau morphologique et fonctionnel par une spécification de la partie postsynaptique appelée densité post synaptique (PSD). La PSD consiste en une organisation complexe et régulée de nombreuses protéines importantes pour la fonction synaptique (Sheng and Kim, 2011). Le recoupement des études protéomiques s'intéressant à la PSD a évalué le nombre de protéines à environ 450 au sein de ces microstructures (Collins et al., 2006). On peut distinguer plusieurs grandes catégories de molécules au sein de la PSD : les récepteurs au glutamate métabotropiques (mGluR) et ionotropiques (iGluR), les protéines d'échafaudage (Membrane-associated guanylate kinase ou MAGUKs, Shanks) qui permettent l'assemblage et le maintien de la PSD, ainsi que les molécules de signalisation comme les protéines kinases (Ca²⁺/calmoduline kinase (CaMK), protéine kinase A (PKA), protéine kinase C (PKC)) ou phosphatases (protéine phosphatase 1 (PP1), protéine phosphatase 2 (PP2)) permettant la transmission

des signaux au sein de la PSD. Parmi toutes ces molécules, les récepteurs au glutamate occupent une place centrale (figure 10).

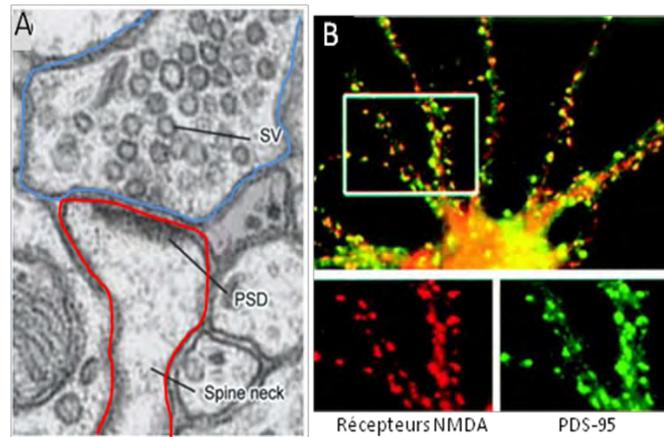


Figure 10 : Morphologie et composition de la synapse glutamatergique des neurones hippocampiques. (A) Morphologie d'une synapse de la région CA1 de l'hippocampe par microscopie électronique. L'extrémité présynaptique (bleu) contenant les vésicules de neurotransmetteurs (SV) se trouve appaisée à l'extrémité postsynaptique (rouge) contenant une région dense en protéines (PSD). L'extrémité postsynaptique présente une structure d'épine dendritique avec un cou resserré (spine neck). Adapté de Sheng and Hoogenraad, 2007 (B) Double marquage des récepteurs NMDA (rouge) et de la protéine d'échafaudage PSD-95 (vert) sur un neurone hippocampique in vitro. Ces deux protéines sont des constituants de la densité postsynaptique (PSD) permettant la visualisation des épines dendritiques. Adapté de Rao and Craig, 1997.

Les récepteurs sont de première importance pour les synapses glutamatergiques puisque ce sont les premiers acteurs et les modulateurs de la transmission postsynaptique. Cependant, de nombreuses autres molécules dont nous parlerons ultérieurement sont aussi primordiales à la transmission et à la plasticité des synapses glutamatergiques. On compte deux types majeurs de récepteurs au glutamate, les récepteurs métabotropiques (mGluR) et les récepteurs ionotropiques (récepteurs NMDA (acide-N-méthyl-D-aspartique), récepteurs AMPA (a-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol) et récepteurs kaïnate).

1- Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) sont des récepteurs couplés aux protéines G et médient leur action en activant des seconds messagers (figure 11). On compte aujourd'hui huit sous-types de mGluR subdivisés en trois groupes : les mGluR du groupe I (mGluR1-5) sont localisés au niveau postsynaptique et se concentrent en pérисynaptique (Lujan et al., 1996). En activant la phospholipase C (PLC), ils induisent le relargage du stock de calcium intracellulaire par la production

d'IP3 (inositol triphosphate) et de DAG (diacylglycérol) (Fagni et al., 2000). Les groupes II (mGluR2-3) et III (mGluR4-7-8) sont localisés au niveau présynaptique et participent à la régulation de la libération de neurotransmetteurs en inhibant la formation d'AMPC (adénosine monophosphate cyclique) (Upreti et al., 2013). Ainsi les récepteurs mGluR sont particulièrement impliqués dans la génération de certaines formes de dépression à long terme dont nous discuterons ultérieurement.

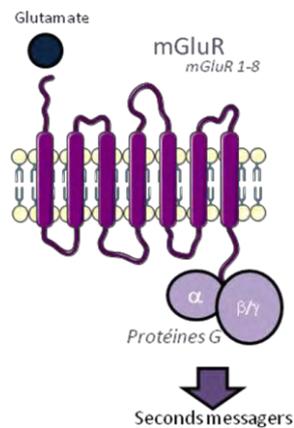


Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs mGluR. L'activation des récepteurs mGluR par le glutamate va activer les protéines G qui vont ensuite activer des seconds messagers.

2- Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques (iGluR) sont des canaux ioniques perméables aux cations se caractérisant par leurs propriétés cinétiques, leur perméabilité au calcium et leur modulation par des composés endogènes autres que le glutamate. On trouve les récepteurs kaïnates, les récepteurs AMPA et les récepteurs NMDA (figure 12).

Les récepteurs kaïnates sont exprimés partout dans le SNC et peuvent être localisés à la fois au niveau pré et postsynaptique (Huettner, 2003). De structure assez analogue aux récepteurs AMPA, ce sont des hétéromères formés de quatre sous unités (GluK1-5). Les études sur les récepteurs kaïnates sont limitées en comparaison de celles effectuées sur les récepteurs AMPA et NMDA. Au cours du développement, ils sont impliqués dans la formation des synapses thalamocorticales (Kidd and Isaac, 1999). Dans le cerveau adulte, les fibres mossues hippocampiques sont particulièrement enrichies en récepteurs GluK1/3 au niveau présynaptique, tandis que les récepteurs GluK2/5 sont concentrés au niveau postsynaptique (Traynelis et al., 2010). Il semble que les récepteurs kaïnates participent à certaines formes de plasticité synaptique qui seront évoquées ultérieurement.

Les récepteurs AMPA sont des homo ou hétéromères composés de quatre sous-unités (GluA1-4) (Keinänen et al., 1990). Dans l'hippocampe et le cortex adultes, la majorité des récepteurs AMPA sont des hétéromères GluA1/2 et plus minoritairement GluA2/3 (Craig et al., 1993). L'activation des récepteurs AMPA déclenche l'ouverture du canal perméable au K^+ et Na^+ et permet ainsi une transmission synaptique excitatrice rapide (Rosenmund et al., 1998). Dans certains cas, les récepteurs AMPA peuvent être perméables au Ca^{2+} en cas d'absence de la sous-unité GluA2 (Bassani et al., 2009). L'ARNm de cette sous-unité GluA2 est éditée, provoquant le remplacement de la glutamine en position 607 (présente dans les autres sous-unités) en une arginine rendant ainsi le canal imperméable au calcium (Seeburg and Hartner, 2003). Ce mécanisme d'édition semble particulièrement important pour la fonction cérébrale puisque la mortalité est importante chez les animaux dont le niveau d'édition de la sous-unité GluA2 est altéré (Feldmeyer et al., 1999). Un aspect particulièrement important dans la fonction des récepteurs AMPA est leur dynamisme membranaire. En effet, les récepteurs AMPA font l'objet d'un trafic cellulaire intense à la membrane postsynaptique via des mécanismes d'insertion (Gerges et al., 2006), d'endocytose (van der Sluijs and Hoogenraad, 2011) et de diffusion latérale (Opazo et al., 2012). Ainsi le nombre de récepteurs AMPA à la synapse mais aussi la composition des récepteurs AMPA semblent jouer un rôle majeur dans la plupart des mécanismes de plasticité synaptique.

Les récepteurs NMDA, principalement postsynaptiques (Ehlers et al., 1995), sont plus complexes que les autres récepteurs au glutamate. Ce sont des hétérotétramères composés de deux unités GluN1 obligatoires et de deux sous-unités GluN2 (GluN2A-D) ou GluN3 (GluN3A-B) (Wenthold et al., 2003). Ils peuvent aussi exister sous formes de trihétérotétramères où les deux sous-unités GluN2 sont de types différents (Tovar et al., 2013). Des études récentes semblent indiquer que ces récepteurs trihétérotétramériques seraient majoritaires au niveau des synapses glutamatergiques hippocampiques (Rauner and Köhr, 2011). La composition des récepteurs NMDA est régulée au cours du développement. En effet, dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet, on observe au cours du développement postnatal un passage de l'expression de récepteurs GluN1/2B vers des récepteurs GluN1/2A et cette transition est importante pour le développement et la transmission synaptique (van

Zundert et al., 2004). Leur activation est plus complexe que celle des récepteurs AMPA. En effet, elle nécessite deux signaux simultanés : d'une part, la liaison du glutamate et de son co-agoniste la glycine sur le récepteur et, d'autre part, la dépolarisation de la membrane postsynaptique permettant le retrait de l'ion Mg^{2+} qui bloque l'ouverture du canal et l'entrée de calcium. Les propriétés électrophysiologiques des récepteurs NMDA sont dépendantes de leur composition en sous-unités GluN2. Ainsi les récepteurs GluN1/2A ont une probabilité d'ouverture plus grande (Chen et al., 1999) et une dé-activation plus rapide (Erreger et al., 2005) mais sont moins perméables au calcium que les récepteurs GluN1/2B (Sobczyk et al., 2005). De plus, les différences dans la partie intracellulaire des sous unités GluN2A et GluN2B induisent des différences de partenaires moléculaires et ainsi des différences de régulation (Traynelis et al., 2010). Comme nous le verrons ultérieurement, ces différences de sous-unités sont importantes pour la génération des phénomènes de plasticité synaptique. De manière intéressante, les récepteurs NMDA sont localisés au niveau synaptique mais aussi au niveau extrasynaptique (Zhou et al., 2013). Bien qu'il fût considéré que la nature de la sous-unité GluN2 régisse la localisation du récepteur (GluN2B extrasynaptique et GluN2A synaptique), des résultats récents remettent en cause cette vision en montrant l'expression des deux types de récepteurs à la fois au niveau synaptique et extrasynaptique (Petralia et al., 2005; Thomas et al., 2006). Les récepteurs NMDA extrasynaptiques sont particulièrement importants dans les mécanismes d'excitotoxicité (Hardingham et al., 2002) mais certains résultats suggèrent qu'ils pourraient aussi participer à la plasticité synaptique (Liu et al., 2013).

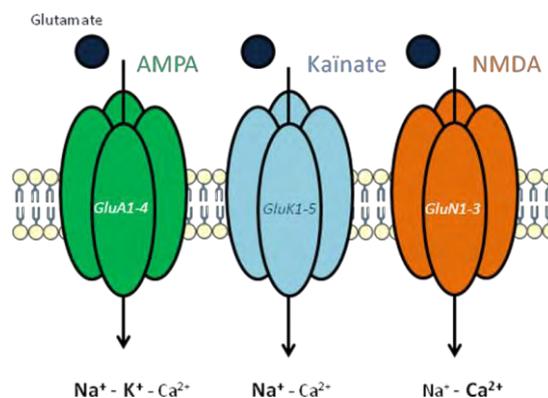


Figure 12 : Représentation des récepteurs ionotropiques. Les récepteurs AMPA, composés des sous-unités GluA1-4, les récepteurs kainates formés des sous-unités GluK1-5, et les récepteurs NMDA, composés des sous-

unités GluN1-3 sont activés par liaison au glutamate et permettent l'entrée d'ions au sein de la cellule. Les récepteurs AMPA sont préférentiellement perméables aux ions Na^+ et K^+ , les récepteurs kainates aux ions Na^+ et les récepteurs NMDA aux ions Ca^{2+} .

B- Les différentes formes de plasticité synaptique

Tous les types de synapses, et en particulier les synapses glutamatergiques, présentent cette fonctionnalité primordiale d'adaptation du signal transmis en fonction des stimuli. Ainsi, les synapses glutamatergiques possèdent la capacité d'augmenter ou de diminuer leur transmission synaptique suivant les stimuli qu'elles reçoivent. Depuis Hebb, qui, pour la première fois émit l'hypothèse que la synchronisation de l'activité pré et postsynaptique d'une synapse engendrait une augmentation de la transmission du signal au niveau de cette synapse (Hebb, 1949), de nombreuses formes de plasticité ont été décrites en fonction du type de synapses impliquées mais aussi suivant la région cérébrale étudiée. Dans cette thèse, je me focaliserai sur les formes de plasticités hippocampique et corticale faisant appel aux récepteurs au glutamate.

L'hypothèse de Hebb se focalisait sur la plasticité au niveau de la synapse et donna naissance aux phénomènes de plasticité synaptique qui s'intéressent à l'adaptation d'une synapse en tant qu'entité. Mais pour assurer un fonctionnement adéquat du réseau neuronal, de nouvelles formes de plasticité ont été décrites tenant compte de l'activité antérieure de la synapse (méta-plasticité) mais aussi du neurone, avec l'ensemble de ses synapses et du réseau qui lui est associé (l'ajustement synaptique). Ces formes de plasticité dépassent le cadre de cette thèse et ne seront donc pas abordées ici.

1- La plasticité synaptique

La plasticité synaptique correspond à la capacité d'une synapse à renforcer ou affaiblir sa force de transmission synaptique suivant les stimuli qu'elle reçoit. Ce phénomène est proposé comme la base cellulaire de la mémoire et de l'apprentissage comme nous le verrons en fin de ce paragraphe. Il existe deux grandes formes de plasticité synaptique : la potentialisation à long terme ou LTP, qui va induire un renforcement de la transmission synaptique, et la dépression à long terme ou LTD, qui permet une diminution de la transmission synaptique. Ces phénomènes sont appelés à s'inscrire dans la durée et les phases tardives de LTP notamment font généralement intervenir la synthèse de

nouvelles molécules permettant un maintien de la potentialisation. Je ne décrirai dans cette thèse que les formes les plus étudiées de LTP/LTD dépendantes des différents récepteurs au glutamate.

a- Potentialisation à long terme

La potentialisation à long terme, ou la capacité du neurone à augmenter sa transmission synaptique suite à une stimulation particulière a été décrite dans de nombreuses régions du cerveau (Lynch, 2004). Cependant, une grande majorité des études s'intéresse à la LTP au niveau de l'hippocampe où cette dernière est particulièrement robuste. La LTP fait appel à différentes voies suivant sa localisation. Au niveau de la CA1, la LTP majoritaire est NMDA-dépendante (Collingridge et al., 1983) alors qu'au niveau des fibres moussues, la potentialisation est NMDA-indépendante (Nicoll and Schmitz, 2005). Ceci met en évidence que la forme et la mise en place de la potentialisation est dépendante de la région cérébrale et donc des propriétés des neurones étudiés.

a.1- Potentialisation dépendante des récepteurs NMDA

La LTP dépendante des récepteurs NMDA a été la première forme de plasticité décrite et reste aujourd'hui la forme la plus étudiée (Bliss and Lomo, 1973). Elle fait appel à l'activation des récepteurs NMDA puisque le blocage de ces derniers par des antagonistes empêche la mise en place de la LTP (Collingridge et al., 1983). Elle est classiquement obtenue par une stimulation à haute fréquence mais de nombreux protocoles d'inductions électrique et chimique ont été décrits depuis (Albensi et al., 2007; Molnár, 2011). Les propriétés d'activation des récepteurs NMDA sont particulièrement intéressantes au regard de l'hypothèse de Hebb. En effet, pour être activés, les récepteurs NMDA requièrent la liaison du glutamate (signal d'activation présynaptique) et la dépolarisation membranaire postsynaptique afin de libérer le canal de l'ion bloqueur Mg^{2+} (signal d'activation postsynaptique). Ainsi les récepteurs NMDA sont sensibles à l'associativité entre l'activité des neurones pré et postsynaptiques, pré requis pour la mise en place d'une potentialisation. Bien qu'encore un sujet de débat, cette forme de LTP se caractérise par des modifications au niveau postsynaptique (bien acceptées) mais aussi par des modifications présynaptiques (plus controversées) (Bliss and Collingridge, 2013). Au niveau postsynaptique, la LTP engendre une augmentation de la transmission des récepteurs AMPA et NMDA alors qu'au niveau présynaptique, elle provoquerait une

augmentation de la probabilité de libération de neurotransmetteurs (Errington et al., 2003), tout cela concourant au renforcement de la transmission synaptique. Pour qu'il y ait un maintien dans le temps de cette potentialisation, la LTP engendre l'activation de kinases qui vont alors induire le recrutement synaptique de récepteurs AMPA et activer des facteurs de transcription permettant la synthèse de nouvelles molécules qui vont stabiliser la synapse dans son état potentialisé (Bliss and Collingridge, 1993; Nguyen et al., 1994).

a.1.1- Potentialisation des récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA sont des récepteurs extrêmement mobiles dont le trafic est hautement régulé grâce à des protéines interagissant spécifiquement avec certaines sous-unités (Anggono and Huganir, 2012). La régulation des récepteurs AMPA est un mécanisme majeur pour expliquer les changements de transmission synaptique observés pendant la LTP (Shepherd and Huganir, 2007). En effet, l'induction de la LTP par activation des récepteurs NMDA, que ce soit électriquement ou chimiquement, résulte en une augmentation de la transmission des récepteurs AMPA ainsi qu'une augmentation du nombre de récepteurs AMPA au niveau synaptique (Hayashi et al., 2000; Shi et al., 2001). Il apparaît que l'activation de la CaMKII, elle-même induite par l'activation des récepteurs NMDA soit primordiale pour l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA synaptiques (Appleby et al., 2011). Il semble que la LTP provoque une augmentation de l'exocytose des récepteurs AMPA (Kessels and Malinow, 2009), engendrant leur insertion membranaire au niveau pérисynaptique (Yudowski et al., 2007) mais aussi directement au niveau synaptique (Patterson et al., 2010). Par des mécanismes de diffusion latérale, les récepteurs AMPA sont alors capturés au niveau des synapses, augmentant ainsi le nombre de récepteurs AMPA activables par le glutamate, libéré dans la fente synaptique. Un autre mécanisme pouvant participer à la potentialisation des récepteurs AMPA est l'augmentation de leur conductance induite suite à la phosphorylation de la Serine 831 par la CaMKII (Barria et al., 1997; Derkach et al., 1999).

a.1.2- Potentialisation des récepteurs NMDA

Bien que moins étudié que les effets de la LTP sur la transmission médiée par les récepteurs AMPA, des études ont montré qu'il y avait aussi une régulation de la transmission médiée par les récepteurs NMDA lors de la LTP (Muller and Lynch, 1988). Ainsi, des protocoles d'induction (généralement assez forts) de la LTP au niveau hippocampique induisent à la fois une potentialisation des récepteurs AMPA et NMDA (Aniksztejn and Ben-Ari, 1995). Il semble que lorsque ces protocoles d'induction sont plus faibles, ils n'induisent alors que la potentialisation des récepteurs AMPA (Selig et al., 1995). A cause de ces résultats contradictoires et du fait que les récepteurs NMDA ont longtemps été considérés comme peu mobiles, l'effet de la LTP sur la transmission NMDA a été éclipsé au profit d'études sur la transmission AMPA. Cependant, de nombreuses études ont depuis montré que les récepteurs NMDA sont mobiles (Groc et al., 2004, 2006, 2007; Köhr, 2007) et que, comme les récepteurs AMPA, leur dynamique est régulée par l'activité synaptique, mais selon des mécanismes différents de ceux mis en jeu pour les récepteurs AMPA (Peng et al., 2010). Il est généralement accepté que la LTP des récepteurs NMDA se déroule secondairement à celle des récepteurs AMPA (Watt et al., 2004), mais l'étude de la nécessité d'une LTP des récepteurs AMPA pour la LTP des récepteurs NMDA au sein de ces synapses reste en suspens (Hunt and Castillo, 2012).

a.2- Potentialisation indépendante des récepteurs NMDA

Contrairement à ce qui a pu être observé au niveau de la CA1 et d'autres synapses du SNC, il a été montré que l'induction de la LTP au niveau des fibres moussues de l'hippocampe était indépendante de l'activation des récepteurs NMDA (Harris and Cotman, 1986) alors que ces neurones expriment les récepteurs NMDA (Watanabe et al., 1998) et présentent un courant NMDA (Jonas et al., 1993). Il semble aussi que les voies moléculaires classiquement décrites dans la LTP dépendante des récepteurs NMDA ne soient pas présentes au niveau des fibres moussues (Nicoll and Schmitz, 2005). De plus il semble que l'entrée de calcium au niveau postsynaptique ne soit pas un élément majeur de la mise en place de cette forme de LTP mais qu'une entrée de calcium au niveau présynaptique soit importante (Nicoll and Schmitz, 2005). L'induction de la LTP au niveau des fibres moussues entraîne une augmentation de l'AMPC et une activation de la PKA au niveau présynaptique qui conduiraient à une augmentation de l'exocytose des vésicules de neurotransmetteurs (Huang et al., 1994). Les récepteurs

mGluR et kaïnates ont tous deux été proposés comme récepteurs inducteurs de cette LTP. Cependant, les résultats obtenus avec les récepteurs mGluR sont très différents suivant les études et n'ont jamais permis d'atteindre un consensus quant au rôle de ces récepteurs dans la LTP indépendante des récepteurs NMDA (Bashir et al., 1993; Hsia et al., 1995). De même, les études s'intéressant au rôle des récepteurs kaïnates dans la LTP ont mis en évidence un rôle de ces récepteurs dans la LTP des fibres moussues mais n'ont pas permis de mettre en évidence leur caractère essentiel pour l'induction de cette forme de LTP (Schmitz et al., 2003). Encore aujourd'hui, la question de la localisation pré ou postsynaptique de l'induction de la LTP des fibres moussues est un sujet controversé (Galván et al., 2011). Une possibilité est que cette forme de LTP soit induite simultanément au niveau pré et postsynaptique.

b- Dépression à long terme

La dépression à long terme ou LTD représente le pendant de la LTP. Alors que cette dernière renforce la transmission synaptique, la LTD affaiblit la transmission synaptique. Comme pour la LTP, il existe plusieurs types de LTD faisant intervenir des voies de signalisation différentes ayant lieu dans des régions différentes du cerveau. On trouve des formes de LTD dépendantes des récepteurs NMDA notamment au niveau de la CA1 de l'hippocampe mais aussi des formes dépendantes des mGluRs, exprimées dans de nombreuses régions comme le cervelet, l'hippocampe et le néocortex.

b.1- Dépression dépendante des récepteurs NMDA

La LTD dépendante des récepteurs NMDA est induite par une stimulation à basse fréquence de la synapse (Dudek and Bear, 1992). Comme la LTP, elle requiert l'activation des récepteurs NMDA et engendre une entrée de Ca^{2+} au niveau postsynaptique (Mulkey and Malenka, 1992). Comment une entrée de calcium peut engendrer une potentialisation dans un cas et une dépression dans l'autre ? La réponse vient du niveau de l'entrée de calcium. Lors d'une LTD, l'entrée de calcium apparaît moins importante que lors d'une LTP. Ainsi, selon le niveau de calcium, les voies de la LTP ou LTD seront préférentiellement activées (Ismailov et al., 2004). Contrairement à la LTP qui requiert l'activation de protéines kinases, la LTD nécessite l'activation de protéines phosphatases (Lee, 2006). Une hypothèse serait que l'affinité des phosphatases pour le calcium soit supérieure à celle des kinases, expliquant

l'induction préférentielle de la LTD lors d'une faible entrée de calcium au sein du neurone postsynaptique. Les mécanismes de la LTD sont antagonistes à ceux de la LTP, ainsi la LTD entraîne une diminution de la transmission par les récepteurs AMPA via une diminution du nombre de récepteurs AMPA à la synapse (Lee et al., 2002) et leur déphosphorylation, ce qui diminue ses capacités de conductance (Lee et al., 2000). En plus d'une action sur la transmission AMPA, la LTD induit aussi des modifications de la transmission NMDA (Hunt and Castillo, 2012). Le maintien de la LTD fait appel à la dégradation de certaines protéines (comme PSD95) (Colledge et al., 2003) mais aussi à la synthèse locale de nouvelles molécules (Sajikumar and Frey, 2003).

b.2- Dépression dépendante des récepteurs mGluR

Une autre forme majeure de LTD qui ne fait pas intervenir l'activation des récepteurs NMDA a été décrite (Lüscher and Huber, 2010) : la LTD dépendante des récepteurs mGluR. D'abord décrite dans le cervelet, cette forme de plasticité a depuis été identifiée dans d'autres régions (Bellone et al., 2008). Cette LTD fait appel à l'activation des récepteurs mGluR du groupe I soit électriquement (stimulation basse fréquence prolongée) soit chimiquement (agoniste DHPG) (Lüscher and Huber, 2010). L'activation des mGluR va entraîner une augmentation de la concentration en calcium dans le neurone postsynaptique, notamment via les stocks intracellulaires du réticulum endoplasmique, ainsi que l'activation de la PKC (Kano et al., 2008), aboutissant à l'endocytose des récepteurs AMPA et à la diminution prolongée du nombre de récepteurs AMPA au niveau postsynaptique (Moult et al., 2006; Steinberg et al., 2004a). Bien que les deux formes de LTD décrites ici aboutissent à une diminution de nombre de récepteurs AMPA au niveau postsynaptique, il semble que les mécanismes mis en œuvre soient distincts et fassent intervenir des acteurs moléculaires différents (Lüscher and Huber, 2010).

2- La plasticité comme mécanisme cellulaire de la mémoire

L'hypothèse que des changements dans la force des connexions synaptiques soient un mécanisme cellulaire de l'apprentissage et de la mémoire a été proposée par Cajal au début du siècle dernier. Hebb, en 1949, la reformula en un modèle synaptique : si deux neurones sont activés simultanément, la force des connexions entre ces deux neurones sera augmentée. Depuis, le modèle de potentialisation à long terme apparaît comme le meilleur et le plus étudié des modèles cellulaires de

l'apprentissage et de la mémoire (Lynch, 2004). Ce lien entre LTP et mémoire découle des nombreux parallèles qui peuvent être faits entre ces deux phénomènes. Tout d'abord, la LTP a des caractéristiques de coopérativité, d'associativité (entre les deux neurones impliqués), de spécificité de stimulus et se présente comme un phénomène durable dans le temps (Bliss and Collingridge, 1993). Certaines formes d'apprentissage et de mémorisation présentent les mêmes caractéristiques. De plus, la LTP a été très largement décrite dans l'hippocampe, structure essentielle pour l'acquisition de la mémoire (Lynch, 2004). Par ailleurs, l'activité en bouffées rythmiques à haute fréquence qui induit la LTP correspond au rythme thêta qui survient naturellement dans l'hippocampe pendant l'activité exploratoire (Greenstein et al., 1988). Enfin, plusieurs changements décrits dans les phénomènes de LTP ont aussi été décrits pendant l'acquisition de la mémoire et certains inhibiteurs de la LTP bloquent aussi l'apprentissage et la mémoire dépendant de l'hippocampe (Lynch, 2004; Morris et al., 1986). L'ensemble de ces similitudes moléculaires et physiologiques entre la LTP, l'apprentissage et la mémoire sous-tend le fait que la LTP soit un bon modèle cellulaire de la mémoire. Une étude a notamment permis de montrer *in vivo* qu'un simple entraînement au paradigme d'évitement inhibiteur (one-trial inhibitory avoidance learning) engendrait la génération d'une LTP, au sein de l'hippocampe, similaire à celle obtenue lors d'une stimulation à haute fréquence (Whitlock et al., 2006). Cependant les autres formes de plasticité semblent elles aussi importantes dans l'apprentissage et la mémoire. Des études empiriques et computationnelles ont mis en évidence que l'encodage de la mémoire se faisait grâce à la création d'un réseau neuronal actif unique (via la combinaison de phénomènes de renforcement et d'affaiblissement des connexions synaptiques) (Kemp and Manahan-Vaughan, 2007). Ainsi, la dépression à long terme dépendant des récepteurs mGluR semble affecter les phénomènes de mémoire et d'apprentissage (Lüscher and Huber, 2010). De plus, la métaplasticité semble être un mécanisme cellulaire régulant la déstabilisation et la reconsolidation de la mémoire (Finnie and Nader, 2012). Au niveau moléculaire, l'hypothèse est que les phénomènes de plasticité induisent des modifications au niveau synaptique qui représenteraient l'empreinte moléculaire et le stockage de l'information. Deux molécules, dont l'activité est modulée par la plasticité, sont actuellement des candidats privilégiés pour représenter l'empreinte moléculaire de la mémoire, il s'agit de la CaMKII

(Ca²⁺/calmoduline kinase II) et de PKMζ (protéine kinase M zeta). Ces molécules seront décrites plus précisément dans le chapitre suivant.

C- Mécanismes moléculaires de la potentialisation dépendante des récepteurs NMDA.

Nous avons vu précédemment que la plasticité synaptique au niveau des synapses glutamatergiques adoptait des formes diverses, faisant intervenir plusieurs types de récepteurs suivant le stimulus, les neurones impliqués et la direction de la plasticité. En plus de celles décrites, d'autres formes de plasticité interviennent au niveau des synapses inhibitrices ou faisant intervenir l'activation d'autres récepteurs que ceux du glutamate. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la LTP dépendante des récepteurs NMDA qui reste le modèle dont les voies moléculaires sont les plus étudiées. Dans cette partie, je ne décrirai donc que les mécanismes postsynaptiques importants pour cette plasticité, même si j'apporterai quelques éléments sur la LTD dépendante des récepteurs NMDA qui représente le pendant à la LTP.

1- Activation des récepteurs NMDA

La première étape lors de la mise en place d'une LTP au niveau des synapses glutamatergiques est l'activation des récepteurs NMDA. Elle nécessite deux signaux, l'un présynaptique et l'autre postsynaptique. Mais cette activation n'est possible que grâce à la localisation synaptique de ces récepteurs et nous verrons que la composition des récepteurs NMDA semble jouer un rôle important pour la LTP (figure 13).

La composition des récepteurs NMDA, selon la nature des sous-unités GluN2, confère aux récepteurs des propriétés différentes (Paoletti, 2011) et de nombreuses études ont permis de définir la contribution des sous-unités GluN2A et GluN2B dans l'induction de la LTP (Paoletti et al., 2013). L'association d'études génétiques et pharmacologiques a mis en évidence que la LTP serait induite préférentiellement par les récepteurs contenant du GluN2A. En effet, les souris déficientes pour le GluN2A ou déficientes pour sa partie intracellulaire montrent une diminution, voire une absence de LTP (Sakimura et al., 1995; Sprengel et al., 1998; Zhao and Constantine-Paton, 2007). Au contraire,

l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de GluN2B semble bloquer l'induction de la LTD sans affecter la LTP (Liu et al., 2004a). Cependant, de nombreuses études ont remis en cause cette ségrégation forte (GluN2A = LTP et GluN2B = LTD) en montrant l'importance de la sous-unité GluN2B dans l'induction de la LTP (von Engelhardt et al., 2008; Gardoni et al., 2009; Wang et al., 2009; Weitlauf et al., 2005). Malgré le fait que ces contradictions puissent être expliquées par des différences dans la région ou le stade développemental étudié ainsi que par le manque de spécificité de certains inhibiteurs utilisés, il semble actuellement que ces deux sous-unités soient importantes pour l'induction de la LTP avec cependant une implication différente (Foster et al., 2010). Il semble que l'activation des récepteurs GluN2A soit importante pour permettre une entrée massive de calcium dans le neurone postsynaptique et que la partie intracellulaire de GluN2B soit essentielle au recrutement des molécules requises pour la LTP (Foster et al., 2010; Paoletti et al., 2013). Cette hypothèse permettrait de réconcilier les différences entre les études pharmacologiques et génétiques.

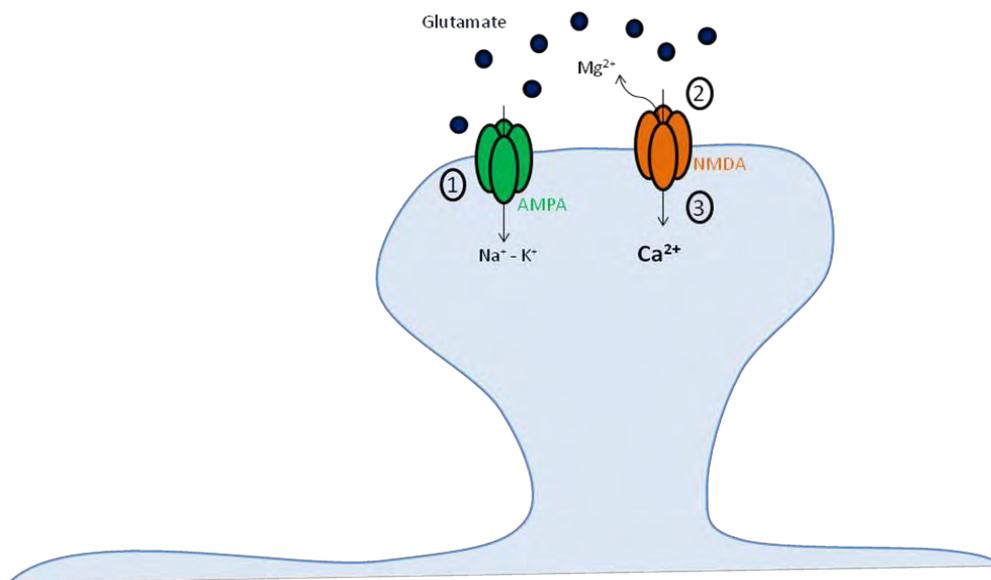


Figure 13 : Représentation de l'activation des récepteurs NMDA durant la LTP. La libération de glutamate par l'extrémité pré-synaptique concomitante à la dépolarisation du neurone postsynaptique par activation des récepteurs AMPA synaptiques (1) engendre la l'activation des récepteurs NMDA par libération de l'ion Mg²⁺ bloqueur (2) et permet une entrée massive de calcium dans la cellule (3).

Le domaine C-terminal des sous-unités GluN2 contient des domaines PDZ nécessaires pour leur interaction avec les protéines d'échafaudage (MAGUK et Shank notamment) et donc pour leur

localisation synaptique. En effet, les souris déficientes pour la partie C-terminale du GluN2A présentent une diminution de la localisation synaptique du GluN2A et un défaut d'induction de la LTP (Köhr et al., 2003). La sous-unité GluN2B interagit préférentiellement avec Ras-GRF1 (Ras-protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1) (Krapivinsky et al., 2003) et la protéine Ras-Gap via SAP102 (synapse associated protein 102) (Kim et al., 1998). Ces associations semblent affecter l'induction de la plasticité (Zhu et al., 2002). De même, il a été montré que GluN2B interagissait avec une plus forte affinité avec la CaMKII que GluN2A (Gardoni et al., 1999; Strack and Colbran, 1998; Strack et al., 2000). Nous verrons par la suite que l'activation et l'interaction de la CaMKII avec les sous-unités GluN2 est un évènement majeur dans l'induction de la LTP (Lisman et al., 2002). De son côté GluN2A interagit préférentiellement avec PSD95 (postsynaptic density protein 95) (Sans et al., 2000) et avec la nitric oxyde (NO)-synthase (Al-Hallaq et al., 2007), permettant de proposer un rôle du NO comme rétro-messager induisant des modifications présynaptiques lors de la LTP (Prast and Philippu, 2001). La spécificité d'interaction des GluN2 avec PSD95 et SAP102 a été remise en cause par des études biochimiques montrant une interaction similaire des deux sous-unités avec ces deux protéines MAGUK (Al-Hallaq et al., 2007), mais leur action sur chaque sous-unité semble différente (Elias and Nicoll, 2007). En effet, l'absence de PSD95 augmente la proportion de GluN2A dans les radeaux lipidiques alors que celle de GluN2B n'est pas affectée (Delint-Ramirez et al., 2010) (figure 14).

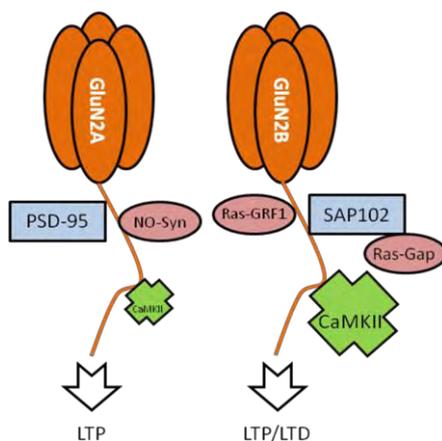


Figure 14 : Représentation des interactions spécifiques des sous-unités GluN2A et GluN2B et leurs implications dans la plasticité. La sous-unité GluN2A participe à la LTP alors que la sous-unité GluN2B est importante pour la LTP et la LTD. Elles présentent des spécificités d'interaction, PSD-95 et NO-synthase pour GluN2A contre SAP102 et Ras-GRF1 pour GluN2B. La CaMKII, protéine importante pour la plasticité interagit avec les deux sous-unités mais préférentiellement avec GluN2B.

2- **Activation des voies de signalisation**

L'activation des récepteurs NMDA lors de l'induction de la LTP va engendrer l'entrée massive de calcium au sein du neurone postsynaptique. La liaison du calcium avec la calmoduline (Faas et al., 2011) va alors enclencher l'activation de plusieurs kinases importantes pour la mise en place de la LTP.

a- Recrutement et phosphorylation de la CaMKII

Il existe quatre isoformes de CaMKII (α , β , γ , δ) mais les isoformes α et β représentent la vaste majorité de la CaMKII corticale avec un rapport $\alpha:\beta$ de 3:1 (Erondu and Kennedy, 1985) et constituent une des protéines les plus abondantes de la PSD (Feng et al., 2011). Elle est composée d'un domaine catalytique, d'un domaine central d'autorégulation de liaison à $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ($\text{Ca}^{2+}/\text{calmoduline}$) et d'un domaine d'association lui permettant de s'agencer en holoenzyme (12 sous-unités). La CaMKII α est un acteur majeur de la LTP et de la mémoire puisque c'est la première molécule qui a été impliquée à la fois dans la LTP, l'apprentissage et la mémoire (Silva et al., 1992) (figure 15 A,B). De plus, toutes les études manipulant les propriétés de la CaMKII ont mis en évidence des défauts à la fois au niveau de la LTP, de l'apprentissage et de la mémoire (Coultrap and Bayer, 2012). L'induction de la LTP provoque la translocation rapide de la CaMKII active au niveau de la PSD (Shen and Meyer, 1999). En absence de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, la CaMKII se trouve à l'état inactif. Lors de l'induction de la LTP, la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se lie au niveau du domaine central de la CaMKII et modifie ainsi sa conformation (Hudmon and Schulman, 2002). La CaMKII alors activée va s'autophosphoryler au niveau de la thréonine 286 ce qui lui permet d'augmenter son affinité pour $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ mais aussi de conserver un état actif non saturé même après sa dissociation de la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Coultrap et al., 2010; Meyer et al., 1992) (figure 15 C). L'activation de la CaMKII peut être inhibée, soit par son autophosphorylation sur les thréonines 305/306 au niveau du domaine de liaison avec $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Jama et al., 2009; Rellos et al., 2010), soit par des phosphatases (PP1/PP2A) (Tao-Cheng et al., 2005). Ces mécanismes de régulation sont importants puisque la phosphorylation en T305/306 et la phosphatase PP1 favorisent l'induction de la LTD (Elgersma et al., 2002; Thiels et al., 2000).

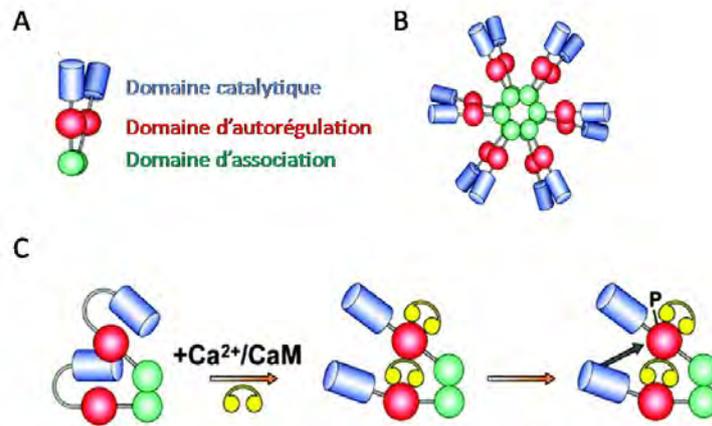


Figure 15 : Représentation de la CaMKII et de son activation. (A) Dimère de CaMKII composé d'un domaine catalytique, d'un domaine d'autorégulation, sur lequel va se lier la Ca^{2+}/CaM , et d'un domaine d'association. (B) Représentation d'une holoenzyme de CaMKII issue de l'association de 12 monomères de CaMKII. (C) En conditions basales, le domaine catalytique de la CaMKII est inaccessible, l'enzyme est donc inactive. L'activation de la Ca^{2+}/CaM par le calcium permet sa fixation au niveau du domaine d'autorégulation de la CaMKII entraînant l'ouverture de l'enzyme et la libération du domaine catalytique. La libération du domaine catalytique va engendrer l'autophosphorylation de la CaMKII sur la thréonine 286. Adapté de Swaminathan et Anderson, 2011.

La translocation de la CaMKII vers la PSD, résulte en sa liaison aux récepteurs NMDA, préférentiellement avec la sous-unité GluN2B (Leonard et al., 1999; Strack and Colbran, 1998). Cette étape est particulièrement importante car elle permet de conserver l'état actif de la CaMKII. Il a été observé que la LTP induisait une augmentation, persistante dans le temps, de l'interaction entre la CaMKII, notamment phosphorylée, et les récepteurs NMDA (Appleby et al., 2011; Bayer et al., 2006). Le blocage ou la diminution de l'interaction entre CaMKII et les récepteurs NMDA induit une diminution importante (environ 50%) de la LTP (Halt et al., 2012; Pi et al., 2010) et l'application d'inhibiteurs spécifiques de cette interaction pendant la LTP contrecarre cette dernière (Sanhueza et al., 2011) (figure 16). Beaucoup d'intérêt est porté au complexe NMDA/CaMKII car il est proposé que ce complexe représente la mémoire moléculaire du stockage d'information (Sanhueza and Lisman, 2013). La CaMKII activée va alors phosphoryler les récepteurs AMPA et leurs protéines associées et engendrer ainsi la potentialisation de la transmission AMPA (Lisman et al., 2012).

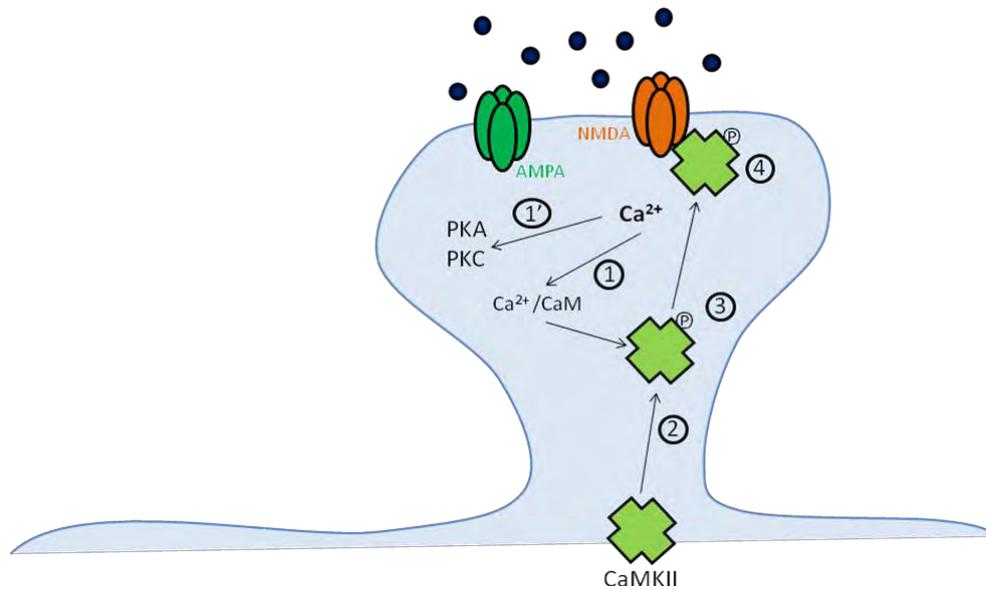


Figure 16 : Représentation de l'activation des kinases lors de la LTP. L'entrée massive de calcium par les récepteurs NMDA entraîne : la liaison du Ca^{2+} à la calmoduline (Ca^{2+}/CaM), et ainsi son activation (1), mais aussi l'activation des kinases PKA et PKC (1'). Il y a alors translocation à la synapse de la CaMKII (2) qui va être activée par liaison avec la Ca^{2+}/CaM (3). La CaMKII activée va s'autophosphoryler (3) et interagir avec les sous-unités GluN2 des récepteurs NMDA (4).

b- Phosphorylation de PKA et PKC

La CaMKII n'est pas la seule kinase à être activée lors de l'induction de la LTP. Les protéines PKA et PKC sont également recrutées même si leur action reste moins connue que celle de la CaMKII (figure 16).

La PKA est une kinase possédant une sous-unité catalytique et une sous-unité régulatrice. Suite à la liaison de l'AMPc sur la sous-unité régulatrice, la PKA devient activée (Beebe, 1994). La PKA semble jouer un rôle dans la LTP puisque l'application d'inhibiteurs de la PKA réduit l'induction de la LTP dans l'hippocampe (Blitzer et al., 1998; Otmakhova et al., 2000; Skeberdis et al., 2006). De plus, la LTP peut être induite via un traitement pharmacologique permettant l'augmentation d'AMPc (Otmakhov et al., 2004a, 2004b). Cependant, l'implication de la PKA dans la signalisation de la LTP semble plus importante chez le jeune animal que chez l'animal adulte (Yasuda et al., 2003). Néanmoins, l'activation de la PKA est importante pour le trafic et l'augmentation de la probabilité d'ouverture des récepteurs AMPA et donc pour la potentialisation de la transmission AMPA mise en

place durant la LTP (Banke et al., 2000; Oh et al., 2006), notamment grâce à sa phosphorylation au niveau de la sérine 845.

La PKC est activée par l'action synergique du calcium et de la DAG issue du clivage du PIP2 (phosphatidyl-inositol-diphosphate) par la PLC. Son activation est surtout médiée par l'activation des récepteurs mGluR (Lüscher and Huber, 2010). Cependant, la PKC a aussi été impliquée dans la LTP dépendante des récepteurs NMDA. Il a été montré que l'activité de la PKC était importante pour l'induction de la LTP dans l'hippocampe (Collingridge et al., 2004; Moriguchi et al., 2009). La PKC semble intervenir sur le trafic des récepteurs AMPA et NMDA, important pour la potentialisation de la transmission pendant la LTP (Lin et al., 2009).

3- *Phosphorylation et recrutement des récepteurs AMPA*

La réponse rapide du neurone postsynaptique lors de l'induction de la LTP, se caractérisant par une augmentation des mEPSCs (miniature excitatory postsynaptic current), est due principalement au recrutement et aux modifications des propriétés des récepteurs AMPA synaptiques (Shepherd and Huganir, 2007).

L'importance du recrutement synaptique des récepteurs AMPA dans la réponse à la LTP vient d'études sur les synapses silencieuses. Ces synapses sont qualifiées de silencieuses car elles ne permettent pas de transmission synaptique basale du fait de l'absence de récepteurs AMPA (malgré la présence de récepteurs NMDA) (Isaac, 2003). L'induction de la LTP induit la conversion de ces synapses silencieuses en synapses fonctionnelles exprimant donc des récepteurs AMPA (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995). Ces études sont des éléments forts pour montrer que la LTP est induite au niveau postsynaptique et que les récepteurs AMPA sont des éléments majeurs dans la potentialisation. Les animaux déficients pour la sous-unité GluA1 présentent une lacune de LTP (Zamanillo et al., 1999) alors que les animaux déficients en GluA2 présentent une LTP augmentée (Jia et al., 1996), suggérant un rôle différentiel des deux sous-unités dans la LTP. Il a été montré que la LTP induisait l'incorporation synaptique de récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA1 (Hayashi et al., 2000; Shi et al., 2001), notamment d'homomères GluA1 (Hayashi et al., 2000). Cependant d'autres études

contredisent ces résultats en montrant l'intégration synaptique de récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA2 (Adesnik and Nicoll, 2007; Gray et al., 2007). D'autres études semblent concilier ces résultats en montrant que la LTP induit une incorporation rapide d'homomères GluA1 remplacés par la suite par des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA2 (Lu et al., 2007; Plant et al., 2006). De manière transitoire, l'incorporation des homomères GluA1 permet l'augmentation de la perméabilité au calcium et contribue ainsi à la stabilisation de la LTP (Plant et al., 2006).

Le nombre de récepteurs AMPA à la synapse est dépendant du niveau d'endocytose et d'exocytose de ces récepteurs au niveau de la membrane postsynaptique. Ainsi, pendant la potentialisation, il y a augmentation de l'exocytose des récepteurs AMPA permettant ainsi l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA synaptiques (Kessels and Malinow, 2009). Des études ont montré que l'intégration des récepteurs AMPA durant la LTP avait lieu au niveau pérисynaptique (l'incorporation synaptique se faisant alors par diffusion latérale) mais aussi directement au niveau de la synapse (Makino and Malinow, 2009; Patterson et al., 2010). Plusieurs molécules interagissant avec les récepteurs AMPA ont été impliquées dans le trafic de ces récepteurs durant la LTP (Anggono and Huganir, 2012; Opazo et al., 2012) (figure 17). La protéine SAP97 (synaptic associated protein 97) de la famille des protéines MAGUK, interagissant avec GluA1, est recrutée au niveau synaptique par la CaMKII durant la LTP et apparaît comme une molécule importante pour le trafic de GluA1 (Mauceri et al., 2004). Cependant, les animaux déficients pour SAP97 ne présentent pas de défaut de LTP (Howard et al., 2010). Etant donné la redondance fonctionnelle des protéines MAGUK, on ne peut pas exclure un effet compensatoire chez les animaux déficients. La protéine 4.1N interagit directement avec la sous-unité GluA1 dont elle régule l'expression membranaire (Shen et al., 2000). Il a été montré que l'absence de cette protéine induisait une diminution de la fréquence d'insertion membranaire de GluA1 et affectait la maintenance de la LTP (Lin et al., 2009). La protéine PICK1 (protein interacting with protein kinase C alpha) interagit préférentiellement avec la sous-unité GluA2 et médie le retrait synaptique des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA2 (Hanley, 2008). Son rôle dans la LTP semble complexe et dépend du protocole d'induction et de l'âge des animaux utilisés (Citri et al., 2010; Volk et al., 2010). Cependant, l'absence de PICK1 empêche l'expression de la LTP au niveau

de l'hippocampe, suggérant une participation de PICK1 à ce processus (Terashima et al., 2008). Les partenaires moléculaires apparaissant comme les plus intéressants dans le trafic membranaire des récepteurs AMPA sont les TARPs (transmembrane AMPA receptor regulating protein) (Straub and Tomita, 2012). Les TARPs sont des sous-unités auxiliaires des récepteurs AMPA possédant un domaine PDZ leur permettant de s'associer aux protéines MAGUK (Dakoji et al., 2003). Il existe six formes de protéines TARPs réparties en deux groupes selon leurs modulations des propriétés et du trafic des récepteurs AMPA : les TARPs de type 1a (γ -2 ou stargazine et γ -3), de type 1b (γ -4 et γ -8) et de type 2 (γ -5 et γ -7) (Kato et al., 2008; Tomita et al., 2003). Ainsi l'absence et la surexpression de certaines TARPs (γ -8 et stargazine notamment) influencent fortement la quantité de récepteurs AMPA membranaires (Rouach et al., 2005; Schnell et al., 2002). De plus, des études ont montré l'importance de la liaison entre la stargazine et la PSD95 pour la stabilisation des récepteurs AMPA au niveau synaptique et donc pour la transmission synaptique (Bats et al., 2007; Schelle et al., 2002). De même, la phosphorylation de la stargazine par la CaMKII promeut la LTP et le trafic des récepteurs AMPA en facilitant l'interaction avec la PSD95 (Opazo et al., 2010). Ces études mettent en évidence le rôle majeur des TARPs dans le trafic des récepteurs AMPAs pendant la LTP (figure 17).

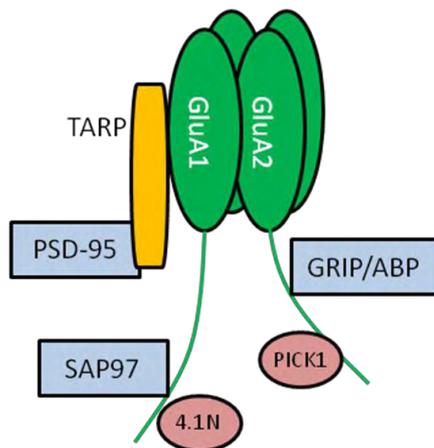


Figure 17 : Représentation des molécules interagissant avec les sous-unités des récepteurs AMPA importantes pour la LTP. La sous-unité GluA1 interagit avec la protéine SAP97 et la protéine 4.1N alors que la sous-unité GluA2 interagit avec les protéines GRIP/ABP et PICK1. Les molécules TARPs interagissant avec la protéine PSD-95 sont des sous-unités auxiliaires des récepteurs AMPA. Tous ces partenaires semblent impliqués dans le trafic des récepteurs AMPA durant la LTP et la LTD.

La CaMKII phosphoryle aussi directement la sous-unité GluA1 au niveau de la sérine 831 induisant l'augmentation de la conductance du canal (Kristensen et al., 2011). Aussi, durant la LTP le niveau de phosphorylation de GluA1 en ser831 est augmenté (Lee et al., 2000). La sous-unité GluA1 est aussi

phosphorylée par la PKA au niveau de la sérine 845 (Roche et al., 1996) et au niveau de la sérine 818 par la PKC (Boehm et al., 2006). La phosphorylation du GluA1 en 845 induit une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal (Banke et al., 2000). Ainsi, la phosphorylation de GluA1 au niveau des ser831 et ser845 potentialise les propriétés du canal ionique ce qui pourrait être un paramètre expliquant la potentialisation de la transmission AMPA durant la LTP (Benke et al., 1998). Cependant, les animaux exprimant un GluA1 où l'une des deux sérines a été remplacée par une alanine présentent une LTP normale (Lee et al., 2010a) alors que la LTP est diminuée chez les animaux chez qui les deux sites sont non phosphorylables (Lee et al., 2003). Ces résultats suggèrent que les phosphorylations au niveau des sérines 831 et 845 ne sont pas nécessaires pour l'induction de la LTP mais participent toutes deux au processus de LTP. De plus, la phosphorylation du GluA1 influe aussi sur son trafic (Lee, 2006). La phosphorylation du GluA1 en 845 par la PKA permet l'incorporation membranaire des récepteurs AMPA au niveau extrasynaptique (Oh et al., 2006). De même, la phosphorylation en ser818 par la PKC augmente l'interaction de GluA1 avec 4.1N et permet l'augmentation de l'exocytose des récepteurs AMPA au niveau synaptique et extrasynaptique (Boehm et al., 2006; Lin et al., 2009).

L'ensemble de ces études sur le trafic des récepteurs AMPA a permis de mettre en place un modèle en deux phases pour l'insertion des récepteurs AMPA durant la LTP. Dans une première étape, la phosphorylation des récepteurs AMPA par la PKA induit l'insertion des récepteurs à la membrane dans une région extrasynaptique. Dans un second temps, l'activation de la CaMKII et de la PKC entraînent la phosphorylation des récepteurs AMPA et des protéines TARPs induisant alors la capture des récepteurs AMPA au niveau synaptique. Ce modèle conduit à une augmentation de la quantité de récepteurs AMPA au niveau synaptique et à une potentialisation de leurs propriétés avec, notamment, une augmentation de leur perméabilité au Ca^{2+} permettant d'expliquer l'augmentation de la transmission AMPA durant la LTP (Derkach et al., 2007; Opazo and Choquet, 2011) (figure 18).

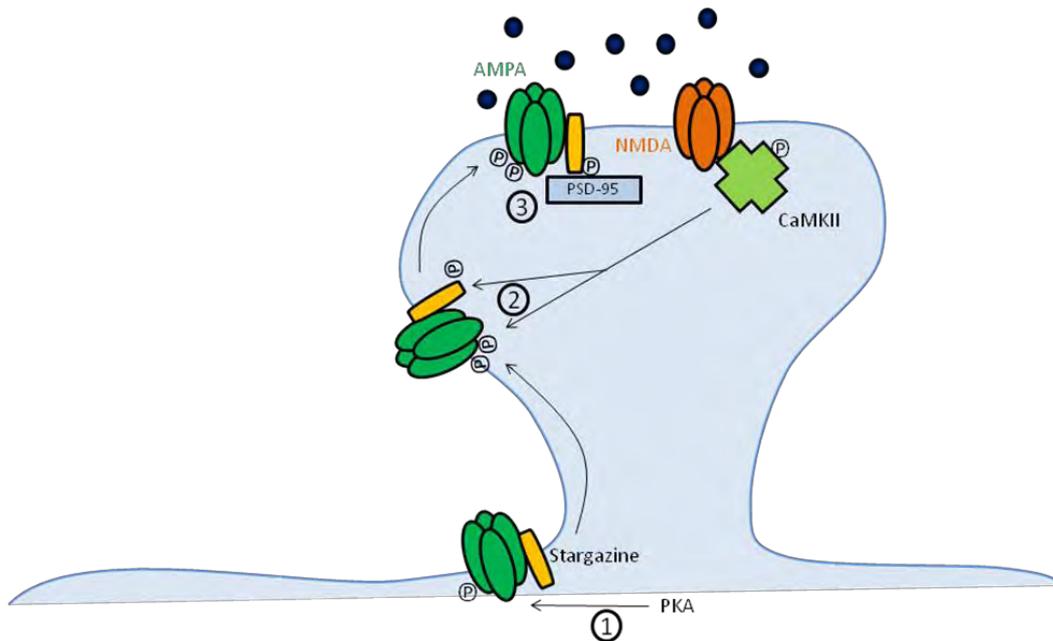


Figure 18 : Représentation de la phosphorylation et du recrutement synaptique des récepteurs AMPA durant la LTP. La sous-unité *GluA1* est phosphorylée par la PKA sur la sérine 845 (1) permettant l'insertion membranaire des récepteurs AMPA. La CaMKII activée va phosphoryler *GluA1* sur la sérine 831 mais aussi phosphoryler la stargazine (2), entraînant ainsi la capture des récepteurs AMPA au niveau synaptique et leur liaison à la protéine PSD-95 (3).

4- **Maintien de la potentialisation**

Tous les mécanismes que nous avons décrits jusqu'ici s'intéressent aux phases précoces de la LTP qui se mettent en place généralement dans la demi-heure suivant l'induction. Cependant, une des caractéristiques de la LTP est sa durée dans le temps (Abraham et al., 2002). Ainsi, d'autres mécanismes sont mis en place pour assurer la durabilité de la LTP.

La phase tardive de la LTP (L-LTP) se distingue de la phase précoce de part la nécessité de synthèse de nouvelles protéines et est associée à des changements structuraux de la synapse (Frey et al., 1988; Harris et al., 2003; Muller et al., 2002). En effet, la L-LTP est inhibée en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique et de la transcription suggérant que la synthèse de nouvelles protéines est un élément important pour le maintien de la LTP (Nguyen et al., 1994; Scharf et al., 2002). L'entrée de calcium importante durant la phase précoce active plusieurs voies de signalisation, comme nous avons vu précédemment, qui participent à la transcription/traduction de nouvelles protéines. Par exemple, la PKA est activée de façon persistante durant la L-LTP et est nécessaire pour

l'activation du facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein) (Nguyen and Woo, 2003). Mais d'autres voies sont activées et participent fortement à la L-LTP. Ainsi, l'activation de la CaMKIV (Ca²⁺/calmoduline kinase IV) et MAPK (mitogen-associated protein kinase) (notamment ERK (extracellular signal-regulated kinase)) augmente la phosphorylation de CREB lors de la LTP (Miyamoto, 2006). CREB est un facteur de transcription contrôlant l'expression de gènes contenant dans leur promoteur la séquence CRE (cAMP response element). Une fois phosphorylé, CREB est activé et se lie à CBP (CREB binding protein) pour former un facteur de transcription fonctionnel (Montminy et al., 1990). Il a été montré que la L-LTP était corrélée avec l'expression de gène dépendant de CRE (Impey et al., 1996). CREB va induire la synthèse de nouveaux ARNm qui seront acheminés à la synapse pour être traduits (Kelleher et al., 2004).

Parmi les gènes exprimés durant la L-LTP (ou EIG pour early-immediate genes), on trouve la molécule Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein ou Arg3.1) (Steward et al., 1998). Arc est une protéine associée au cytosquelette et participe notamment au trafic des récepteurs AMPA (Chowdhury et al., 2006). La synthèse de la protéine Arc est requise pour la stabilisation de la LTP (Shepherd and Bear, 2011). En effet, les souris déficientes pour Arc présentent une absence de phase tardive de la LTP alors que la phase précoce est augmentée (possiblement à cause de l'implication de Arc dans les phénomènes de métaplasticité) (Plath et al., 2006). Etant donné le lien entre Arc et le cytosquelette, il serait intéressant d'étudier l'éventuelle implication d'Arc dans les modifications morphologiques de la synapse lors de la L-LTP. En effet, la L-LTP est associée à l'expansion de la densité postsynaptique mais aussi à l'élargissement des épines dendritiques et à une augmentation du nombre d'épines (Buchs and Muller, 1996; Geinisman et al., 1991). Ces changements structuraux dépendent principalement de changements au niveau de la polymérisation de l'actine (Kim and Lisman, 1999; Krucker et al., 2000). En effet, la LTP est associée à la phosphorylation de la cofiline qui va favoriser la polymérisation de l'actine, en accord avec une augmentation de l'actine-F observée au niveau des épines dendritiques (Fukazawa et al., 2003). De plus, l'augmentation de la phosphorylation de la cofiline est associée à un élargissement de la PSD (Chen et al., 2007). De manière intéressante, une étude a montré que l'inhibition d'Arc entraînait une déphosphorylation de la

cofiline et la diminution de l'actine-F au niveau des épines dendritiques durant la LTP, suggérant une fonction de Arc dans les modifications morphologiques induites par la LTP (Messaoudi et al., 2007).

Malgré le rôle important de l'activation des kinases mentionnées précédemment pour l'induction de la L-LTP, il a été montré qu'elle n'était pas essentielle pour son maintien (Otmakhov et al., 1997). A ce jour, seule une kinase, la protéine kinase M ζ ou PKM ζ , semble essentielle pour le maintien de la phase tardive de la LTP (Ling et al., 2002). En effet, la LTP induit une augmentation persistante de PKM ζ et l'inhibition de la PKM ζ par perfusion intracellulaire avec un inhibiteur spécifique reverse la L-LTP même s'il est injecté plusieurs heures après l'induction de la LTP (Pastalkova et al., 2006). D'un point de vue fonctionnel, la PKM ζ potentialise la transmission synaptique en influant sur le nombre de récepteurs AMPA au niveau postsynaptique (Migues et al., 2010). De manière intéressante, l'inhibition de la PKM ζ *in vivo* plusieurs heures après un entraînement conduit à la perte de la mémoire lorsqu'elle est testée ultérieurement (Madroñal et al., 2010; Serrano et al., 2005). Ces études et d'autres ont suggéré que la PKM ζ serait primordiale pour la mémoire à long terme et représenterait l'empreinte moléculaire de la mémoire à long terme (Sacktor, 2012). Cependant ces résultats ont été remis en cause dernièrement par une étude montrant que la souris déficiente pour PKM ζ ne présentait pas de défaut de mémoire ni de LTP, et que l'inhibiteur utilisé dans les études précédentes avait le même effet chez la souris déficiente pour PKM ζ que chez la souris témoin (Volk et al., 2013) (figure 19).

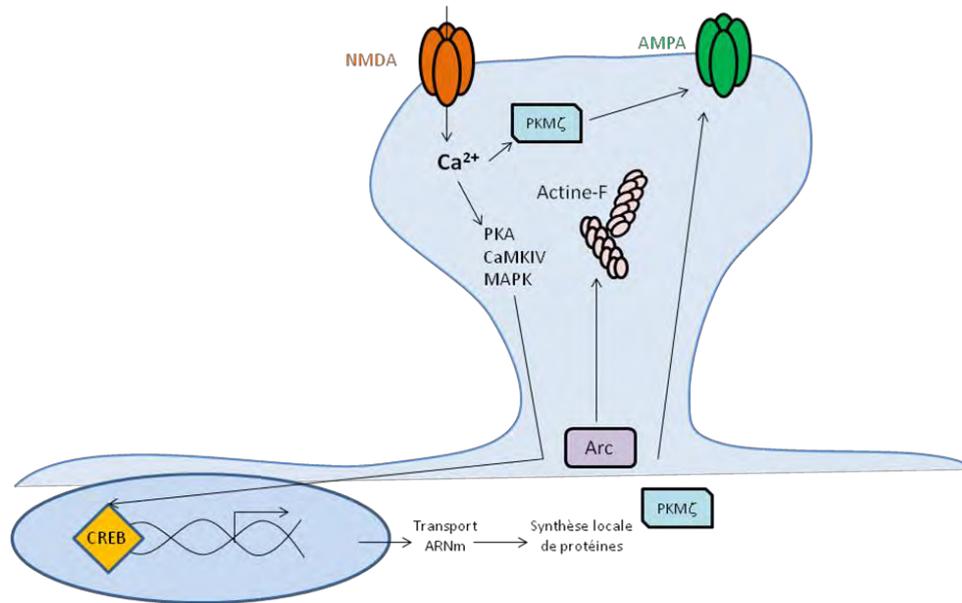


Figure 19 : Représentation de la mise en place de la phase tardive de la LTP. L'entrée massive de calcium durant la phase précoce de la LTP induit l'activation de nombreuses voies de signalisation dont la PKA, la CaMKIV et les MAPK qui vont activer le facteur de transcription CREB. Les ARNm nouvellement transcrits sont transportés au niveau de la synapse où ils sont traduits localement. Parmi les nouvelles molécules générées, la protéine Arc va agir sur l'actine et ainsi participer aux modifications morphologiques de la synapse, la protéine kinase PKM ζ va, quant à elle, influencer sur le nombre de récepteurs AMPA à la synapse. La protéine PKM ζ peut aussi être activée directement par l'activation des récepteurs NMDA.

D'autre part, plusieurs travaux ont mis en évidence un rôle majeur du facteur neurotrophique BDNF dans la plasticité synaptique et la mémoire (Bramham and Messaoudi, 2005; Minichiello, 2009). En effet, le BDNF (brain-derived neurotrophic factor) a été montré comme important pour l'induction et le maintien de la L-LTP (Bramham and Messaoudi, 2005). Notamment, il a été montré que l'apport de BDNF exogène induisait la transformation de la E-LTP (phase précoce de la LTP) en L-LTP en présence d'inhibiteurs de synthèse protéique (Lu et al., 2008; Yano et al., 2006) notamment via l'activation de la PKM ζ (Mei et al., 2011). Etant donné le doute que des études récentes ont rapporté vis-à-vis de la spécificité de l'inhibiteur utilisé contre la PKM ζ , il est possible que le BDNF n'active pas la PKM ζ mais plutôt une autre molécule bloquée par le même inhibiteur. Durant la LTP, il y a libération du BDNF endogène qui assurerait ainsi le maintien de la LTP (Pang and Lu, 2004; Pang et al., 2004). Le BDNF participerait de manière active aux changements morphologiques des épines dendritiques et à la synthèse de nouvelles protéines durant la LTP (Rex et al., 2007). En effet,

il induit l'expression de l'ARNm de Arc qui est impliqué dans les modifications morphologiques comme nous l'avons vu précédemment (Wibrand et al., 2006) (figure 20). Le maintien de la LTP reste moins bien connu que les événements précoces notamment à cause des différences entre les protocoles d'induction de la LTP.

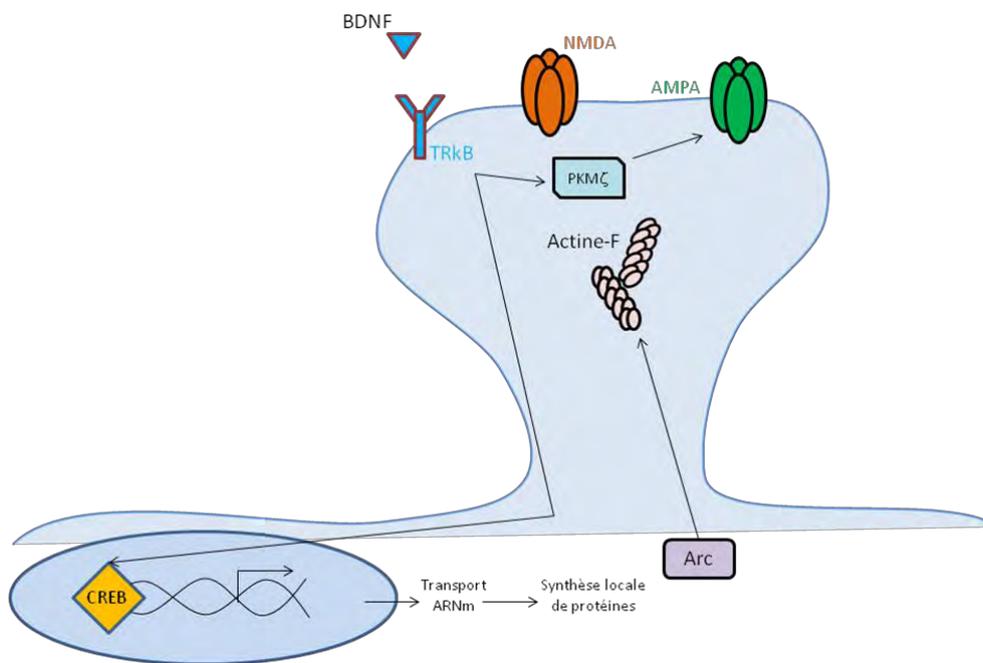


Figure 20 : Implication du BDNF dans la mise en place de la phase tardive de la LTP. *Le BDNF exogène ou libéré durant la LTP va se fixer sur les récepteurs TrkB synaptique et induire l'expression de la molécule Arc mais aussi engendrer l'activation de la PKMζ concourant ainsi au maintien de la LTP.*

III- Implication de l'immunité et de ses molécules dans le développement neuronal, l'homéostasie synaptique et les fonctions cognitives

Le système immunitaire et le système nerveux central sont deux systèmes en interaction. Au niveau cellulaire et moléculaire, les deux systèmes vont agir l'un sur l'autre notamment via la sécrétion de cytokines et de neurotransmetteurs. Il a plus récemment été montré, au sein du système nerveux central, l'expression de certaines molécules que l'on pensait restreintes au système immunitaire. Ce répertoire moléculaire commun suggère des similarités de mécanismes entre les deux systèmes. Bien que le système immunitaire ait un effet plutôt néfaste sur le fonctionnement du système nerveux central en conditions pathologiques, les cellules de l'immunité semblent participer au fonctionnement physiologique du cerveau. Je ne décrirai ici que le rôle des cellules de l'immunité et la fonction dans le système nerveux central de molécules dites immunes dans des conditions non pathologiques.

A- Rôles des cellules immunitaires

Les cellules de l'immunité ont surtout été décrites pour leurs effets délétères sur le système nerveux central. Ainsi une activation de la cellule microgiale ou une infiltration de cellules de l'immunité périphérique, notamment les lymphocytes, sont généralement associées avec des effets néfastes sur la fonction et le devenir des neurones (Aguzzi et al., 2013; Mars et al., 2011; Monahan et al., 2008; Rezai-Zadeh et al., 2009). Cependant, un rôle de ces cellules dans le fonctionnement physiologique du cerveau émerge d'études récentes. Parmi les cellules du système immunitaire périphérique impliquées dans le fonctionnement physiologique du cerveau, les lymphocytes T occupent une place centrale avec, dans une moindre mesure, les macrophages. Les lymphocytes B, les cellules Natural Killer (NK) et les cellules dendritiques n'ont, à ce jour, pas été impliqués dans la fonction cérébrale en conditions non-pathologiques.

1- Les microglies

Les microglies sont les cellules macrophagiques du cerveau, assurant des fonctions immunitaires au sein du SNC, mais assurant également un support pour la neurogénèse par la sécrétion de facteurs et en participant activement aux fonctions synaptiques. Représentant entre 5 et 20% des cellules gliales du cerveau des rongeurs suivant les régions cérébrales (Kettenmann et al., 2011), elles dérivent de progéniteurs du sac vitellin et migrent vers le système nerveux central durant les phases précoces de l'embryogénèse (Ginhoux et al., 2010). Ainsi, les microglies sont les seules cellules du cerveau d'origine hématopoïétique et non pas neuroectodermique. Des découvertes récentes ont mis en lumière un rôle de la microglie dans le développement neuronal, la plasticité synaptique et la cognition.

a- Microglies et développement neuronal

Les microglies migrent et infiltrent le cerveau durant les phases précoces de l'embryogénèse coïncidant avec la période de forte mort neuronale (de la Rosa and de Pablo, 2000). En effet, au cours du développement, une grande quantité de neurones meurt par apoptose (environ 85 000 par jour) et la fonction phagocytaire de la microglie semble jouer un rôle majeur dans l'élimination des débris neuronaux (Cunningham et al., 2013; Takahashi et al., 2005; Wakselman et al., 2008). Il a aussi été montré que la microglie promouvait la mort des cellules surnuméraires du cervelet au cours du développement par phagocytose des cellules exprimant une forme activée de la caspase 3 (Mar n-Teva et al., 2004). De plus, la microglie semble induire l'apoptose des neurones hippocampiques selon un mode d'action similaire à celui des cellules de l'immunité innée. Elle nécessite l'expression des molécules CD11b et DAP12 (DNAX activation protein of 12kDa), ainsi que la production d'ions superoxyde (Wakselman et al., 2008) (figure 21).

En plus d'une fonction de la microglie sur la mort neuronale développementale, des études ont montré, *in vivo*, une association de la microglie avec les fibres axonales (Dalmau et al., 1997, 1998), et au niveau de sites majeurs pour la pousse dendritique (Santos et al., 2008) dans différentes régions du cerveau en développement, notamment dans l'hippocampe. La microglie pourrait donc jouer un rôle dans le développement neuronal. Par des études *in vitro*, il a été montré qu'un milieu de culture

conditionné par la microglie augmentait la survie des neurones ainsi que la pousse des neurites (Chamak et al., 1994; Morgan et al., 2004; Zhang and Fedoroff, 1996). Ces résultats semblent indiquer un rôle possible de la microglie sur la pousse des prolongements neuronaux mais aucune preuve *in vivo* n'a encore été apportée pour soutenir cette hypothèse (figure 21).

La microglie semble aussi jouer un rôle important dans la synaptogénèse (Paolicelli et al., 2011). Durant la synaptogénèse, le nombre de connexions synaptiques établies par les neurones excède celui présent dans le cerveau mature (Tremblay et al., 2011). Il y a donc, au cours du développement, une élimination des synapses excédentaires et une stabilisation des autres connexions, un phénomène appelé élagage synaptique (Hua and Smith, 2004). Des données récentes ont montré que la microglie est un acteur majeur dans ce processus (Paolicelli et al., 2011). Au cours du développement, la microglie adopte une morphologie ramifiée avec de longs prolongements (Hanisch and Kettenmann, 2007). Alors que cette microglie ramifiée a longtemps été considérée comme quiescente, des études d'imagerie *in vivo* ont mis en évidence une très grande motilité de ces prolongements (de l'ordre de 1/3µm par minute) permettant ainsi à l'ensemble des microglies de sonder leur environnement et de couvrir la globalité du parenchyme cérébral en quelques heures (Davalos et al., 2005; Hanisch and Kettenmann, 2007; Nimmerjahn et al., 2005). Les prolongements microgliaux établissent des contacts brefs et directs avec les synapses en conditions physiologiques et certaines synapses sont éliminées après un contact prolongé avec la microglie dans un modèle d'ischémie cérébrale (Wake et al., 2009). Ces données suggèrent un rôle actif de la microglie dans le processus d'élagage synaptique. Cependant, les mécanismes moléculaires adoptés par la microglie dans ce processus restent peu connus. Une étude réalisée sur la souris déficiente pour CX3CR1 (CX3C chemokine receptor 1), un récepteur aux chimiokines exprimé par les monocytes et donc uniquement par la microglie dans le SNC (Harrison et al., 1998), a montré que l'absence de ce récepteur entraînait un délai dans l'élagage synaptique au niveau de l'hippocampe, se traduisant par un excès de synapses immatures et une augmentation de la LTD chez le jeune animal mais pas chez l'adulte (Paolicelli et al., 2011). Le ligand de CX3CR1 est la fractalkine (ou CX3CL1 (CX3C ligand 1)), exprimé et sécrété par les neurones (Ransohoff et al., 2007). Une hypothèse est que CX3CL1, sélectivement exprimé au niveau des

synapses à éliminer, serait reconnu par le CX3CR1 microglial. Dans le système visuel, la voie classique du complément a été identifiée comme un mécanisme de l'élagage synaptique. Les composants C1q et C3 de la cascade du complément sont exprimés au niveau des synapses immatures et sont importants pour l'élagage des synapses du noyau rétinogéniculé du système visuel (Stevens et al., 2007). Une étude récente a montré l'expression par la microglie du récepteur au complément 3 (CR3) dont le ligand est C3 et une augmentation du nombre de synapses chez les souris déficientes pour CR3 (Schafer et al., 2012). Les auteurs proposent que l'élagage synaptique au niveau du système visuel soit médié par la liaison du CR3 microglial avec la molécule C3 présente sur les synapses immatures ciblées pour être éliminées (Schafer and Stevens, 2010; Schafer et al., 2012) (figure 21).

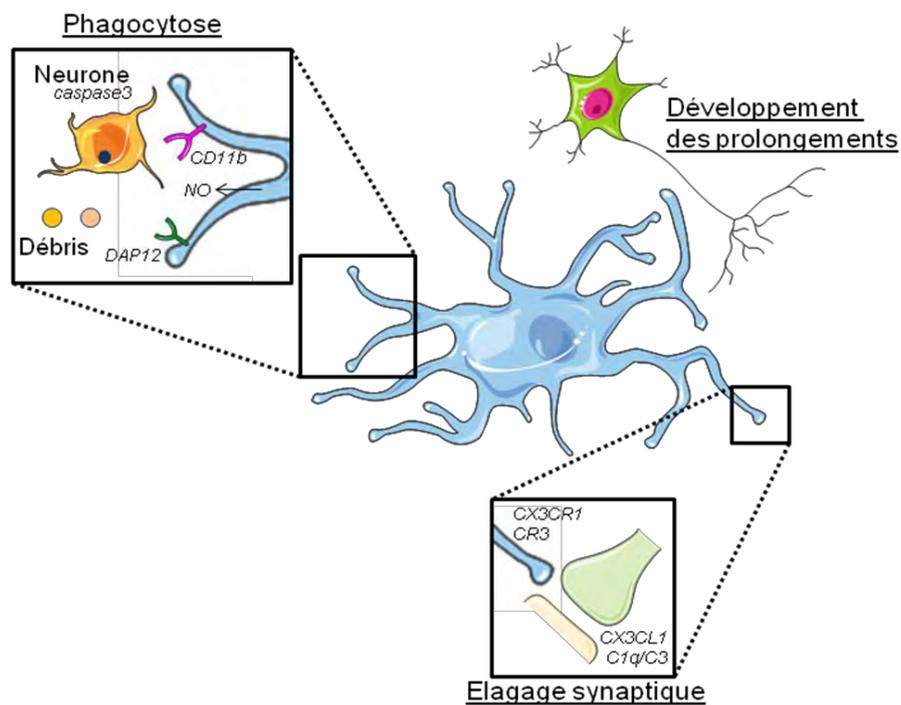


Figure 21 : Représentation du rôle de la microglie dans le développement neuronal. La microglie participe au développement neuronal lors de l'apoptose développementale où elle élimine les neurones excédentaires, notamment marqués par la caspase3, via la sécrétion de NO et l'expression des récepteurs CD11b et DAPI2. Elle participe aussi à la phagocytose des débris cellulaires issus de l'apoptose. La proximité de la microglie avec les prolongements neuronaux durant le développement et l'action des molécules sécrétées par la microglie sur la pousse des neurites *in vitro* suggèrent un rôle de la microglie sur le développement des prolongements neuronaux. La microglie participe à l'élagage synaptique en reconnaissant, via ces récepteurs CR3 et CX3CR1, les synapses à éliminer exprimant CX3CL1 et C1q/C3.

b- Microglies et plasticité

En plus de son rôle au niveau développemental, la microglie semble aussi être importante dans la plasticité et la cognition. La microglie peut sécréter de nombreux facteurs capables de moduler l'activité synaptique (tableau 3). Par exemple, la sécrétion d'IL-1 β (interleukine 1 beta) par la microglie facilite l'activation des récepteurs NMDA et est importante pour les phénomènes d'apprentissage et de mémoire dépendants de l'hippocampe (Viviani et al., 2003; Williamson et al., 2011). La sécrétion du TNF α (tumor necrosis factor alpha) par les cellules gliales, dont les microglies, a été montrée comme médiatrice de plasticité. En conditions physiologiques, un taux faible de TNF α est nécessaire pour la mise en place de l'ajustement synaptique (synaptic scaling), phénomène d'adaptation de l'ensemble des synapses d'un neurone correspondant à une forme de plasticité (Stellwagen and Malenka, 2006). Ainsi l'incubation de coupes d'hippocampes avec du TNF α augmente l'expression des récepteurs AMPA et augmente ainsi le ratio du courant AMPA/NMDA, sans affecter la LTP et la LTD (Stellwagen and Malenka, 2006). De même, la sécrétion du facteur neurotrophique BDNF régule directement l'activité synaptique dans la moelle épinière (Coull et al., 2005). Alors que la sécrétion de facteurs neurotrophiques par la microglie promeut généralement la plasticité synaptique et la cognition, l'action des cytokines et molécules inflammatoires est plus compliquée. La concentration semble être le facteur majeur dans le rôle bénéfique ou délétère de ces molécules sur la plasticité et le comportement (tableau 3, figure 22).

	<u>Nom</u>	<u>Cellules sécrétrices</u>	<u>Action sur la plasticité</u>	<u>Action sur la neurogénèse</u>	<u>Action sur la mémoire</u>	<u>Références</u>
<u>Facteurs neurotrophiques</u>	BDNF	neurones, astrocytes et microglies	Promeut la LTP	Promeut la prolifération	Favorise la mémoire dépendante de l'hippocampe	(Barnes and Thomas, 2008; Heldt et al., 2007; Li et al., 2008; Lu et al., 2008)
	NGF	neurones, astrocytes et microglies	Promeut la LTP	Promeut la prolifération (?)	Favorise la mémoire	(Conner et al., 2009; Kelly et al., 1998; Kim and Oh, 2013; Woolf et al., 2001)
	IGF-1	neurones, astrocytes et microglies	Promeut la LTP	Promeut la prolifération	Favorise la mémoire	(Annenkov, 2009; Maher et al., 2006; Sonntag et al., 2005; Trejo et al., 2007)
	VEGF	neurones, astrocytes et microglies	Promeut la LTP	Promeut la prolifération	Favorise la mémoire	(Cao et al., 2004; Licht et al., 2011)
	NT-3	neurones, astrocytes et microglies	Promeut la LTP	Promeut la prolifération	Favorise la mémoire	(Shimazu et al., 2006)
	NT-4	neurones, astrocytes et microglies	?	Promeut la différenciation neuronale	Favorise la mémoire	(Liu et al., 2009; Shen et al., 2010)
<u>Cytokines et molécules inflammatoires</u>	IL-1 β	neurones, astrocytes et microglies	↗ bloque la LTP – promeut la LTP ↘ bloque la LTP pas d'effet sur LTD	↗ inhibe la prolifération et la différenciation	↗ défauts de mémoire – favorise la mémoire ↘ défauts de mémoire	(Bellinger et al., 1993; Goshen et al., 2007, 2009; Hein et al., 2010; Song and Horrobin, 2004; Spulber et al., 2009)
	IL-6	astrocytes et microglies	↗ bloque la LTP – promeut le maintien de la LTP	↗ inhibe la prolifération	↗ défauts de mémoire avec l'âge faible IL-6 favorise la mémoire (en condition pathologique) ↘ favorise la rétention	(Balschun et al., 2004; Braida et al., 2004; Heyser et al., 1997; Li et al., 1997; Monje et al., 2003; Shapira-Lichter et al., 2008; Vallières et al., 2002)
	TNF α	astrocytes et microglies	↗ bloque LTP ↘ normal LTP/LTD ↘ inhibe plasticité homéostatique	↗ inhibe la prolifération et la différenciation neuronale faible TNF α favorise la prolifération ↘ favorise la prolifération et la différenciation	↗ défauts de mémoire avec l'âge	(Bjugstad et al., 1998; Fiore et al., 1996; Kaneko et al., 2008; Pickering and O'Connor, 2007; Stellwagen and Malenka, 2006; Widera et al., 2006)
	TGF β	neurones, astrocytes et microglies	?	↗ inhibe la prolifération faible TGF β promeut la prolifération	↗ favorise mémoire (en condition pathologique)	(Battista et al., 2006; Li et al., 2013; Mathieu et al., 2010; Wachs et al., 2006)
	Prostaglandines	astrocytes et microglies	↗ bloque LTP – promeut LTP ↘ bloque LTP	↘ inhibe la prolifération	↗ défauts de mémoire ↘ défauts de mémoire	(Hein et al., 2007; Kotilinek et al., 2008; Sharifzadeh et al., 2005; Shaw et al., 2003)

Tableau 3 : Facteurs sécrétés par la microglie modulant la plasticité, la neurogénèse et la mémoire. ↗ *surexpression* ; - *niveau physiologique* ; ↘ *sousexpression*

Quelques études ont montré l'importance de la microglie dans la cognition et certains troubles du comportement. Ainsi, chez la souris déficiente pour MECP-2 (methyl CpG binding protein 2), modèle du syndrome de Rett, une forme extrêmement sévère d'autisme, il a été montré que l'expression sélective de MECP-2 dans les monocytes, incluant les microglies, était capable de restaurer le phénotype de la souris déficiente (Derecki et al., 2012a). Il apparaît que la déficience en MECP-2 induise une diminution de l'activité phagocytaire de la microglie à l'origine du phénotype comportemental de la souris puisqu'un blocage pharmacologique de la phagocytose empêche la restauration du phénotype (Derecki et al., 2012a, 2012b). De même, dans un modèle de trichotillomanie (souris déficientes pour homeobox B8 (Hoxb8)), caractérisé par un arrachage compulsif des poils associé à un toilettage répétitif, la migration de microglies dérivées de la moelle osseuse saine dans le cerveau après greffe engendre une restauration du comportement de l'animal (Chen et al., 2010). Enfin, chez l'homme et la souris, la perte de fonction de DAP12 ou TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), deux molécules agissant de concert et étant essentiellement exprimées par la microglie dans le SNC, résulte en une démence frontale, la maladie de Nasu-Hakola (Paloneva et al., 2002). Chez la souris, l'absence de DAP12 engendre une augmentation de LTP associée à une diminution du nombre de récepteurs AMPA et TrkB (tyrosine receptor kinase B, récepteur au BDNF) synaptiques, ce qui suggère un rôle de la microglie dans la plasticité synaptique et potentiellement dans la physiopathologie de cette maladie (Roumier et al., 2004). Cependant, ces résultats sont encore source de débats puisque certains auteurs décrivent aussi une expression oligodendrocytaires de TREM2 qui pourrait expliquer la démyélinisation et la démence dont souffrent les patients avec une perte de fonction de TREM2 (Kiialainen et al., 2005) (figure 22).

La neurogenèse au stade adulte représente un élément majeur pour la cognition et la plasticité synaptique sur laquelle la microglie peut influencer. La microglie semble agir sur la neurogenèse via la sécrétion de facteurs trophiques comme le IGF-1 (insulin growth factor 1) mais aussi des cytokines comme le TGF β (transforming growth factor beta) pouvant influencer positivement sur la neurogenèse (Annenkov, 2009; Battista et al., 2006; Kohman et al., 2012; Mathieu et al., 2010). Le récepteur CX3CR1 semble aussi important dans l'action de la microglie sur la neurogenèse puisque cette

dernière est diminuée chez les souris déficientes pour CX3CR1, et associée à une absence de LTP et des défauts de comportements notamment au test de la piscine de Morris (Rogers et al., 2011). De plus il a été montré que la microglie participait à l'élimination des neurones nouvellement formés subissant l'apoptose, empêchant ainsi la création d'un microenvironnement nécrotique défavorable à la neurogénèse (Sierra et al., 2010). La microglie présente ainsi un rôle de support pour la neurogénèse adulte (figure 22).

En plus d'un effet direct de la microglie sur la fonction synaptique, la microglie semble être sensible à l'activité des synapses. En effet, le sondage des synapses par les prolongements microgliaux semble être dépendant de l'activité synaptique puisque le blocage de l'activité synaptique, notamment par la tetrodotoxine induit une diminution de la fréquence des contacts entre la microglie et la synapse (Wake et al., 2009). De plus, les activités neuronales inhibitrice et excitatrice régulent la morphologie de la microglie *in vitro*. Cependant, les récepteurs aux neurotransmetteurs n'étant pas détectés sur la microglie *in vivo* dans le cerveau sain, cette régulation de morphologie par l'activité synaptique fait vraisemblablement intervenir un intermédiaire comme l'ATP qui est capable de modifier la morphologie microgliale *in vivo* et *in vitro* (Fontainhas et al., 2011).

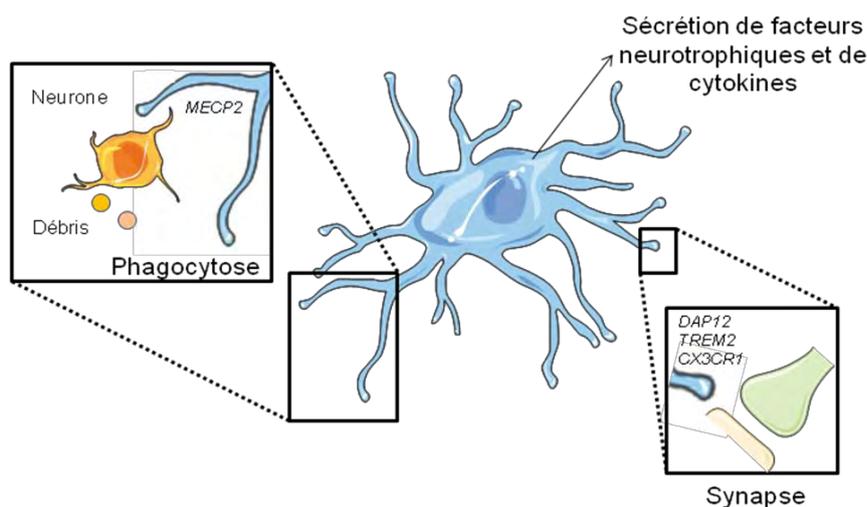


Figure 22 : Mécanismes de modulation de la plasticité, la mémoire et la neurogénèse par la microglie. La microglie module la neurogénèse adulte par la sécrétion de cytokines et de facteurs neurotrophiques (tableau 3), mais aussi en éliminant les débris cellulaires et neurones nouvellement formés, par phagocytose, notamment grâce à l'expression de la molécule MECP-2. Elle influe aussi sur la plasticité synaptique et la mémoire en sécrétant des cytokines et des facteurs neurotrophiques (tableau 3). L'expression par la microglie des molécules DAP12, TREM2 et CX3CR1 est importante pour les phénomènes de plasticité et de mémoire et pourrait influencer sur les contacts établis entre la microglie et la synapse.

2- Les lymphocytes T

De manière assez surprenante, les lymphocytes T semblent jouer un rôle important dans la cognition et la neurogénèse (Kipnis et al., 2012; Wolf et al., 2009a). Les premières évidences d'un rôle des lymphocytes T dans l'apprentissage et la mémoire viennent de la caractérisation comportementale des souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) qui ne possèdent ni lymphocytes T, ni lymphocytes B (Kipnis et al., 2004). Ces souris présentent des défauts comportementaux dans différents tests, tels que la piscine de Morris (MWM) et le labyrinthe de Barnes, et l'injection de lymphocytes T à ces animaux engendre une amélioration des performances cognitives, suggérant ainsi un rôle des lymphocytes T dans l'apprentissage et la mémoire (Brynskikh et al., 2008). Après cette étude, l'utilisation d'autres modèles animaux naturellement déficients en lymphocytes T (souris nude) mais aussi d'animaux totalement déplétés en lymphocytes T (traitement anti-CD3) ou déplétés en lymphocytes T circulants ont confirmé ces premières observations (Barnard et al., 2009; Derecki et al., 2010; Wolf et al., 2009b; Ziv et al., 2006) (tableau 4). Ainsi les lymphocytes T, notamment CD4+, apparaissent comme des éléments cellulaires essentiels aux mécanismes d'apprentissage et de mémoire (Derecki et al., 2010; Wolf et al., 2009b).

Modèle Animal	Caractéristique immune	Cognition	Neurogénèse	Références
SCID	Absence de LT et LB	↗ stress et anxiété (LCS et TSB) ↘ mémoire (MWM / BM / RAWM)	↘ neurogénèse DG	(Brynskikh et al., 2008; Cohen et al., 2006; Derecki et al., 2010; Kipnis et al., 2004; Ziv et al., 2006)
SCID + LT	Repopulation en LT	↗ mémoire (RAWM)		(Brynskikh et al., 2008)
SCID + splénocytes déplétés en LT	Repopulation en LB	↘ mémoire (RAWM)		(Brynskikh et al., 2008)
souris WT + BMT SCID	Absence de LT et LB	↘ mémoire (RAWM)		(Brynskikh et al., 2008)
nude	Absence de LT	↗ stress et anxiété (LCS et TSB) ↘ mémoire (MWM)	↘ neurogénèse DG	(Cohen et al., 2006; Kipnis et al., 2004; Ziv et al., 2006)
nude + splénocytes	Repopulation en LT		↗ neurogénèse DG	(Ziv et al., 2006)
souris RAG1 ^{-/-} et RAG2 ^{-/-}	Absence de LT et LB		↘ neurogénèse DG	(Wolf et al., 2009b)
souris μMT	Absence de LB		neurogénèse normal	(Wolf et al., 2009b)
souris traitées avec un anti-CD3	Déplétion en LT		↘ neurogénèse DG	(Wolf et al., 2009b)
souris traitées avec un anti-CD4	Déplétion en LT CD4	↘ mémoire (MWM)	↘ neurogénèse DG	(Wolf et al., 2009b)
souris traitées avec un anti-CD8	Déplétion en LT CD8		neurogénèse normal	(Wolf et al., 2009b)
souris traitées avec un sérum anti-thymocyte	Réduction population LT	↘ mémoire (labyrinthe à 7 bras)		(Barnard et al., 2009)

Tableau 4: Modèles montrant le lien entre lymphocytes T, cognition et neurogénèse. SCID : Severe Combined Immunodeficiency ; BMT : transplantation de moelle osseuse ; LCS : labyrinthe en croix surélevé ; TSB : test du sursaut au bruit ; MWM : test de la piscine de Morris ; BM : labyrinthe de Morris ; RAWM : test de la piscine à 6 bras ; DG : gyrus denté ; LT : lymphocytes T ; LB : lymphocytes B.

Comment les lymphocytes T peuvent-ils agir sur les fonctions cérébrales ? Il a été montré que la réalisation d'un test comportemental (la piscine de Morris) entraînait une accumulation de lymphocytes T au sein des méninges et des plexus choroïdes (Derecki et al., 2010). Etant donné qu'en conditions physiologiques il n'est pas détecté de lymphocytes T dans le parenchyme cérébral, les méninges apparaissent comme un site potentiel important pour la communication entre les lymphocytes T et le cerveau. L'analyse des cytokines exprimées par les lymphocytes T accumulés au niveau des méninges a mis en évidence une expression d'IL-4 (interleukine 4). Le mécanisme d'action des lymphocytes T semble être double. D'une part, la sécrétion d'IL-4 semble diminuer la production de TNF α et d'IL-12 (interleukine 12) par les cellules myéloïdes des méninges, leur donnant ainsi un profil anti-inflammatoire (Derecki et al., 2010). D'autre part, les lymphocytes T

semblent aussi influencer sur la production de BDNF dans le parenchyme. En effet, la déplétion en lymphocytes T CD4⁺ induit une diminution du BDNF dans le cerveau (Wolf et al., 2009b). De plus, l'IL-4 a été montrée comme induisant l'expression de BDNF par les astrocytes (Derecki et al., 2010). L'ensemble de ces résultats semble indiquer que l'accumulation de lymphocytes T sécrétant d'IL-4 au niveau des méninges modifie la production de cytokines et de facteurs neurotrophiques au sein des méninges et du parenchyme cérébral (Gadani et al., 2012; Kipnis et al., 2012) (figure 23). Il semble aussi que l'épitope reconnu par les lymphocytes T soit important dans la fonction pro-cognitive des lymphocytes T. En effet, les souris transgéniques possédant des lymphocytes T spécifiques d'un peptide de la BMP (basic myelin protein), protéine de la myéline exprimée dans le cerveau, présentent une augmentation de l'apprentissage et de la mémoire à la piscine de Morris, alors que les souris exprimant des lymphocytes T spécifiques de l'ovalbumine présentent une diminution de l'apprentissage et de la mémoire (Ziv et al., 2006).

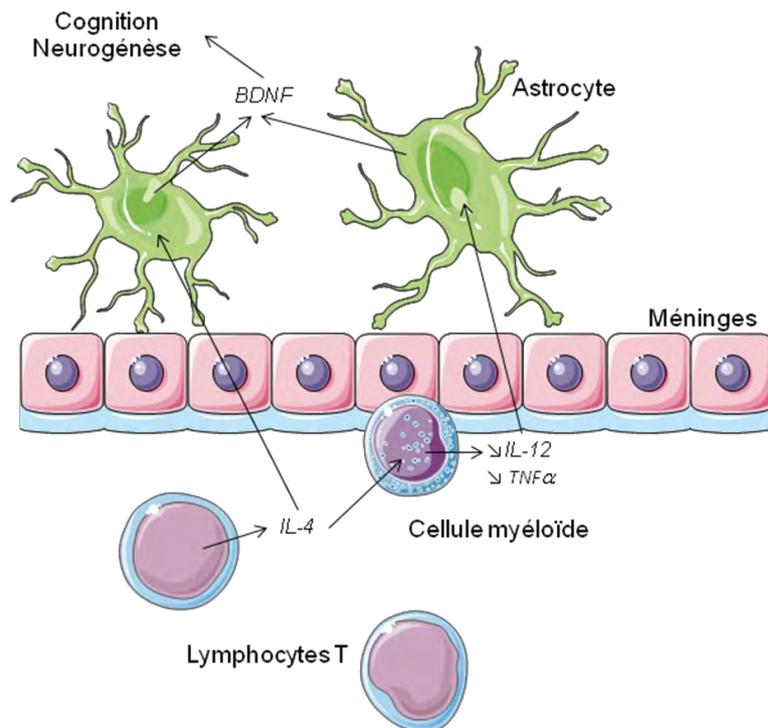


Figure 23 : Mécanismes pro-cognitifs des lymphocytes T. Les lymphocytes T sécrétant d'IL-4 sont accumulés au niveau des méninges et des plexus choroïdes lors de la réalisation d'une tâche cognitive. L'IL-4 agit sur les cellules myéloïdes des méninges en diminuant leur expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et TNF α), et engendre aussi une augmentation de la sécrétion de BDNF par l'astrocyte du parenchyme cérébral. Ces modifications de sécrétions de facteurs neurotrophiques et de molécules inflammatoires supportent la neurogénèse et la cognition.

Introduction : Implication de l'immunité et de ses molécules dans le SNC

En dehors des fonctions d'apprentissage et de mémoire, les lymphocytes T ont aussi été impliqués dans la réponse au stress. En effet, la présentation d'une odeur de prédateur à une souris induit un stress chronique chez cet animal, similaire au stress post-traumatique décrit chez l'homme. Il a été montré que les souris SCID et nude développaient plus de stress et d'anxiété que les souris sauvages, et que l'expression de lymphocytes T spécifiques d'un épitope du SNC contrecarrait ce phénotype (Cohen et al., 2006).

Les lymphocytes T ont aussi été montrés comme importants pour la neurogénèse chez l'adulte (Wolf et al., 2009a, 2009b ; Ziv et al, 2006). En effet, l'activation du système immunitaire adaptatif, mais pas celle du système immunitaire inné, induit une augmentation de la neurogénèse hippocampique (Wolf et al, 2009a). De plus, les souris déficientes en lymphocytes T et B (SCID, RAG1 $-/-$ et RAG2 $-/-$) mais aussi les souris déficientes en lymphocytes T (nude) présentent une diminution du nombre de cellules proliférantes dans le gyrus denté de l'hippocampe, alors que les souris déficientes uniquement en lymphocytes B ne présentent pas de défaut (Wolf et al, 2009b ; Ziv et al, 2006). De manière plus spécifique, il a été montré que la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ mais pas des lymphocytes T CD8⁺ résultait en une diminution de la neurogénèse hippocampique (Wolf et al, 2009b). L'injection de lymphocytes T chez la souris nude ou de lymphocytes T CD4⁺ chez la souris RAG2 $-/-$ induit une augmentation de la neurogénèse dans l'hippocampe (Wolf et al, 2009b ; Ziv et al, 2006). Comme pour la cognition, l'épitope reconnu par les lymphocytes T semble important puisque la neurogénèse est augmentée chez les souris exprimant des lymphocytes T spécifiques de la BMP et diminuée chez les souris exprimant des lymphocytes T spécifiques de l'ovalbumine (Ziv et al, 2006).

Tous ces résultats ont été obtenus chez la souris et ces observations n'ont pas encore été transposées chez l'homme. Cependant, une étude a mis en évidence que les patients sous immunosuppresseurs (notamment tacrolimus et sirolimus) ciblant préférentiellement les lymphocytes T, présentaient des défauts d'attention et de mémoire de travail (Martínez-Sanchis et al., 2011). Même si cela n'a pas été prouvé, l'hypothèse peut être émise que l'inhibition des capacités d'activation des lymphocytes T soient à l'origine des défauts cognitifs des patients. Cependant, il a aussi été décrit que

le tacrolimus était capable de franchir la barrière hémato-encéphalique (Kochi et al., 1999) et de ce fait serait capable d'exercer une action directe dans le cerveau notamment via son action inhibitrice sur la calcineurine.

Il apparaît ainsi que les lymphocytes T, en conditions physiologiques, sont importants pour les fonctions cognitives.

3- Les macrophages

Les macrophages, ou plus précisément le statut inflammatoire des macrophages, a été montré comme étant important pour l'apprentissage et la mémorisation (Derecki et al., 2011). Les macrophages peuvent présenter deux états d'activation, le macrophage activé classiquement (M1) est plutôt pro-inflammatoire et sécrète des cytokines pro-inflammatoires comme le $TNF\alpha$ alors que le macrophage activé alternativement (M2) est plutôt anti-inflammatoire. L'activation du macrophage selon un profil M1 ou M2 dépend du signal d'activation. *In vitro*, les macrophages M1 sont obtenus par activation par LPS et $IFN\gamma$ (interferon gamma) alors que les macrophages M2 sont obtenus par activation avec de l'IL-4. Il a été montré que l'injection de macrophages M2 en intraveineuse à une souris SCID entraînait une amélioration des performances cognitives au test de la piscine de Morris (Derecki et al., 2011). De plus, comme pour les lymphocytes T, l'injection de macrophages M2 entraîne un changement du profil inflammatoire des cellules myéloïdes des méninges avec une diminution de l'expression de $TNF\alpha$ et une augmentation de l'expression d'IL-10 (interleukine 10) (Derecki et al., 2011). Il apparaît donc qu'une modification du profil inflammatoire des macrophages de la périphérie soit capable de modifier le profil inflammatoire des cellules résidentes des méninges et de modifier les capacités d'apprentissage et de mémorisation de l'animal.

B- Rôle de l'expression neuronale de molécules de l'immunité

En plus de l'impact des cellules de l'immunité sur le fonctionnement du cerveau, des molécules découvertes dans le système immunitaire ont été montrées comme étant exprimées dans le système

nerveux central où elles participent au développement et au fonctionnement normal des neurones. Ces nouvelles données mettent en évidence des fonctions non-immunitaires de molécules majeures du système immunitaire. Cependant, il apparaît des similitudes fonctionnelles pour certaines molécules. Par exemple, dans le SI, les molécules du complément, en se fixant sur les cellules à éliminer, permettent l'élimination sélective de cellules ciblées. De la même manière dans le système nerveux central, il semble que les molécules du complément participeraient à l'élimination des connexions synaptiques en marquant spécifiquement les synapses à éliminer. Un autre exemple concernant le CMHI (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I), une famille de molécule cruciale dans le système immunitaire pour la reconnaissance du soi et du non-soi, montre dans le SNC, un rôle important pour la reconnaissance des synapses stables et instables. Il semble donc que, du moins pour certaines molécules, les fonctions que l'on découvre dans le SNC partagent des similarités avec celles décrites dans le système immunitaire.

1- Molécules de l'immunité innée

L'immunité innée représente la première ligne de défense contre les organismes pathogènes. Les cellules de l'immunité innée procurent une réponse rapide contre les infections en induisant le recrutement de cellules sur le site d'infection via la sécrétion de cytokines et de chimiokines, et en activant la cascade du complément ainsi que l'immunité adaptative via la présentation d'antigènes. Les deux types principaux de molécules de l'immunité innée exprimés dans le système nerveux sont les récepteurs toll-like (TLR) et les molécules de la cascade du complément.

a- La famille des récepteurs toll-like (TLR)

Les TLR comptent 10 à 12 membres chez l'homme et la souris et sont exprimés par les cellules dendritiques et les macrophages du système immunitaire. Découverts dans les années 90, ils appartiennent à la famille des PRR (pattern recognition receptor) et sont capables de détecter des motifs microbiens très conservés appelés PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) mais aussi les molécules endogènes cytosoliques ou nucléaires libérées lors de la lésion des tissus, appelées DAMP (Damage associated molecular pattern). Ainsi, les TLR participent activement à la réponse rapide à une infection ou un danger (Kawai and Akira, 2007). Tous les TLR sont exprimés au niveau

du système nerveux central, notamment par la microglie, qui représente l'immunité innée du cerveau (Hanke and Kielian, 2011), mais certains TLR sont aussi exprimés par les neurones et les cellules souches neurales (Tang et al., 2007).

Ainsi, les TLR 2, 3, 4, 7, 8 et 9 sont exprimés sur les neurones et/ou sur les cellules souches neurales. Les TLR 7 et 9 ont été identifiés récemment comme étant exprimés au niveau postnatal, et plus précisément au niveau des neurones. Cependant, leur fonction dans le neurone reste encore inconnue (Kaul et al., 2012). Les TLR 2,3 et 4 sont exprimés sur les cellules souches neurales et ont des actions antagonistes sur la prolifération et la différenciation de ces dernières (Lathia et al., 2008; Okun et al., 2010a; Rolls et al., 2007). Les TLR 3 et 4 sont des inhibiteurs de la prolifération des cellules souches neurales aussi bien au niveau embryonnaire que chez l'adulte (Lathia et al., 2008; Rolls et al., 2007). De plus, le TLR 4 est un inhibiteur de la prolifération et de la différenciation en neurones des cellules progénitrices de la rétine (Shechter et al., 2008). Au contraire, le TLR 2 ne semble pas influencer sur la prolifération des cellules souches neurales mais joue un rôle dans la différenciation neuronale des cellules souches (Rolls et al., 2007). La déficience en TLR 2 induit une diminution du nombre de cellules double positives pour la double-cortine (marqueur de cellule souche) et la beta-III-tubuline (marqueur de neurone) alors que l'activation du TLR2 engendre l'effet inverse (Rolls et al., 2007) (figure 24). Cependant, nous avons vu dans le chapitre précédent que les cellules de l'immunité, notamment les LT et les microglies, étaient capables d'influer sur la neurogénèse adulte et la plupart des études s'intéressant au rôle des TLR dans la neurogénèse utilisent des animaux déficients dans tout l'organisme. Or, les TLR 2, 3 et 4 sont aussi exprimés par la microglie et le lymphocyte T (Hammond et al., 2010; Hanke and Kielian, 2011). Une hypothèse est que les effets sur la neurogénèse observés *in vivo* en absence des TLR soient médiés par les cellules de l'immunité, même si les expériences réalisées *in vitro* vont dans le sens d'un rôle neuronal des TLR.

Les TLR ont aussi été impliqués dans la polarisation neuronale. Ainsi, l'activation du TLR 8, exprimé au niveau des axones, induit une diminution de la longueur des neurites alors que la déficience en TLR 8 provoque une augmentation de la longueur des neurites (Ma et al., 2006, 2007). Le TLR 3 semble aussi être important pour la pousse neuritique puisque l'activation du TLR 3 induit

la disparition du cône de croissance et ainsi inhibe la pousse du neurite (Cameron et al., 2007) (figure 24).

Les TLR 3 et 4 ont aussi un rôle dans la cognition (figure 24). En effet, la caractérisation comportementale des souris déficientes pour le TLR 3 a montré une implication différente du TLR 3 dans les phénomènes dépendants de l'hippocampe et ceux dépendants de l'amygdale (Okun et al., 2010b). Les souris déficientes en TLR 3 présentent une augmentation de leurs performances au niveau de la mémoire spatiale hippocampique à la piscine de Morris mais aussi au test de reconnaissance d'objet et dans un test de peur contextuelle (contextual fear), alors que leur mémoire liée à l'amygdale est diminuée dans des tests de peur associée à un indice (cued fear), suggérant un rôle différentiel du TLR 3 sur différentes formes de mémoire. Une étude récente a comparé le comportement des souris déficientes pour le TLR 4 et des souris traitées avec un antagoniste du TLR 4. Ils ont trouvé que l'absence de TLR 4 augmentait la mémoire spatiale des animaux mais que l'infusion intraventriculaire d'un antagoniste en TLR 4 n'affectait pas la mémoire mais induisait une augmentation de l'anxiété, suggérant l'importance du TLR 4 au niveau développemental pour les fonctions cognitives à l'âge adulte (Okun et al., 2012). Ces différences pourraient aussi être dues à un effet du TLR 4 immunitaire sur les fonctions cognitives, qui ne serait pas stimulé lors d'une injection intraventriculaire. Bien qu'encore non étudié, au vu de l'effet du TLR 2 sur la neurogénèse, il est probable que le TLR 2 affecte également les fonctions cognitives.

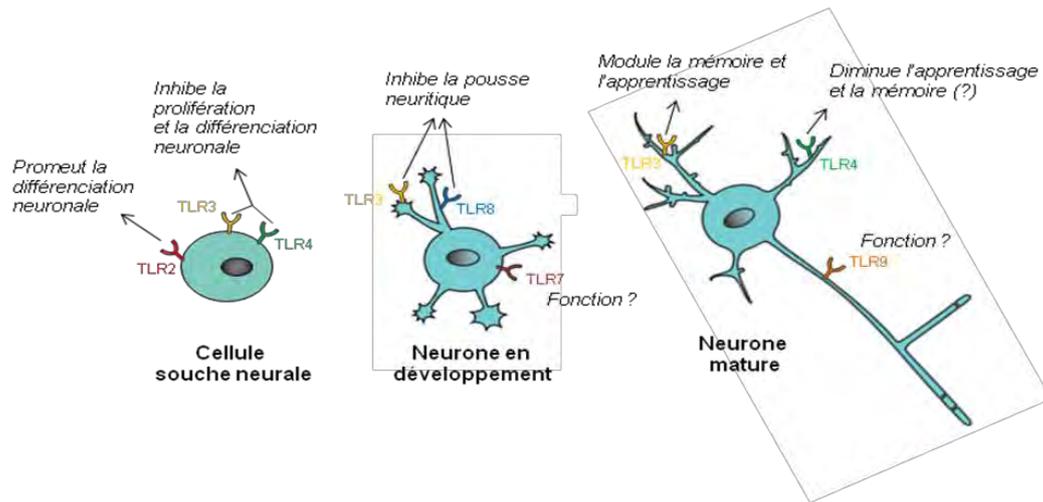


Figure 24 : Conséquences de l'expression neuronale des TLR sur le développement et la plasticité cérébrale. Les TLR sont exprimés par les neurones au cours du développement et participent à leur développement. Les TLR 2, 3 et 4 sont exprimés sur les cellules souches neurales. Alors que le TLR2 promeut la différenciation neuronale des cellules souches, les TLR 3 et 4 sont des inhibiteurs de la prolifération et de la différenciation neuronale des cellules souches. Durant le développement, les TLR 3 et 8 sont des inhibiteurs de la pousse neuritique et l'activation du TLR3 entraîne la disparition du cône de croissance. Enfin, les TLR 3 et 4 semblent jouer un rôle dans la cognition, mais le mécanisme d'action (action sur la neurogénèse ou action directe sur les neurones matures) reste encore indéterminé. Bien que les TLR 7 et 9 soient exprimés par les neurones au cours du développement post-natal, leur fonction reste inconnue.

b- Molécules de la cascade du complément

Les molécules du complément, protéines circulantes ou membranaires, présentes dans le sérum, jouent un rôle important dans la régulation de l'inflammation et dans la défense contre les infections. Elles sont capables de reconnaître une importante variété de pathogènes via les motifs PAMP mais aussi des motifs associés aux cellules en apoptose ou ACAMP (Apoptotic cell-associated molecular pattern). Ainsi elles peuvent détruire les pathogènes par lyse directe ou bien via le recrutement de cellules phagocytaires (Morgan and Gasque, 1996).

Une étude a montré l'expression des molécules C3a et C5a au niveau des cellules progénitrices neurales (Rahpeymai et al., 2006). L'activation du C3a et de son récepteur induit une augmentation de la neurogénèse *in vivo* (Rahpeymai et al., 2006) et stimule la différenciation en neurones des cellules progénitrices neurales *in vitro* (Shinjyo et al., 2009). De même, le récepteur au complément CR2 est aussi exprimé sur les cellules souches neurales et régule la neurogénèse hippocampique (Moriyama et al., 2011).

La majorité des études sur l'expression et le rôle des molécules du complément sur les neurones a montré un rôle majeur des molécules C1q et C3 dans la synaptogénèse (Stephan et al., 2012). Comme déjà évoqué précédemment, les molécules du complément C1q et C3 sont exprimées au niveau des neurones et les souris déficientes pour C1q ou pour C3 présentent un défaut majeur de ségrégation des projections dans le noyau latéral géniculé du système visuel (Stevens et al., 2007). De plus, le nombre de synapses est augmenté chez les souris déficientes suggérant un rôle important de ces molécules du complément dans le remodelage synaptique ayant lieu durant la synaptogénèse (Chu et al., 2010; Stevens et al., 2007) (figure 25). Des études récentes ont aussi montré que d'autres molécules de la famille du C1q comme le C1ql2, C1ql4-1 ou encore Cbln1-4 étaient localisées au niveau synaptique, et importantes pour la formation et la plasticité des synapses (Bolliger et al., 2011; Iijima et al., 2010; Shimono et al., 2010) notamment au niveau du cervelet (Matsuda and Yuzaki, 2011; Yuzaki, 2010).

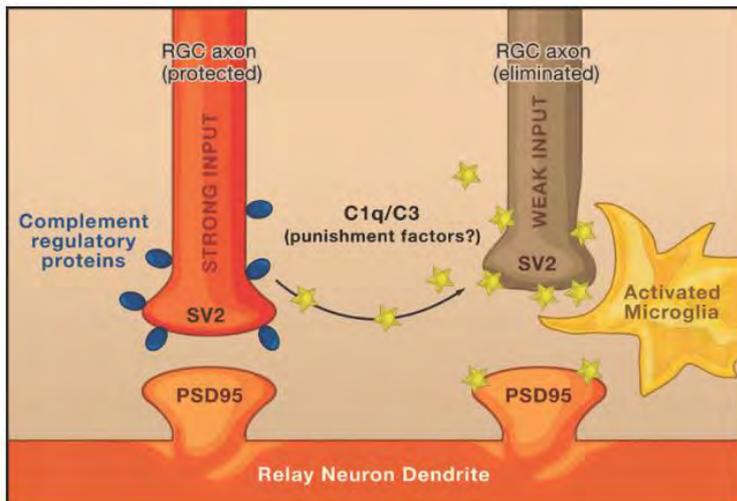


Figure 25 : Hypothèse d'action des molécules du complément dans la synaptogénèse. Le rôle des molécules du complément dans la synaptogénèse serait celui d'un marqueur d'élimination, comme dans le SI. Les synapses électriquement actives libéreraient C1q/C3 sous forme soluble qui viendrait se fixer sur les synapses instables qui seraient reconnues et éliminées par la microglie (notamment via le récepteur CR3). Adapté de Fourgeaud and Boulanger, 2007.

2- Molécules de l'immunité adaptative

En plus des molécules de l'immunité innée décrites précédemment, certaines molécules de l'immunité adaptative sont aussi exprimées au sein du SNC et jouent un rôle non-immunologique dans le développement et la plasticité du système nerveux. Parmi ces molécules, on trouve surtout les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) et certains de ces récepteurs associés dont les fonctions dans le SNC ont fait l'objet de nombreuses études depuis 15 ans. La

découverte de l'expression et d'une fonction du CMHI dans le système nerveux vient d'un criblage des gènes régulés par l'activité dans le noyau latéral géniculé du système visuel félin (Corriveau et al., 1998). Depuis, de nombreuses études se sont intéressées aux fonctions du CMHI dans les différentes étapes du développement neuronal.

Ainsi, des études récentes ont montré un rôle du CMHI, et plus particulièrement des deux isotypes H2-K(d) et H2-D(d), dans la neuritogénèse (Bilousova et al., 2012; Washburn et al., 2011). Chez les souris déficientes pour ces deux isotypes, les auteurs ont observé une diminution du pourcentage de neurones polarisés et une diminution générale de la longueur des neurites sur les neurones en culture aux premiers stades de développement. Au contraire, la surexpression de l'isotype H2-D dans les neurones entraîne une augmentation de la longueur et du nombre de neurites suggérant un rôle du CMHI dans la régulation de la polarisation neuronale (Bilousova et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré qu'une forme soluble du CMHI sécrétée par clivage inhibait la pousse neuritique dans un modèle d'explant du thalamus (Washburn et al., 2011). Il semblerait donc que les formes membranaires et solubles du CMHI aient des effets antagonistes sur la pousse neuritique.

Le CMHI a surtout été étudié dans le système visuel pour son rôle dans la ségrégation des afférences et des connexions synaptiques. Lors de la mise en place du système visuel, les axones des neurones de la rétine projettent dans le noyau latéral géniculé (LGN). Les neurones du LGN projettent alors au niveau cortical dans le cortex visuel. Au cours du développement, en lien avec l'activité neuronale, les afférences rétiniennes excédentaires au niveau du LGN vont être éliminées afin de permettre une ségrégation spatiale des projections venant de chaque œil (figure 26 A,B). Dans le système immunitaire, le CMHI nécessite les protéines β 2microglobuline et TAP1 (transporter 1) afin d'être transporté et stabilisé à la membrane (Krangel et al., 1979), ainsi les souris déficientes pour ces molécules sont considérées comme déficientes pour le CMHI. Ces souris montrent des défauts d'élimination des afférences rétiniennes dans le LGN résultant en la persistance de projections ectopiques (Huh et al., 2000). Par des approches plus directes en éliminant spécifiquement certains isotypes du CMHI, l'absence des isotypes H2-K et H2-D engendrait une augmentation de la plasticité des colonnes de dominance oculaire lors de la monoénucléation, ainsi qu'un défaut des projections au

niveau du LGN (Datwani et al., 2009) (figure 26 C). Ces études montrent ainsi un rôle majeur du CMHI dans la ségrégation des projections des neurones de la rétine. De manière intéressante, le récepteur du CMHI, PirB (paired immunoglobulin-like receptor B), est aussi exprimé au niveau du cortex visuel et les souris déficientes pour le PirB présentent le même phénotype que les souris déficientes pour le CMHI, suggérant un lien entre ces deux molécules aussi dans le SNC (Syken et al., 2006). Etant donné l'importance du CMHI dans la mise en place du système visuel, une équipe s'est intéressé au rôle potentiel du CMHI dans le cervelet dont la mise en place nécessite aussi l'élimination de connexions excédentaires. Bien que le CMHI soit exprimé au niveau des neurones du cervelet, son absence ne semble pas engendrer de défaut de connexions. Il semble ainsi que la fonction du CMHI soit dépendante de la région cérébrale (Letellier et al., 2008).

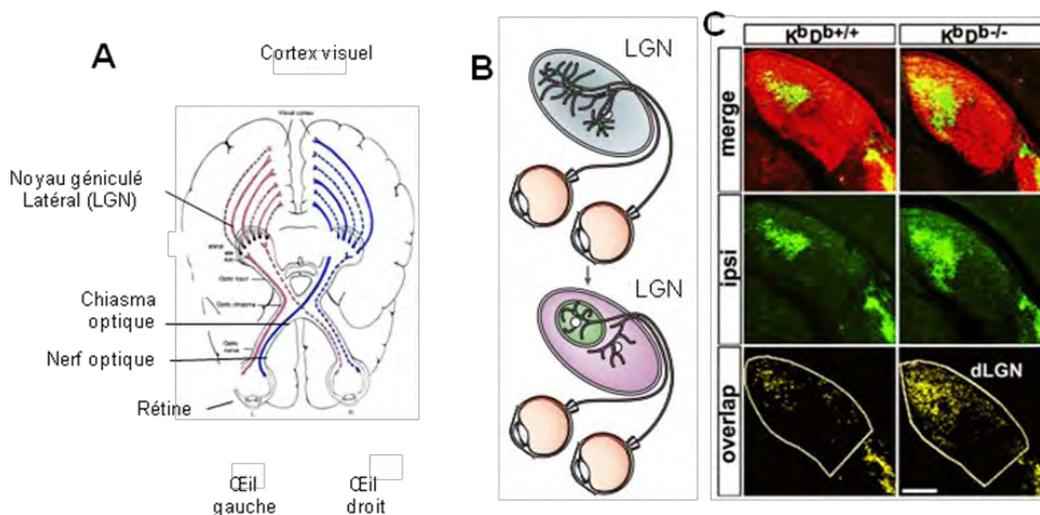


Figure 26 : Représentation de la voie rétinogéniculée et du défaut développemental lié à l'absence du CMHI. (A) les neurones de la rétine émettent leurs projections au niveau des noyaux latéraux géniculés (LGN) présents dans le thalamus. Les neurones du LGN émettent leurs projections dans le cortex visuel. (B) A la naissance, les projections rétinogéniculées se chevauchent dans le LGN (haut). L'activité endogène neuronale provenant des yeux conduit au raffinement des projections conduisant à une ségrégation spécifique (bas). (C) Les souris déficientes pour les isotopes H2-K et H2-D du CMHI possèdent une zone de projection des afférences rétiniennes dans le LGN (vert) plus importante que les souris sauvages. Adapté de Boulanger and Shatz, 2004 et Datwani et al., 2009.

Introduction : Implication de l'immunité et de ses molécules dans le SNC

Le CMHI joue aussi un rôle important dans la mise en place et la fonction des synapses. Ainsi, l'absence du CMHI engendre une augmentation de la densité synaptique à la fois glutamatergiques et GABAergiques *in vivo* et *in vitro* sur des neurones jeunes mais pas sur les neurones plus matures, suggérant un rôle majeur du CMHI dans les étapes précoces de la mise en place des synapses (Glynn et al., 2011). De plus, le CMHI régule des fonctions synaptiques puisque l'absence du CMHI provoque une augmentation des mEPSCs chez la souris (Glynn et al., 2011; Goddard et al., 2007) et que le blocage du CMHI par un anticorps bloquant diminue les sEPSCs chez le marmoset (Ribic et al., 2010). Localisé à la fois au niveau pré et post-synaptique (Needleman et al., 2010), le CMHI semble jouer un rôle dans la majorité des formes de plasticité synaptique. Des données électrophysiologiques montrent que l'absence de CMHI provoque une augmentation de la LTP et une absence de LTD dans l'hippocampe (Barco et al., 2005; Huh et al., 2000) mais aussi diminue le seuil de la LTD au niveau du cervelet (McConnell et al., 2009). Le rôle du CMHI dans la plasticité homéostatique reste encore source de débats puisque des études ont montré que l'augmentation de la densité des synapses glutamatergiques via le blocage de l'activité synaptique par la tétrodothoxine était exacerbée chez les souris déficientes pour le CMHI (Glynn et al., 2011) alors qu'une autre étude n'a, au contraire, pas décrit d'augmentation de la taille des synapses glutamatergiques chez ces mêmes souris mais une absence d'effet de la tétrodothoxine sur la transmission synaptique en absence de CMHI (Goddard et al., 2007). Même si l'effet facilitateur ou inhibiteur du CMHI dans l'homéostasie synaptique n'est pas encore déterminé, il semble que ce dernier participe tout de même à cette forme de plasticité. Au niveau moléculaire, une étude a montré que le CMHI est un inhibiteur de la fonction des récepteurs NMDA et contrôle le trafic des récepteurs AMPA au niveau de la synapse (Fourgeaud et al., 2010).

Plusieurs récepteurs du CMHI décrit au niveau immunitaire sont aussi exprimés au sein du SNC comme le PirB mentionné plus haut (Syken et al., 2006), mais aussi Ly49 dont le blocage induit une diminution de la croissance neuritique (Zohar et al., 2008) et KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptor) (Bryceson et al., 2005). Le récepteur majeur du CMHI dans le système immunitaire qu'est le TCR (T cell receptor) n'a jamais pu être montré comme étant exprimé au niveau du SNC suggérant

que les partenaires moléculaires du CMHI dans le SNC sont, pour certains, différents de ceux décrits dans le système immunitaire (Syken and Shatz, 2003).

Une autre classe de molécules appartenant à l'immunité adaptative liée au CMHI dans le système immunitaire et importante pour le fonctionnement du SNC : il s'agit de la famille des sous-unités du complexe CD3. En plus de CD3 ζ qui a été au centre de mon travail de thèse et qui sera décrit ultérieurement, une autre sous-unité de ce complexe est aussi exprimée dans le cerveau. Il s'agit de la sous-unité CD3 ϵ qui a été identifiée dans le cervelet de souris (Nakamura et al., 2007). En effet, les souris déficientes pour le CD3 ϵ présentent une réduction de la complexité de l'arborisation dendritique, suggérant un rôle du CD3 ϵ dans le développement dendritique. De plus, ces souris présentent des défauts électrophysiologiques et des défauts comportementaux au Rotarod, suggérant un rôle important du CD3 ϵ dans les fonctions motrices dépendantes du cervelet (Nakamura et al., 2007).

C- CD3 ζ

Dans le système immunitaire, de nombreux récepteurs ne possèdent qu'un court domaine intracellulaire. Ainsi, afin de transduire les signaux d'activation, ils s'associent avec des molécules adaptatrices via des liaisons non covalentes. La sous-unité CD3 ζ (ou TCR- ζ) est une protéine adaptatrice signalétique décrite pour la première fois dans les lymphocytes T et associée au TCR où elle joue un rôle central dans le développement des lymphocytes T et la réponse antigénique (Samelson et al., 1985; Weissman et al., 1988).

1- Structure du CD3 ζ

D'abord découvert dans les lymphocytes T (Weissman et al., 1986), la protéine CD3 ζ est aussi exprimée dans les cellules NK (Lanier et al., 1989) mais elle reste mieux caractérisée dans les lymphocytes T. CD3 ζ est une protéine de 16-kDa exprimée sous forme homodimérique dans les lymphocytes T (Samelson et al., 1985) et sous formes homo ou hétérodimérique dans les NK (Lanier, 2003). Dans les lymphocytes T, elle fait partie du complexe CD3 composé de 4 sous-unités : ζ , δ , γ et ϵ . Contrairement aux trois dernières sous-unités qui présentent des homologies de séquence et sont codées par des gènes situés sur le chromosome 11 chez l'homme (9 chez la souris), la sous-unité ζ est quant à elle structurellement différente et son gène se situe sur le chromosome 1 à la fois chez l'homme et chez la souris. Malgré ces différences, toutes les sous unités du complexe CD3 présentent une homologie de fonction du fait de la présence de domaines spécifiques appelés domaines ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). CD3 ζ est un acteur important de la signalisation du TCR. Les domaines ITAMs sont constitués de motifs de phosphorylation très conservés et sont caractérisés par une séquence consensus en acides aminés (D/E)YxxL/I-(x)₆₋₈-YxxL/I(L/I). Ces domaines possèdent donc deux tyrosines phosphorylables par des kinases de la famille Src, en particulier Lck (Leucocyte-specific protein tyrosine kinase) et Fyn. La phosphorylation des domaines ITAM constitue un signal moléculaire permettant le recrutement et la phosphorylation de protéines tyrosines à domaine SH2 incluant Syk (spleen tyrosine kinase) et ZAP-70 (ζ -associated protein kinase 70kDa) (Chan et al., 1994; Iwashima et al., 1994). Le niveau de phosphorylation des motifs ITAM

conditionne la modulation de l'activation de la voie de signalisation. Il existe une relation directe entre le niveau de phosphorylation des tyrosines et le niveau d'activation des voies de transduction dépendantes de CD3 ζ . Le recrutement de ZAP-70 après phosphorylation de CD3 ζ va induire la phosphorylation des autres tyrosines de CD3 ζ par rétrocontrôle positif et ainsi engendrer une amplification du système (Steinberg et al., 2004b).

Les domaines ITAMs ne sont pas les seuls domaines que possède CD3 ζ . De part ses fonctions de molécule adaptatrice, elle possède différents domaines de liaison et donc des sites de fixation pour différentes molécules. En son domaine transmembranaire, CD3 ζ possède plusieurs acides aminés primordiaux pour sa dimérisation et son association avec les récepteurs. De plus, elle possède au niveau intracellulaire un domaine de liaison au GTP ainsi qu'un domaine de liaison à l'actine (figure 27).

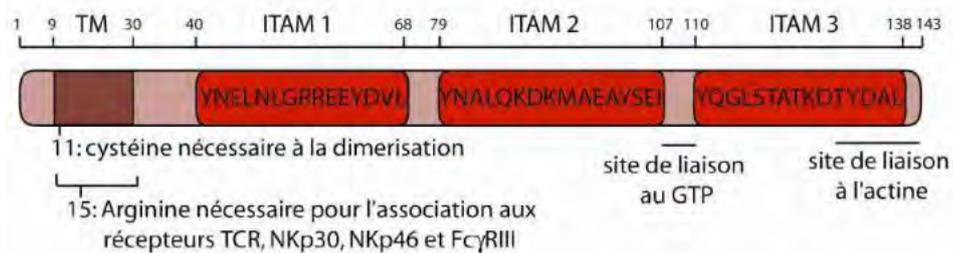


Figure 27 : Structure du CD3 ζ . Le CD3 ζ présente, dans sa partie transmembranaire (TM), un site de dimérisation et un site d'association à différents récepteurs incluant le TCR et des récepteurs des cellules NK. Dans sa partie intracellulaire, CD3 ζ porte trois domaines ITAM, un site de liaison au GTP et un site de liaison à l'actine.

L'association de CD3 ζ avec le récepteur TCR du LT se fait par liaison non covalente d'un résidu arginine du TCR chargé positivement avec un résidu acide aspartique de CD3 ζ chargé négativement situé au niveau du domaine transmembranaire (Call et al., 2002). Ces résidus sont aussi nécessaires pour l'homodimérisation de CD3 ζ , en collaboration avec un résidu cystéine situé lui aussi dans le domaine transmembranaire permettant la formation d'un pont disulfure.

CD3 ζ a la capacité de se lier directement à l'actine via sa partie C-terminale. Cette liaison est dépendante de la phosphorylation de la tyrosine située dans le domaine ITAM de la partie C-terminale (Caplan et al., 1995; Rozdzial et al., 1995). Cependant, cette capacité de liaison directe à l'actine n'a jamais été étudiée au niveau fonctionnel. On peut supposer que cette liaison puisse faciliter le recrutement d'autres molécules de signalisation et les réorganisations morphologiques du lymphocyte T lors de la formation de la synapse immunologique entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigènes (van der Merwe et al., 2000; Serrador et al., 1999).

Il a aussi été découvert que CD3 ζ avait la capacité de se lier au GTP (Franco et al., 1994), cependant la fonction spécifique de cette association reste encore inconnue. Etant donné que l'activation du TCR engendre l'activation de protéines G, on peut supposer que CD3 ζ pourrait participer à leur activation via cette interaction avec le GTP (Tybulewicz, 2005).

2- Récepteurs couplés à CD3 ζ et fonctions associées

La protéine CD3 ζ a été décrite comme pouvant s'associer à différents récepteurs suivant le type cellulaire considéré. Dans les lymphocytes T, CD3 ζ s'associe au TCR comme dit précédemment, mais aussi au récepteur à chimiokine CXCR4 (CXC chemokine receptor 4). Dans les cellules NK, CD3 ζ s'associe aux récepteurs Nkp46 ; Nkp30 et Fc γ RIII. Bien que l'expression de CD3 ζ ait été mise en évidence dans le SNC, on ignore encore quels types de récepteurs lui sont associés dans les neurones.

a- Le TCR (T Cell Receptor)

La protéine CD3 ζ est une molécule centrale dans l'activité du TCR et plus particulièrement dans la reconnaissance antigénique médiée par l'interaction du TCR avec les molécules du CMH. On distingue deux types de molécules du CMH, le CMHI qui est présent à la surface de la plupart de cellules nucléées et le CMHII qui est restreint aux cellules présentatrices d'antigènes (monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B) et aux lymphocytes T activés. Le TCR a la capacité de discriminer les peptides portés par les CMH comme provenant du soi ou du non soi et ainsi

d'adapter sa réponse, par exemple en induisant une réponse immunitaire dans le cas de la reconnaissance d'un peptide du non soi.

Au niveau structurel, le TCR est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β s'associant pour former le récepteur. Après association avec le complexe CD3, le TCR est transporté pour être exprimé à la surface du lymphocyte T. Cette expression membranaire du TCR est dépendante de l'association de CD3 ζ au sein du complexe CD3 (figure 28).

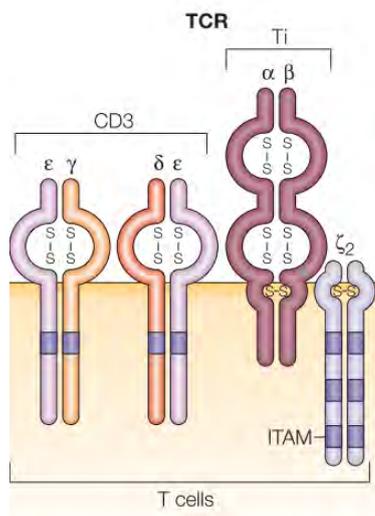


Figure 28 : Représentation de CD3 ζ et de son interaction avec le TCR. La molécule CD3 ζ s'associe en homodimères avec le TCR et comporte 3 motifs ITAM, contrairement aux autres sous-unités du CD3, qui n'en comportent qu'un seul. Ces motifs ITAM sont essentiels au processus d'activation des LT. Adapté de Baniyash et al., 2004.

L'assemblage du TCR avec le complexe CD3 commence très en amont dans le réticulum endoplasmique par la dimérisation des deux chaînes du TCR et l'association de ce dimère avec les sous-unités γ , δ et ϵ du complexe CD3. Après transport dans l'appareil de Golgi, ce complexe va s'associer avec un dimère de sous-unité ζ (Dietrich et al., 1999; Minami et al., 1987). La perte d'une ou plusieurs des chaînes CD3 génère la synthèse de TCR instables qui sont rapidement dégradés par la voie lysosomale (Bonifacino et al., 1989). La chaîne ζ du complexe CD3 a été décrite comme nécessaire pour la stabilisation du complexe TCR à la membrane (D'Oro et al., 2002). Ainsi, la protéine CD3 ζ est essentielle pour une expression stable à la membrane du TCR sur les lymphocytes T.

De plus, l'absence de la protéine CD3 ζ entraîne des perturbations dans la différenciation intrathymique des lymphocytes T. En effet, la souris CD3 $\zeta^{-/-}$ présente une augmentation du nombre

de lymphocytes T immatures double négatifs (CD4-CD8-) et une diminution du nombre de lymphocytes T double positifs (CD4+CD8+) et simple positifs (CD3+CD4+CD8- et CD3+CD4-CD8+), ces derniers correspondant aux lymphocytes T matures. (Liu et al., 1993; Love et al., 1993; Malissen et al., 1993; Ohno et al., 1993). On trouve cependant un faible pourcentage de lymphocytes T simple positifs dans la rate et les ganglions des souris CD3 ζ -/- suggérant que certaines cellules ont achevé les mécanismes de sélection intrathymique malgré la diminution d'expression du TCR. CD3 ζ apparait donc comme primordial pour la différenciation intrathymique. Chez l'homme, deux cas de mutation du gène codant pour le CD3 ζ ont été rapportés. Dans un cas, une insertion d'une base au niveau de l'exon 7 entraîne un décalage du cadre de lecture au niveau du domaine ITAM3 et engendre une absence d'expression du CD3 ζ alors que dans le second cas, la substitution d'une base juste avant le domaine ITAM1 entraîne l'apparition d'un codon stop. Dans les deux cas, les patients présentent une diminution importante des lymphocytes T en périphérie et des défauts immunitaires importants (Rieux-Laucat et al., 2006; Roberts et al., 2007).

b- Les récepteurs des cellules NK

Les cellules NK, dites Natural Killer, font partie du système immunitaire inné et sont des acteurs primordiaux de la réponse anti-infectieuse et anti-tumorale (Vivier et al., 2008). Elles ont la capacité de lyser les cellules étrangères à l'organisme en utilisant la voie perforine/granzyme et la voie dépendante du ligand Fas, et ceci indépendamment de l'antigène et sans activation préalable. Les cellules NK utilisent un panel de récepteurs afin de réguler leur activité lytique leur permettant de détruire les cellules étrangères tout en préservant les cellules saines. Ces récepteurs sont de deux types : activateurs s'ils possèdent des motifs ITAM et inhibiteurs s'ils possèdent des motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). La balance des signaux activateurs et inhibiteurs reçus par la cellule NK lors de sa rencontre avec une autre cellule détermine la lyse ou non de cette cellule cible (Vivier et al., 2004). La capacité lytique des cellules NK est dépendante de l'activation de récepteurs cytotoxiques naturels, membres activateurs de la famille des immunoglobulines-like. Ces récepteurs incluent les molécules Nkp30, Nkp44, Nkp46 et Fc γ RIII (ou CD16). Tous ces récepteurs sont associés avec des molécules adaptatrices porteuses de domaine ITAM telles que CD3 ζ , DAP12 et

Fc ϵ RI γ (Lanier, 2003; Vivier et al., 2004). Alors que DAP12 ne s'associe qu'en homodimère, CD3 ζ et Fc ϵ RI γ ont la capacité de former des homo ou des hétérodimères. L'association des récepteurs avec ces molécules adaptatrices se fait grâce aux acides aminés chargés se trouvant dans la région transmembranaire. Chez l'homme, les récepteurs aux cellules NK peuvent s'associer à la fois aux homodimères CD3 ζ ou Fc ϵ RI γ , mais aussi aux hétérodimères CD3 ζ /Fc ϵ RI γ . Chez la souris, le CD16 (Fc γ RIII) est incapable de se lier aux homodimères CD3 ζ et, de ce fait, utilise la molécule Fc ϵ RI γ . Bien que les récepteurs cytotoxiques naturels aient beaucoup été étudiés, notamment dans la surveillance tumorale, on connaît peu de ligands non viraux de ces récepteurs. Seuls deux ligands ont été décrits pour le récepteur Nkp30 : l'antigen-b-associated 3 (BAT3) (Pogge von Strandmann et al., 2007) et la molécule B7-H6 (Brandt et al., 2009). Fc γ RIII est quant à lui un récepteur au fragment constant (Fc) des immunoglobulines (figure 29).

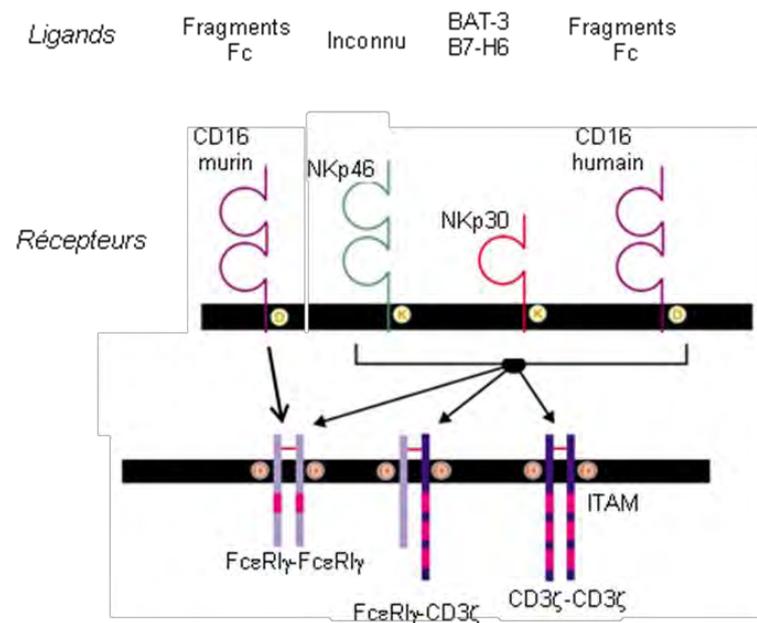


Figure 29 : Les récepteurs des cellules NK et leurs molécules adaptatrices. Les récepteurs CD16 (ou Fc γ RIII), NKp30 et NKp46 peuvent s'associer avec des homodimères ou des hétérodimères des protéines CD3 ζ et Fc ϵ RI γ . Adapté de Lanier et al., 2003.

Chez la souris CD3 ζ ^{-/-}, la maturation et la fonction des cellules NK ne semblent pas modifiées (Liu et al., 1993), suggérant un rôle compensatoire par une autre protéine à domaine ITAM comme Fc ϵ RI γ (Liu et al., 1997). Chez l'homme les résultats sont plus ambigus : dans un cas, la capacité

lytique des NK n'est pas affectée alors que chez le second patient la fonction des NK est diminuée (Rieux-Laucat et al., 2006; Roberts et al., 2007). Cette différence semble plutôt due à l'infection du second patient par le CMV qu'à la mutation de CD3 ζ (Roberts et al., 2007).

c- Le récepteur CXCR4

La protéine CD3 ζ a aussi été décrite comme pouvant être associée à un récepteur couplé aux protéines G, alors que cette famille de récepteurs n'était pas connue pour son association avec des molécules porteuses de motif ITAM. Il s'agit du récepteur à chimiokine CXCR4 qui possède un ligand unique CXCL12 (ou SDF-1 pour stromal derived factor-1). Le couple CXCR4/SDF-1 est exprimé à la fois dans les lymphocytes T, où il est impliqué dans des fonctions d'adhésions, de chimiotactismes et de co-stimulations, mais aussi au sein du système nerveux central où il joue un rôle important dans la prolifération des cellules souches neurales (Han et al., 2001; Tran et al., 2005), la migration cellulaire (Belmadani et al., 2005) et la formation des prolongements neuronaux (Arakawa et al., 2003; Pujol et al., 2005).

La fonction chimiotactique de SDF-1 sur les lymphocytes T a été montrée comme dépendante de l'activation de CD3 ζ et ZAP-70 (Kremer et al., 2003; Patrussi et al., 2007). Deux voies d'activations de CD3 ζ via l'activation de CXCR4 par SDF-1 ont été proposées. La première indique que l'activation de CXCR4 par SDF-1 engendre une interaction directe entre CXCR4 et le complexe ZAP-70/CD3 ζ permettant ainsi un renforcement des voies de signalisation associées à ZAP-70 (Kumar et al., 2006). La seconde étude propose que l'activation de CXCR4 par SDF-1 induit la phosphorylation de Lck, qui va alors phosphoryler CD3 ζ et induire la phosphorylation de ZAP-70 (Patrussi et al., 2007). Dans les deux cas, il résulte une activation de ZAP-70 aboutissant à une modulation de l'activité et du chimiotactisme du LT.

Ces études ont permis de mettre en évidence une implication de molécules à domaine ITAM dans la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G et une fonction de CD3 ζ en dehors de son association avec un immunorécepteur.

3- *Signalisation intracellulaire déclenchée par l'activation de CD3 ζ*

Lors de l'activation du TCR et de son co-récepteur CD28 par liaison au CMH, les protéines kinases de la famille Src, Lck et Fyn sont activées et phosphorylent les chaînes ζ et ϵ du complexe CD3 au niveau des motifs ITAM. Ces ITAM phosphorylés deviennent alors des sites d'ancrage pour la protéine kinase ZAP-70 qui est alors recrutée et phosphorylée à son tour. ZAP-70 va ensuite phosphoryler divers substrats incluant LAT (linker for activation of T cells), SLP76 (Src homology 2 (SH2) domain containing leucocyte protein of 76kDa) et PLC- γ 1 (phospholipase c- γ 1). Ces protéines, une fois phosphorylées vont recruter des protéines catalytiques ou non catalytiques comme Vav, GADS (growth-factor-receptor-bound protein2 (GRB2)-related adaptor protein) et NCK (non-catalytic region of tyrosine kinase). Ces protéines vont générer l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires permettant l'activation de Ras, la mobilisation du calcium, l'activation de la PKC et de la calcineurine mais aussi la polarisation du cytosquelette d'actine et l'activation des facteurs de transcription NF-kB (nuclear factor-kappa B) et NFAT (nuclear factor of activated T-cells). Toutes ces voies participent à la formation de la synapse immunologique et l'activation des lymphocytes T (figure 30).

Afin d'éviter une hyperactivation du lymphocyte T, des mécanismes d'extinction du signal se mettent en place, notamment via l'internalisation, l'ubiquitinylation et la dégradation du TCR par les lysosomes. De plus, le recrutement des phosphatases SHP1 et 2 (Src homology protein tyrosine phosphatase 1) par activation de la protéine CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) va entraîner la déphosphorylation de la chaîne ζ mais aussi des protéines kinases et de leurs substrats et ainsi engendrer l'arrêt du signal et bloquer l'entrée des facteurs de transcription dans le noyau (figure 30).

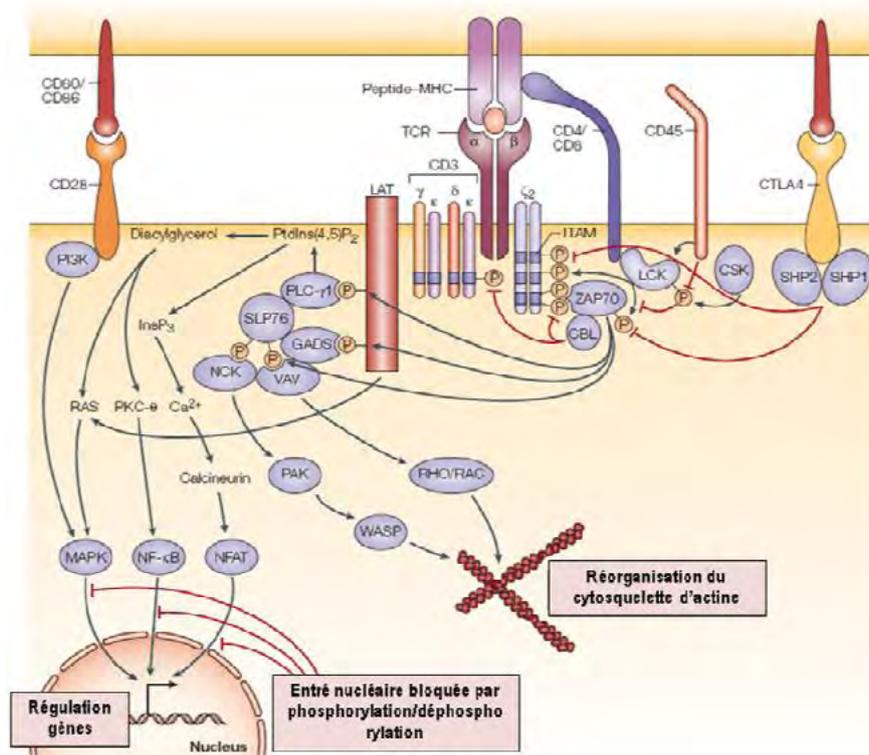


Figure 30 : Les voies de signalisation induites par l'activation de CD3 ζ dans le lymphocyte T. L'interaction entre le TCR et le CMHI induit l'activation des protéines kinases de la famille Src, Lck et Fyn qui phosphorylent CD3 ζ . Cette phosphorylation permet le recrutement et l'activation des kinases de la famille ZAP-70/Syk qui déclenchent l'activation de différentes voies de signalisation qui vont moduler l'expression génique et réguler l'organisation du cytosquelette d'actine. Adapté de Baniyash et al., 2004.

4- Rôle du CD3 ζ dans le système nerveux central

Les premières évidences de l'expression et d'une fonction neuronale du CD3 ζ découlent d'un criblage différentiel d'ARNm cherchant à identifier des gènes impliqués dans le développement du système visuel (Corriveau et al., 1998). Lors de ce criblage, l'ARNm du CMHI a été mis en évidence comme étant régulé par l'activité du système visuel. Etant donné le lien fonctionnel fort entre le CMHI et CD3 ζ au sein du système immunitaire, les auteurs ont examiné la présence de l'ARNm codant pour CD3 ζ dans le cerveau. Des niveaux élevés de CD3 ζ ont été détectés au niveau du thalamus et du noyau géniculé latéral mais aussi, à un niveau plus modeste, au sein de l'hippocampe (Corriveau et al., 1998). La protéine α , par la suite, été identifiée dans le cerveau par Western blot au niveau de l'hippocampe au cours du développement post-natal (Sourial-Bassillious et al., 2006) et par immunohistochimie au niveau de la rétine, du néocortex et de l'hippocampe (Baudouin et al., 2008;

Xu et al., 2010). De plus, une étude de double marquage réalisée sur des sections d'hippocampe a permis de mettre en évidence une expression de CD3 ζ majoritairement au niveau des neurones mais aussi dans une plus faible mesure au niveau des oligodendrocytes (Baudouin et al., 2008).

L'étude des souris déficientes pour CD3 ζ a permis de mettre en évidence un rôle fonctionnel de cette molécule au sein du SNC, notamment au niveau du développement du système visuel.

Au sein de ce système, les neurones ganglionnaires de la rétine projettent leurs axones vers le LGN dès la naissance. Au cours des deux premières semaines post-natales, ces afférences rétiniennes vont subir un remodelage dépendant de l'activité neuronale, se ségréger en régions spécifiques, et ainsi établir des connexions matures permettant la vision binoculaire (figure 26 A,B). Chez les souris déficientes pour CD3 ζ , les afférences rétiniennes établissent des connexions dans des zones ectopiques (Huh et al., 2000) et présentent des perturbations dans leur ségrégation (Xu et al., 2010) (figure 31). Ces défauts de ségrégation ne sont observés qu'au cours de la deuxième semaine post-natale, lorsque l'activité du système visuel est dépendante des récepteurs glutamatergiques mais pas au cours de la première semaine où l'activité neuronale est principalement médiée par les récepteurs cholinergiques. Ces résultats suggèrent une perturbation sélective de la transmission glutamatergique en absence de CD3 ζ . Des études électrophysiologiques ont d'ailleurs permis de mettre en évidence une altération de la transmission glutamatergique au niveau de la rétine au cours de la deuxième semaine post-natale chez les animaux déficients pour CD3 ζ (Xu et al., 2010).

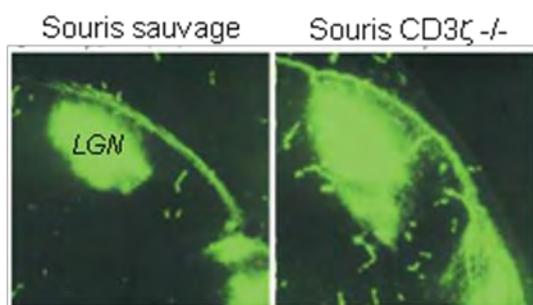


Figure 31 : Défaut développemental dans le LGN des souris déficientes pour CD3 ζ . *Les souris déficientes pour CD3 ζ possèdent une zone de projection des afférences rétiniennes dans le LGN plus importante que les souris sauvages. Adapté de Boulanger et Shatz., 2004.*

L'absence de CD3 ζ affecte aussi le domaine dendritique des neurones. Une étude réalisée au sein du laboratoire a permis de mettre en évidence un rôle inhibiteur de CD3 ζ dans la formation des

dendrites. Cette inhibition est dépendante des domaines ITAM de CD3 ζ (Baudouin et al., 2008). Chez les souris CD3 $\zeta^{-/-}$, les neurones ganglionnaires de la rétine présentent une réduction de la motilité des dendrites corrélée à une augmentation de la stabilité des protrusions dendritiques. Ces modifications de motilité dendritique affectent la structure dendritique et la connectivité synaptique et les neurones présentent une complexification de leur arborisation dendritique (Xu et al., 2010) (figure 32).

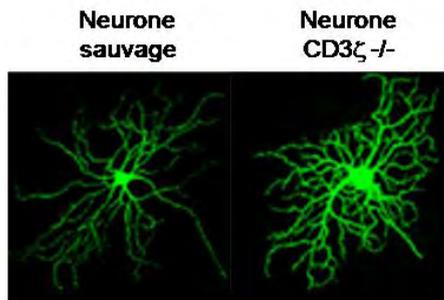


Figure 32 : Images illustrant le rôle de CD3 ζ dans l'arborisation dendritique. *Les neurones de la rétine déficients en CD3 ζ exprimant la GFP présentent une arborisation dendritique plus importante que les neurones normaux. Adapté de Xu et al., 2010.*

En plus de ces anomalies développementales, les souris CD3 $\zeta^{-/-}$ présentent aussi des altérations de la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe. Plus précisément, ces souris présentent une augmentation de la potentialisation à long terme (LTP) et une absence de dépression à long terme (LTD) (Barco et al., 2005; Huh et al., 2000).

Chez l'homme, la fonction cérébrale de CD3 ζ n'a jamais été étudiée. En effet, chez au moins l'un des patients, une greffe de moelle osseuse a permis de contrecarrer les défauts immunitaires liés à l'absence de CD3 ζ (Rieux-Laucat et al., 2006). La fonction cognitive de ce patient n'a jamais été étudiée pour déterminer, chez l'homme, l'implication du CD3 ζ cérébral dans les fonctions de mémoire mais aussi de stress et d'anxiété.

Bien que l'expression de CD3 ζ à la fois au niveau du système immunitaire et du système nerveux central puisse apporter des biais dans l'interprétation des résultats, qui pourraient être clarifiée par la génération de souris avec une déficience spécifique de CD3 ζ au niveau du SNC, ces résultats mettent en évidence l'implication de la molécule CD3 ζ dans des fonctions cérébrales.

D- La voie de co-stimulation CD28/CD80-CD86/CTLA4

Afin d'être activé, le lymphocyte T doit recevoir trois signaux lors de son interaction avec une cellule présentatrice d'antigènes (CPA). Le premier signal provient de l'interaction entre une molécule de CMH présentant un peptide et le TCR. Le second signal est délivré par des molécules de co-stimulation exprimées par les CPA. Enfin, la production de cytokines, notamment IL-2, va fournir le troisième signal permettant l'activation complète du lymphocyte T. Le signal fourni par les molécules de co-stimulation est particulièrement important puisque sans lui, la réponse du lymphocyte T est inefficace et conduit le lymphocyte T en anergie (Greenwald et al., 2005). Il existe deux grands types de molécules de co-stimulation : le premier va fournir un signal d'activation au lymphocyte T alors que le second va inhiber l'activation des lymphocytes T. De nombreuses voies de co-stimulation existent comme la voie CD40/CD40L, la voie ICOS/ICOSL et la PD-1/PD-L1-2, mais la voie qui reste la plus caractérisée est la voie CD28/CD80-CD86/CTLA4 (Chen and Flies, 2013) (figure 33).

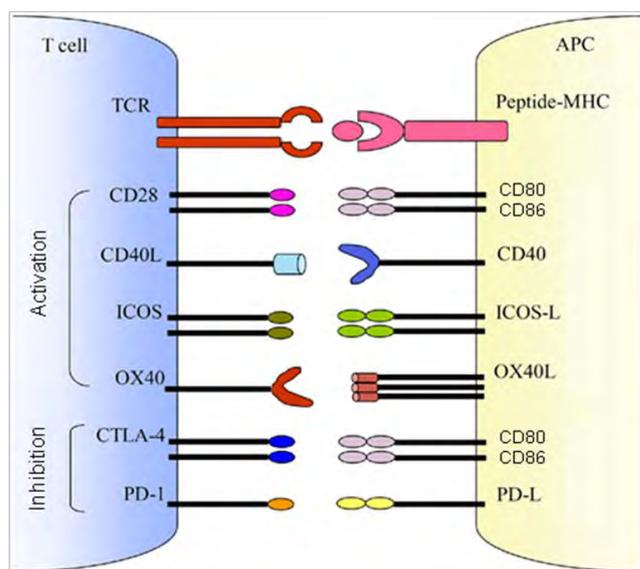


Figure 33 : Principales voies de co-stimulation des lymphocytes T. Pour son activation, le lymphocyte T nécessite deux signaux qui lui sont fournis par la CPA : un signal de reconnaissance antigénique et un signal de co-stimulation. Ce second signal va être activateur dans le cas de l'interaction de CD28 avec CD80-CD86, mais aussi de l'interaction de CD40L avec CD40, d'ICOS avec ICOSL et d'OX40 avec OX40L. Au contraire, le signal sera inhibiteur de l'activation du lymphocyte T dans le cas de l'interaction de CTLA4 avec CD80-CD86 ou de PD-1 avec PD-L1-2. Adapté de Yang, 2011.

La voie CD28/CD80-CD86/CTLA4 inclut deux molécules de la famille B7 que sont CD80 (ou B7-1) et CD86 (ou B7-2) exprimées par les CPA. Ces deux récepteurs peuvent se lier au récepteur activateur CD28 et au récepteur inhibiteur CTLA4 exprimés par le lymphocyte T. En absence d'agent inducteur d'une réponse immune, les lymphocytes T naïfs expriment CD28 (Gross et al., 1992) et les

CPA immatures expriment un niveau faible de CD86 (Freeman et al., 1993). L'activation des CPA induit l'expression de CD80 et une augmentation de l'expression de CD86 (Freeman et al., 1993; Hathcock et al., 1994), elles peuvent alors activer le lymphocyte T par liaison au CD28. Ce signal induit l'expression de CTLA4 par le lymphocyte T (Linsley et al., 1996) qui va induire une diminution de l'expression membranaire de CD28 et inhiber l'activation des lymphocyte T (Rudd et al., 2009). La co-expression de CD28 et de CTLA4 par les lymphocytes T induit une compétition pour la liaison des récepteurs CD80-CD86 et donc une balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs reçus par le lymphocyte T.

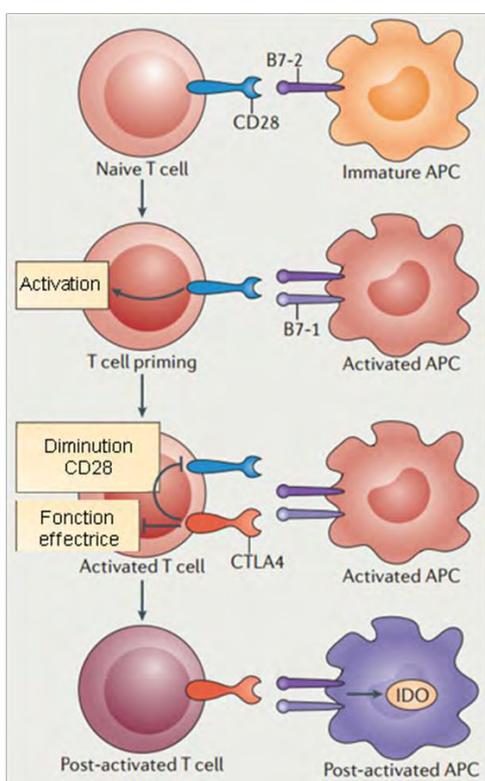


Figure 34 : La voie CD28/CD80-CD86/CTLA4 dans l'activation des lymphocytes T. CD28 est constitutivement exprimé à la surface des lymphocytes T et procure un signal de co-stimulation essentiel pour l'activation, la survie et la prolifération des lymphocytes T lors de sa fixation avec les molécules CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) exprimées par les CPA (APC). L'expression de CTLA4 est induite par l'activation des lymphocytes T et bloque les fonctions effectrices du lymphocyte T. L'augmentation d'expression de CTLA4 engendre la diminution de l'expression membranaire de CD28 par endocytose. L'expression de CD80 et CD86 est modulée par l'activation des CPA par une infection ou un signal de stress ou de danger. La liaison de CTLA4 avec les récepteurs CD80-CD86 induit l'expression d'IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase) par les CPA qui participe au blocage de l'activation des lymphocytes T. Adapté de Chen et Flies., 2013.

1- La voie d'activation CD28/CD80-CD86

L'interaction du CD28 lymphocytaire avec les molécules CD80-CD86 portées par les CPA induit une signalisation bidirectionnelle à la fois dans le lymphocyte T et la CPA.

a- Signalisation dans le lymphocyte T

La liaison de CD80-CD86 sur le CD28 procure un signal de co-stimulation majeur pour l'activation des lymphocytes T. En effet, il permet de potentialiser la signalisation médiée par le TCR

mais engendre aussi l'activation de voies propres importantes pour la survie et la prolifération du lymphocyte T. Le signal transmis par CD28 se synergise avec celui du TCR et permet ainsi de réguler le niveau seuil d'activation du TCR en diminuant le nombre de TCR engagés nécessaires pour une activation efficace du lymphocyte T (Lanzavecchia et al., 1999; Viola and Lanzavecchia, 1996). L'activation de CD28 va induire des modifications morphologiques pour la mise en place de la synapse immunologique, la prolifération des lymphocytes T, notamment par la sécrétion d'IL-2, et permettre la survie et la différenciation du lymphocyte T (Rulifson et al., 1997; Sperling et al., 1996; Thompson et al., 1989).

Le CD28 possède dans sa partie intracellulaire deux motifs protéiques majeurs lui permettant d'assurer sa fonction : un motif proximal YMNM et un motif distal PYAP (Boomer and Green, 2010). Les deux domaines permettent la liaison de partenaires protéiques différents même si une certaine redondance existe entre les deux domaines. Le domaine distal semble cependant particulièrement important puisque sa mutation engendre des défauts d'activation du lymphocyte T alors que la mutation du domaine proximal ne semble pas avoir d'effet *in vivo* (Dodson et al., 2009). La fixation de la PI3K sur le domaine proximal induit l'activation de la voie Akt (protéine kinase B) résultant en l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et NFAT (Boomer and Green, 2010). Cela induit l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-X1 et la production d'IL-2 (Miller et al., 2009; Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). La fixation de la molécule GRB2 sur les motifs distaux et proximaux induit des réarrangements du cytosquelette par la protéine Vav, et permet aussi la production d'IL-2 en activant NFAT ainsi qu'en induisant le recrutement et la phosphorylation au sein de la synapse immunologique de la kinase PKC θ (Boomer and Green, 2010; Janardhan et al., 2011) (figure 35).

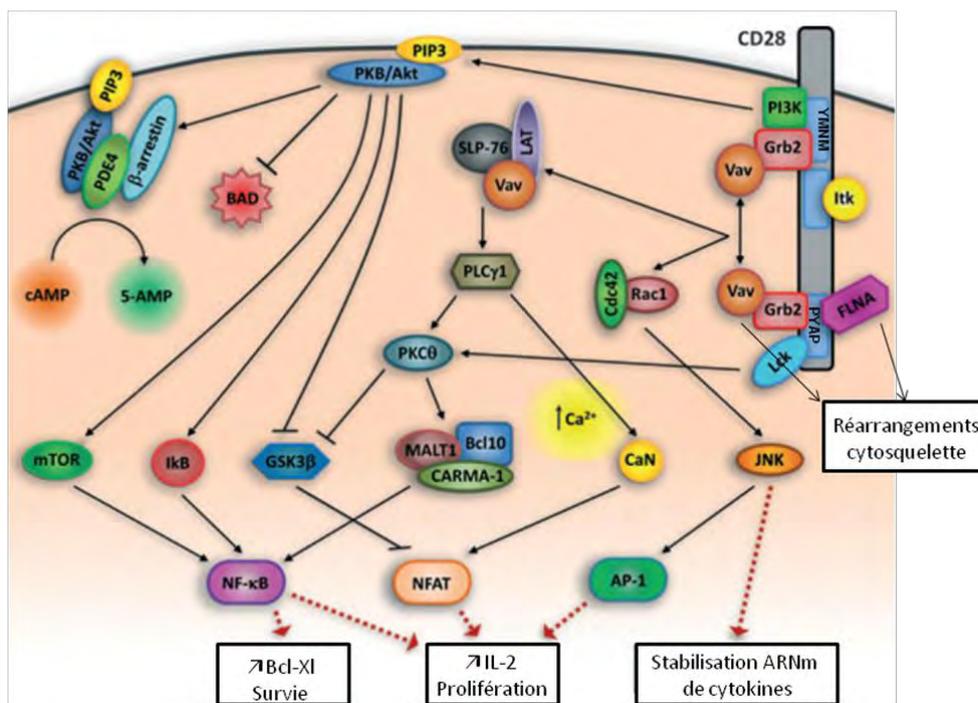


Figure 35 : Signalisation induite par l'activation du CD28. L'activation de CD28 par liaison avec CD80-CD86 induit le recrutement de PI3K au niveau du motif YMNM et participe à l'augmentation de la molécule anti-apoptotique Bcl-XL et la production de la cytokine pro-proliférative IL-2 par activation de NF-κB et NFAT. La liaison de Grb2 sur les domaines YMNM et PYAP induit des réarrangements du cytosquelette via la protéine Vav, participe à la stabilisation de l'ARNm des cytokines par la voie JNK et participe à la survie et la prolifération des lymphocytes T en recrutant et activant la protéine PKCθ. Adapté de Bour-Jordan et al., 2011.

b- Signalisation induite dans la CPA

La liaison du CD28 sur les récepteurs CD80/CD86 induit aussi une signalisation au sein de la CPA. La stimulation de CD80/CD86 par du CD28-Ig (molécule de fusion entre le CD28 et le fragment Fc d'une IgG humaine) induit l'expression d'IL-6 (interleukine 6) par les cellules dendritiques (Orabona et al., 2004). L'induction d'IL-6 par la voie p38MAPK induit l'augmentation d'expression de la molécule suppressive de cytokines SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) aboutissant à l'inhibition de l'expression d'IFNγ dépendante de la voie STAT (signal transducers and activateurs of transcription) (Orabona et al., 2004, 2005). De cette façon, le CD28 empêche la production de la molécule immunosuppressive IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase) qui nécessite la sécrétion d'IFNγ par la CPA (Orabona et al., 2008; Puccetti and Fallarino, 2008). Ainsi CD28 promeut aussi l'activation des lymphocytes T en inhibant les capacités immunosuppressives des CPA (figure 37).

2- La voie d'inhibition CTLA4/CD80-CD86

De même que pour CD28, la liaison de CTLA4 sur CD80-CD86 engendre l'activation de voies de signalisation à la fois dans le lymphocyte T et dans la CPA.

a- Signalisation induite dans le lymphocyte T

Suite à l'activation des voies TCR et CD28, l'expression du CTLA4 est augmentée dans le lymphocyte T (Perkins et al., 1996). La translocation membranaire de CTLA4 dépend de la force d'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide. Ainsi une interaction forte induit une augmentation importante d'expression de CTLA4 permettant de limiter l'hyperactivation du lymphocyte T. L'engagement du CTLA4 induit un signal inhibiteur en bloquant la prolifération des lymphocytes T ainsi qu'en inhibant les voies du TCR. Il induit ainsi l'entrée du lymphocyte T dans un état d'anergie (Olthoff et al., 1997).

Le CTLA4 possède dans sa partie intracellulaire un motif YVKM important pour la médiation du signal issu de l'activation de CTLA4 (Rudd et al., 2009). La fixation des protéines phosphatases SHP2 et PP2A sur ce motif va induire la déphosphorylation de CD3 ζ , LAT et ZAP-70 et ainsi bloquer la voie de signalisation du TCR (Rudd et al., 2009). De plus, ces phosphatases vont induire le blocage de NF- κ B et AP1 (activator protein 1) par inhibition de la phosphorylation d'ERK et JNK (Jun kinase), aboutissant au blocage du cycle cellulaire et de la production d'IL-2 (Olsson et al., 1999). De manière intéressante, le motif YVKM permet aussi la liaison à PI3K et l'activation d'Akt comme CD28. Cette interaction a été proposée comme un mécanisme pour prévenir la mort des cellules anergiques (Schneider et al., 2008) (figure 36).

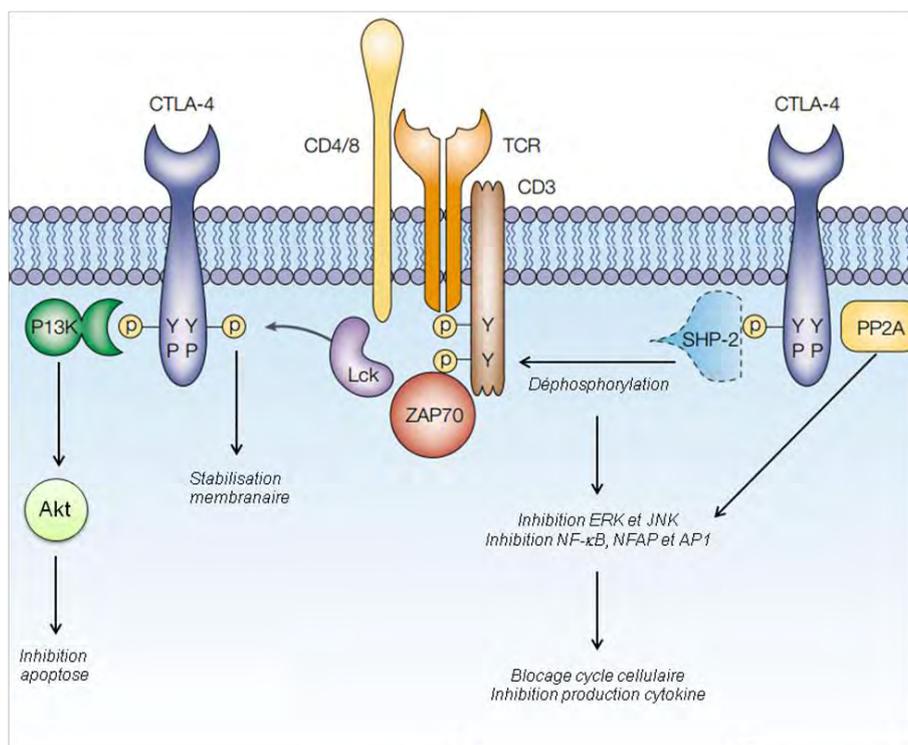


Figure 36 : Signalisation induite par l'activation de CTLA4. L'activation de CTLA4 par liaison à CD80-CD86 engendre le recrutement des phosphatases SHP2 et PP2A au niveau du motif YVKM intracellulaire de CTLA4. Ces phosphatases vont inhiber les voies du TCR en déphosphorylant les protéines CD3ζ et ZAP-70 notamment. De plus, elles vont inhiber les voies ERKs et JNKs et donc inhiber les facteurs de transcriptions NF-κB, NFAT et AP1 concourant au blocage du cycle cellulaire et à l'inhibition de la production de cytokines (IL-2). Parallèlement, la fixation de PI3K sur CTLA4 induit l'activation d'Akt permettant d'inhiber l'apoptose des LT anergiques. Adapté d'Alegre et al., 2001.

b- Signalisation induite dans la CPA

La stimulation des récepteurs CD80-CD86 par le CTLA4 et le CTLA4-Ig (molécule de fusion entre le CTLA4 et le fragment Fc d'une IgG humaine) entraîne la production d'IFNγ par les CPA via l'activation des voies NF-κB, p38MAPK et STAT1 (Finger and Bluestone, 2002). L'IFNγ sécrété va agir de manière autocrine sur la CPA et engendrer l'expression d'IDO (Grohmann et al., 2002; Guillot et al., 2003; Sucher et al., 2012). IDO est une enzyme intracellulaire catalysatrice du tryptophane dans la voie de production de la kynurénine. L'activation d'IDO induit un appauvrissement du microenvironnement en tryptophane, acide aminé essentiel pour la prolifération et la survie des lymphocytes T (Mellor and Munn, 2004). De plus, l'activation d'IDO induit un enrichissement en métabolites issus du catabolisme du tryptophane (kynurénine et acide hydroxyanthranilique) qui vont

inhiber la prolifération des LT et induire leur apoptose (Bauer et al., 2005). Le CTLA4 permet ainsi le blocage de l'activation des LT en activant les propriétés immunosuppressives des CPA (figure 37).

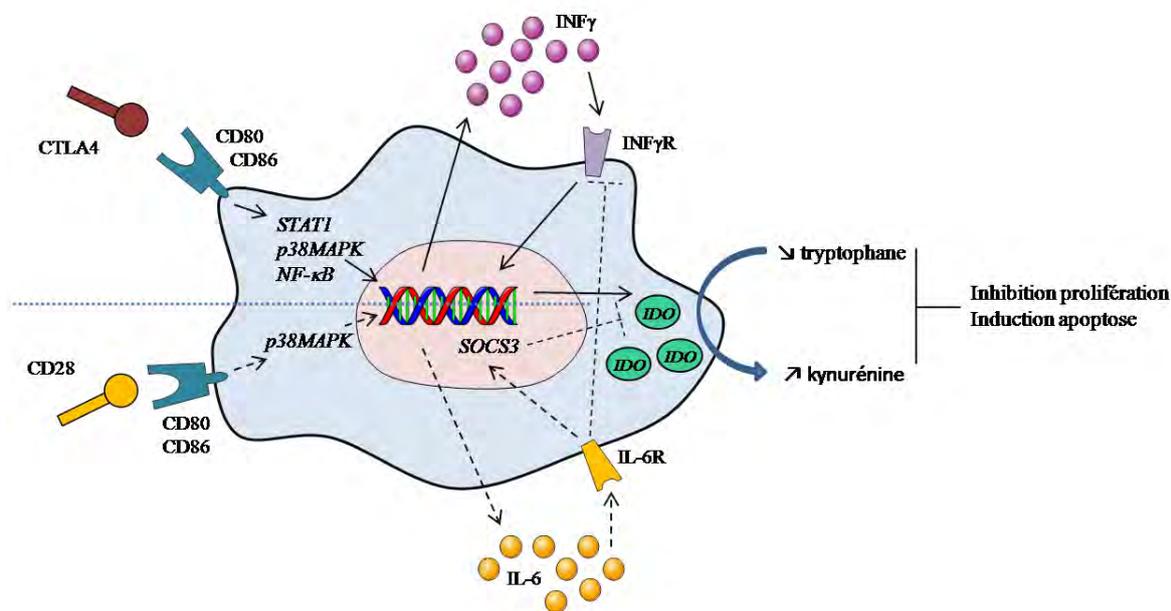


Figure 37 : Action différentielle de CTLA4 et CD28 sur la signalisation de CD80-CD86 dans les CPA. L'activation de CD80-CD86 par CTLA4 induit la sécrétion d'IFN γ par activation des voies STAT1, p38MAPK et NF- κ B. L'action autocrine induit l'expression d'IDO qui va dépléter le milieu en tryptophane et l'enrichir en kynurénine. L'action combinée de la diminution de tryptophane et l'augmentation de kynurénine engendre l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et la kynurénine induit l'apoptose des lymphocytes T. L'activation de CD80-CD86 par le CD28 induit la sécrétion d'IL-6 par activation de la voie p38MAPK. L'action autocrine d'IL-6 résulte en l'inhibition d'IDO via l'induction de l'expression de SOCS3 et l'inhibition du récepteur à IFN γ .

De manière intéressante, une étude vient de montrer que CTLA4-Ig (et donc potentiellement le CTLA4 endogène) modulait le profil inflammatoire des macrophages (Fujii et al., 2013). En effet, nous avons vu que les macrophages peuvent présenter deux états d'activation suivant le stimulus qu'ils reçoivent. Ils peuvent adopter un profil M1 (pro-inflammatoire) ou M2 (anti-inflammatoire) (Mosser and Edwards, 2008). L'induction de l'un ou l'autre des profils est importante puisque cela régule différemment les lymphocytes T. En effet, les macrophages M1 vont maintenir l'inflammation locale en induisant notamment la différenciation des lymphocytes T vers un profil pro-inflammatoire (Th1) alors que les macrophages M2 vont réduire l'inflammation en induisant la différenciation des

lymphocytes T vers un profil anti-inflammatoire (Th2) (Mills, 2012). Cette étude a montré que CTLA4-Ig induisait une modification du profil M1 des macrophages vers un profil M2 notamment en induisant l'expression de l'arginase 1 et du CD206 (Fujii et al., 2013). En plus d'une action sur l'activation des lymphocytes T, l'activation des récepteurs CD80-CD86 par CTLA4 va engendrer des modifications de l'environnement inflammatoire.

3-La voie de co-stimulation CD28/CD80-CD86/CTLA4 dans le système nerveux central

Au sein du SNC, l'expression des récepteurs de co-stimulation CD80-CD86 a été rapportée sur la majorité des types de cellules du cerveau suivant les modèles expérimentaux. Cependant un consensus semble émerger sur le fait qu'il n'y ait pas d'expression de CD80-CD86 dans le cerveau de rongeur adulte en conditions physiologiques (Cross and Ku, 2000). La microglie semble être la cellule exprimant préférentiellement CD80-CD86. En effet, dans des modèles de sclérose en plaques chez la souris, induite par infection virale ou par injection d'un peptide de la protéine MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), il a été montré l'expression de CD80 et CD86 par la microglie (Duncan and Miller, 2011; Magnus et al., 2005). La microglie semble exprimer uniquement CD86 dans des modèles de lésions (lésion des nerfs facial et lombaire et lésion du cortex enthorinal) (Bechmann et al., 2001; Bohatschek et al., 2004; Rutkowski et al., 2004). Il semble donc que l'expression microgliale de CD80 soit dépendante du modèle utilisé. *In vivo*, CD80 a aussi été montré comme étant exprimé par les cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire et les astrocytes dans des modèles de sclérose en plaques (Imitola et al., 2004; Zeinstra et al., 2003). En culture, l'expression de CD80-CD86 par la microglie a été montrée à la fois sur les lignées cellulaires, sur des cultures primaires de microglies et sur des microglies humaines issues de tumeurs (Acevedo et al., 2013; Dangond et al., 1997; Iglesias et al., 1997; Wolf et al., 2001). De plus, il apparaît que l'IFN γ induit une augmentation de l'expression de CD80-CD86 *in vitro* (Badie et al., 2002; Iglesias et al., 1997). Les astrocytes semblent aussi exprimer CD80-CD86 lorsqu'ils sont stimulés avec de l'IFN γ (Nikceovich et al., 1997; Zeinstra et al., 2006). Enfin, une étude a aussi montré que les neurones

pouvaient exprimer CD80, notamment lorsqu'ils sont stimulés par l'IFN γ et pouvaient ainsi interagir et moduler la différenciation des lymphocytes T (Liu et al., 2006a).

Bien qu'exprimées au sein du SNC, on ne connaît pratiquement rien de la fonction de ces molécules dans le SNC et la molécule agoniste CTLA4-Ig a été utilisée comme thérapie uniquement dans un but immunosuppresseur. Cependant, des études suggèrent une fonction possible des récepteurs CD80-CD86 dans le cerveau. En effet, il a été montré dans un modèle de sclérose en plaques que l'injection intracérébrale de CTLA4-Ig était plus efficace comparée à une injection périphérique pour ralentir le développement de la maladie (Croxford et al., 1998). De plus, l'injection intracérébrale d'un anticorps anti-CD86 ralentit aussi le développement de la maladie. Une hypothèse, soulevée par les auteurs, serait que le CTLA4-Ig et l'anti-CD86 injectés dans le SNC permettraient le blocage de la réponse T en inhibant la voie de co-stimulation CD28/CD80-CD86/CTLA4 mais pourraient aussi agir directement sur les cellules du CNS exprimant CD80-CD86 et induire le ralentissement de la maladie. De plus, une étude *in vitro* a montré, dans des co-cultures de lymphocytes T et de microglies, que les changements morphologiques de la microglie d'un état ramifié vers un état amiboïde, induit par l'agrégation des lymphocytes T sur la microglie, étaient inhibés en présence de CTLA4-Ig (Chabot et al., 1999). Cependant étant donné que CTLA4-Ig peut induire à la fois le blocage de l'interaction lymphocyte T/microglie et induire une signalisation via CD80-CD86 dans la microglie, ces observations ne permettent pas de déterminer si l'action du CTLA4-Ig sur la microglie est directe.

Ainsi, bien que CD80 et CD86 soient exprimés par les cellules du cerveau, notamment par la microglie, leur rôle reste inconnu.

Objectifs de la thèse

Au cours de l'introduction, nous avons vu que le SI participait au développement et au fonctionnement physiologique du cerveau, aussi bien par l'influence des cellules du système immunitaire que par l'expression de molécules dites immunes au sein du SNC. C'est dans ce contexte que notre étude s'est focalisée sur la protéine adaptatrice CD3 ζ et la voie de co-stimulation CTLA4/CD80-CD86, connues pour leur rôle dans l'activation des lymphocytes T.

La protéine adaptatrice CD3 ζ a été montrée comme étant exprimée dans les neurones du SNC où elle est particulièrement impliquée dans le développement des dendrites au niveau de l'hippocampe et du système visuel. Cependant CD3 ζ est aussi exprimée par les neurones tout au long du développement neuronal, que ce soit au stade de la cellule souche neurale ou au niveau du neurone mature, suggérant un rôle de CD3 ζ dans d'autres étapes du développement neuronal que la dendritogenèse. De plus, des altérations de la plasticité synaptique ont été enregistrées dans l'hippocampe et dans le cortex des souris déficientes pour CD3 ζ , suggérant un rôle de CD3 ζ dans les fonctions synaptiques. Cependant, on ignore encore par quels mécanismes CD3 ζ régulerait les fonctions cérébrales.

Dans une première étude (Article I) nous nous sommes intéressés à la fonction et aux mécanismes de CD3 ζ dans la neuritogenèse. Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression et le rôle de CD3 ζ sur l'émergence des premiers filopodes et neurites à des stades précoces du développement. Nous avons ensuite identifié la voie moléculaire associée à CD3 ζ participant à l'émergence des filopodes et à la croissance des neurites.

Dans une seconde étude (Article II), nous nous sommes focalisés sur le rôle de CD3 ζ chez l'adulte. Les altérations de la plasticité synaptique décrites chez la souris déficiente pour CD3 ζ nous ont conduit à étudier l'apprentissage et la mémoire des souris CD3 ζ ^{+/+} et CD3 ζ ^{-/-}. Compte tenu des déficiences immunitaires des souris CD3 ζ ^{-/-}, qui pourraient agir secondairement sur les fonctions cérébrales, nous avons rétabli le système immunitaire de ces souris par greffe de moelle osseuse. Afin

de caractériser les mécanismes moléculaires impliquant CD3 ζ dans les fonctions cognitives, une combinaison d'approches cellulaires et biochimiques a été développée pour identifier des partenaires synaptiques de CD3 ζ et caractériser la composition des synapses glutamatergiques. L'induction chimique de la LTP sur des cultures de neurones issus de souris CD3 ζ ^{+/+} et CD3 ζ ^{-/-} nous a permis d'analyser la fonction de CD3 ζ dans les réorganisations moléculaires associées à la plasticité synaptique.

Concernant la voie de costimulation CTLA4/CD80-CD86, il a été montré, dans plusieurs pathologies liées à une inflammation du SNC, l'expression des récepteurs CD80 et CD86 par les neurones, les astrocytes et, de façon très majoritaire, les microglies. Mise à part ces quelques études descriptives, on ne connaît rien de la fonction de ces récepteurs dans le cerveau. Dans une troisième étude (projet 2), nous nous sommes intéressés à la fonction de CD80-CD86 dans un modèle *in vivo* de greffe intracérébrale chez le rat induisant une expression importante de CD86 sur la microglie. Nous avons étudié les conséquences de la stimulation des récepteurs CD80-CD86 par la molécule CTLA4-Ig sur la morphologie microgliale et la pousse de l'axone des cellules greffées. Pour mieux comprendre les mécanismes d'action de CTLA4-Ig sur la microglie, nous avons utilisé un modèle de culture mixte d'astrocytes et de microglies de rats traitées par CTLA4-Ig. La morphologie microgliale et l'expression de facteurs inflammatoires et neurotrophiques ont été analysées, nous permettant de proposer un rôle du CD86 microglial sur les cellules du SNC.

L'ensemble de ces études ont permis de mettre en évidence de nouvelles fonctions de la molécule immune CD3 ζ sur les étapes précoces du développement neuronal ainsi que sur la plasticité cérébrale. L'étude des récepteurs CD80-CD86 microgliaux a permis de démontrer un impact de la molécule CTLA4-Ig sur la pousse neuronale. Une meilleure connaissance du rôle de molécules dites de l'immunité sur la physiologie et le fonctionnement des cellules du SNC est particulièrement importante pour appréhender les interactions neuro-immunes, notamment en utilisant le SI pour moduler le SNC mais aussi pour adapter, comprendre et prévenir les conséquences neurologiques des thérapies ciblant le SI.

RESULTATS

RESULTATS

Projet 1 : Etude de la molécule adaptatrice CD3 ζ dans le SNC

Article I: The immune molecule CD3 ζ and its downstream effectors ZAP-70/Syk mediate ephrin signaling in neurons to regulate early neuriteogenesis.

Publié dans Journal of Neurochemistry, 119(4):708-22

Article II: Impaired spatial memory in mice lacking CD3 ζ is associated with altered NMDA and AMPA receptors signaling but independent of T cell deficiency

En révision

ARTICLE I: The immune molecule CD3 ζ and its downstream effectors ZAP-70/Syk mediate ephrin signaling in neurons to regulate early neuritogenesis.

Julie Angibaud ^{123*}, Antoine Louveau ^{123*}, Stéphane J. Baudouin ¹²³, Véronique Nerrière-Daguin ¹²³, Sarah Evain ¹²³, Virginie Bonnamain ¹²³, Philippe Hulin ³⁴, Zsolt Csaba ⁵, Pascal Dournaud ⁵, Reynald Thinard ¹²³, Philippe Naveilhan ¹²³, Nelly Noraz ⁶, Véronique Pellier-Monnin ⁶, and Hélène Boudin ¹²³

Journal of Neurochemistry, 119(4):708-22

¹INSERM, UMR 643, Nantes, F44000 France

²CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITUN, Nantes, F44000 France

³Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France

⁴IFR26, Plateforme PiCell, Nantes, F44000 France

⁵INSERM, UMR 676, Paris, France

⁶INSERM, U842, Lyon F-69372 France ; Université Lyon 1, UMR-S892 Lyon, F-69003 France

*Co-premiers auteurs

Des travaux préliminaires menés au sein du laboratoire avaient mis en évidence une expression très précoce de CD3 ζ sur les précurseurs neuronaux ainsi qu'au cours des premières étapes du développement neuronal. Dans cette étude nous avons étudié le rôle de CD3 ζ dans les étapes précoces du développement neuronal, notamment au niveau de la neuritogénèse. Nous avons montré que CD3 ζ était exprimé sur les neurones post-mitotiques, avant même leur différenciation morphologique. A ce stade, une analyse par vidéomicroscopie de neurones transfectés avec CD3 ζ -EGFP a révélé que les microdomaines enrichis en CD3 ζ correspondaient au site d'émergence d'un futur neurite. Cette surexpression de CD3 ζ favorise la formation des filopodes via la voie de signalisation dépendante de la protéine Rho-GEF Vav2, au détriment de l'émergence des neurites. A l'inverse, les neurones provenant de souris CD3 ζ ^{-/-} présentent une diminution du nombre de filopodes et une augmentation du nombre de neurites. Afin de préciser les mécanismes impliqués dans l'action inhibitrice de CD3 ζ sur l'émergence des neurites, nous avons analysé une voie signalétique candidate, qui est la voie de l'éphrine A1/EphA4. Nous avons montré que la stimulation par l'éphrine A1 induisait une co-agrégation de CD3 ζ , des kinases activées ZAP-70/Syk, et des récepteurs EphA4. De plus, l'effondrement du cône de croissance induit par l'éphrine A1 est abrogé dans les neurones CD3 ζ ^{-/-}, et est réduit par l'inhibition de ZAP-70/Syk, suggérant que la voie CD3 ζ -ZAP-70/Syk est requise dans la régulation de la neuritogénèse par la voie éphrine A1/EphA4 (figure 38).

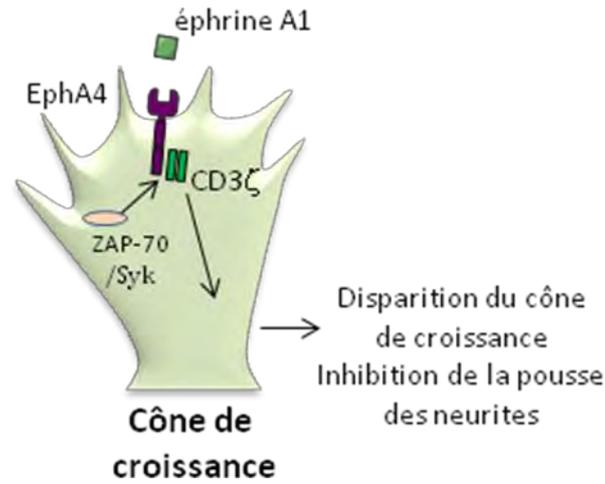


Figure 38 : Implication de CD3 ζ et des kinases ZAP-70/Syk dans la voie éphrine A1/EphA4. *L'interaction de CD3 ζ avec EphA4 permet l'agrégation des kinases ZAP-70/Syk avec EphA4 lors de la stimulation de ce dernier par l'éphrine A1. CD3 ζ participe ainsi à la disparition du cône de croissance induit par l'éphrine A1, inhibant ainsi la pousse des neurites.*

ORIGINAL
ARTICLE

The immune molecule CD3zeta and its downstream effectors ZAP-70/Syk mediate ephrin signaling in neurons to regulate early neuritogenesis

Julie Angibaud,^{*†‡²} Antoine Louveau,^{*†‡²} Stéphane J. Baudouin,^{*†‡¹}
Véronique Nerrière-Daguin,^{*†‡} Sarah Evain,^{*†‡} Virginie Bonnamain,^{*†‡}
Philippe Hulin,[§] Zsolt Csaba,[¶] Pascal Dournaud,[¶] Reynald Thinard,^{*†‡}
Philippe Naveilhan,^{*†‡} Nelly Noraz,^{**††} Véronique Pellier-Monnin^{**††}
and Hélène Boudin^{*†‡}

^{*}INSERM, UMR 643, Nantes, France

[†]CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITUN, Nantes, France

[‡]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

[§]Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) IFR26, Nantes, France

[¶]Inserm, UMR 676, Paris, France

^{**}INSERM, U842, Lyon, France

^{††}Université Lyon 1, UMR-S842 Lyon, France

Abstract

Recent studies have highlighted the key role of the immune protein CD3 ζ in the maturation of neuronal circuits in the CNS. Yet, the upstream signals that might recruit and activate CD3 ζ in neurons are still unknown. In this study, we show that CD3 ζ functions early in neuronal development and we identify ephrinA1-dependent EphA4 receptor activation as an upstream regulator of CD3 ζ . When newly born neurons are still spherical, before neurite extension, we found a transient CD3 ζ aggregation at the cell periphery matching the initiation site of the future neurite. This accumulation of CD3 ζ correlated with a stimulatory effect on filopodia extension via a Rho-GEF Vav2 pathway and a repression of neurite outgrowth. Conversely, cultured neurons lacking CD3 ζ isolated from CD3 $\zeta^{-/-}$ mice

showed a decreased number of filopodia and an enhanced neurite number. Stimulation with ephrinA1 induces the translocation of both CD3 ζ and its activated effector molecules, ZAP-70/Syk tyrosine kinases, to EphA4 receptor clusters. EphrinA1-induced growth cone collapse was abrogated in CD3 $\zeta^{-/-}$ neurons and was markedly reduced by ZAP-70/Syk inhibition. Moreover, ephrinA1-induced ZAP-70/Syk activation was inhibited in CD3 $\zeta^{-/-}$ neurons. Altogether, our data suggest that CD3 ζ mediates the ZAP-70/Syk kinase activation triggered by ephrinA-activated pathway to regulate early neuronal morphogenesis.

Keywords: ephrin, filopodia, growth cone, neuronal differentiation, protein tyrosine kinase, Rho-GEF.

J. Neurochem. (2011) **119**, 708–722.

Recent evidence indicates that several molecules initially thought to be restricted to the immune system are also expressed in the central nervous system (CNS) where they contribute to specific nervous functions (Kioussis and

Received February 11, 2011; revised manuscript received August 23, 2011; accepted August 24, 2011.

Address correspondence and reprint requests to Dr Hélène Boudin, INSERM U643 – ITUN, 30 Bld Jean Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France. E-mail: helene.boudin@univ-nantes.fr

¹Present address: Biozentrum Universität Basel, CH-4056, Switzerland.

²These authors contributed equally to this work.

Abbreviations used: DIV, days *in vitro*; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; EGFP, enhanced green fluorescence protein; FCS, fetal calf serum; GEF, guanine-nucleotide exchange factors; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; MEM, minimal essential medium; mGFP, membrane-associated form of GFP; MHC I, major histocompatibility complex class I; NK, natural killer; NPC, neural precursor cell; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde; PIC, cocktail of protease inhibitor; TBS, Tris-buffered saline; TCR, T-cell receptor; WT, wild-type.

Pachnis 2009; McAllister and van de Water 2009). In particular, members of the major histocompatibility complex class I (MHC I) and their related receptors and signaling molecules are expressed in neurons and have been shown to play critical roles in the development and plasticity of the CNS (Boulanger and Shatz 2004; Thams *et al.* 2008). We have focused our work on one such molecule, CD3zeta (CD3 ζ), a transmembrane adaptor signaling protein first characterized in T cells as a component of the CD3 complex, the signaling module of the T-cell receptor (TCR). This receptor recognizes peptide fragments presented by MHC molecules and is thus responsible for antigenic recognition (Samelson *et al.* 1985). CD3 ζ is instrumental in these processes because it is required for receptor-mediated signal transduction through its three copies of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) (Pitcher and van Oers 2003). In natural killer (NK) cells, CD3 ζ associates with other receptors, such as NKp30 and NKp60, and functions independently of the other CD3 subunits, which are absent from NK cells, indicating that the sole presence of CD3 ζ is sufficient to efficiently mediate intracellular signaling (Lanier 2001). Evidence of a non-immune function of CD3 ζ in the CNS came from knock-out mice exhibiting a developmental failure in the segregation of retinal ganglion cell axon projections to the lateral geniculate nucleus of the thalamus (Huh *et al.* 2000; Xu *et al.* 2010). In addition, genetic inactivation of CD3 ζ results in impaired hippocampal synaptic plasticity (Huh *et al.* 2000; Barco *et al.* 2005) and reduced glutamatergic synaptic activity in the retina (Xu *et al.* 2010). The regulation of neuronal connectivity and synaptic transmission achieved by CD3 ζ is associated with a prominent action on neuronal morphology, particularly in dendrite shaping. In the retina of CD3 ζ -deficient mice, retinal ganglion cells have a reduced dendritic motility and an increased dendritic arborization complexity (Xu *et al.* 2010). In hippocampal cultured neurons, the activation or knock-down of CD3 ζ respectively inhibits or promotes dendritic growth and branching (Baudouin *et al.* 2008). The extracellular factors and upstream signals that might recruit and activate CD3 ζ in neurons are still unknown.

We have previously shown the early expression of CD3 ζ in immature neurons *in vitro*, before dendrite development, and even before the emergence of the first neurites (Baudouin *et al.* 2008), suggesting a potential role of CD3 ζ during the early steps of neuronal differentiation.

In this study, we examined the role of CD3 ζ during the early steps of neuronal morphological differentiation and searched for an associated signaling pathway. Our data showed that CD3 ζ is expressed by recent post-mitotic neurons and participates in the initial filopodia and neurite sprouting program in part through a Rho-GEF Vav2 pathway, resulting in a reduction of neurite emergence. We found that ephrinA1 is an upstream signal leading to the recruitment of CD3 ζ to activated EphA4 receptor clusters and to the activation of the

CD3 ζ downstream effector molecules, ZAP-70/Syk tyrosine kinases. Moreover, we showed that CD3 ζ is required for ephrinA1-induced growth cone collapse and ZAP-70/Syk kinases activation. Together, this study unravels a CD3 ζ -dependent signaling pathway downstream of ephrinA1/EphA4 as a novel mechanism for early neuronal morphogenesis.

Materials and methods

All protocols were carried out in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals (agreement no. 75-669).

Plasmid constructs

The plasmid encoding rat CD3 ζ fused at the C terminus with enhanced green fluorescence protein (EGFP; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was produced as previously described (Baudouin *et al.* 2008). A membrane-associated form of GFP (mGFP) was produced by addition of the GAP43 membrane anchoring signal as previously described (Moriyoshi *et al.* 1996). Expression vector for Myc-tagged wild-type Vav2 was constructed by inserting the full-length Vav2 cDNA into pCIneo-Myc (Myc-Vav2). A dominant negative form of Vav2 (Vav2-DN) was constructed by site-directed mutagenesis to substitute Leu212 to Gln as previously described (Kawakatsu *et al.* 2005).

Cell cultures

Culture of neural precursor cell

Cultures of neural precursor cells (NPCs) from E15 Sprague-Dawley rat brain were established as previously described (Sergent-Tanguy *et al.* 2006). Briefly, tissues freed of meninges were incubated with 0.25% trypsin for 15 min at 37°C. Following addition of 10% fetal calf serum (FCS; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), tissues were exposed to 10 μ g/mL of Dnase I prior to mechanical trituration. Aggregates were removed by decantation and cells were further purified from small debris by centrifugation. Cells were resuspended in medium composed of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/ Ham's F12 (1/1, v/v), 33 mM glucose, 5 mM HEPES (pH 7.2), 100 μ g/mL streptomycin, 100 UI/mL penicillin (serum-free medium) and supplemented with 10% FCS (serum-supplemented medium) and plated in a dish for one night. The following day, the floating cells were recovered, washed and resuspended in the serum-free medium supplemented with N2 (Invitrogen). Cells were then plated in uncoated dishes and expanded as neurospheres for 10 days (including a passage at day 7) in the presence of 25 ng/mL basic fibroblast growth factor in serum-free medium supplemented with N2. Neurospheres were then collected, enzymatically dissociated with trypsin-EDTA to give a single-cell suspension. Cells were plated at a density of 2×10^5 cells/cm² on poly-L-ornithine-coated coverslips (50 μ g/mL; Sigma, St Louis, MO, USA) in serum-supplemented medium for 2 h, and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), 4% sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min.

Culture of hippocampal neurons, transfection, and pharmacological treatments

Cultures of astrocytes were first prepared to constitute a glial feeder layer. Briefly, cortexes were dissected from P1 newborn rat

forebrains and dissociated by trypsin and Dnase. Cells were then plated at a density of 35×10^3 cells/cm² in minimal essential medium (MEM) containing 10% FCS, 0.6% D-glucose, 100 µg/mL streptomycin. The medium was replaced with serum-free MEM containing N2 supplements 24 h before the neuron culture. Rat hippocampal culture was prepared from 18-day-old rat embryos by previously described methods (Goslin *et al.* 1998). Hippocampi were dissected and enzymatically dissociated with trypsin and mechanical trituration. Cells were plated at 4×10^3 cells/cm² on glass coverslips coated with poly-L-lysine (1 mg/mL; Sigma) in neuronal plating medium composed of MEM containing 10% FCS, 0.6% D-glucose, 100 µg/mL streptomycin, 100 UI/mL penicillin and 1 mM sodium pyruvate. Cells were transferred 3 h later to a dish containing a glial feeder layer and maintained for up to 3 days in serum-free MEM containing N2 supplements. For mouse hippocampal neuron culture, the same procedure was used except that cells were prepared from E17 mice brain expressing a non-functional truncated CD3ζ gene (CD3ζ^{-/-} mice) (Malissen *et al.* 1993) or heterozygous (CD3ζ^{+/-}) or wild-type (WT) littermate mice (EDTA, Orleans). Animals were maintained as heterozygotes on a C57BL/6 background and embryos were genotyped by PCR amplification as described previously (Malissen *et al.* 1993). For transfection of rat cortical neurons, dissociated cells (3.5×10^3) were mixed with 3 µg of either CD3ζ-EGFP, mGFP or EGFP and 3 µL of lipofectamine 2000 (Invitrogen) in a serum and streptomycin-free MEM containing N2 supplements. For cotransfection experiments, EGFP or CD3ζ-EGFP cDNA (3 µg) was mixed with Vav2 cDNA constructs (6 µg) and 9 µL of lipofectamine 2000. After 60 min of incubation, cells were plated at 40×10^3 cells/cm² on glass coverslips as described above. Neurons were fixed at the indicated time in 4% PFA, 4% sucrose in PBS for 15 min. For growth cone collapse assay, clustered ephrin was first produced by incubation of 2.5 µg ephrinA1-Fc or Fc control (R&D System, Minneapolis, MN, USA) with 4.5 µg goat anti-human for 45 min at 22°C, then diluted 1/20 in conditioned medium. Neurons at 2 days *in vitro* (DIV) were then treated with 2.5 µg/mL pre-clustered ephrinA1-Fc or Fc as a control for 45 min at 37°C, fixed and immunostained as described below for growth cone analysis. For ephrin A1 surface labelling, neurons at 2 DIV were incubated with 2.5 µg/mL ephrinA1-Fc or Fc as a control for 30 min at 4°C. The cells were then incubated with a biotinylated anti-human Fc antibody (2.4 µg/mL; Jackson Immuno-Research, West Grove, PA, USA) for 30 min at 4°C, then fixed in PFA and immunostained as described below.

Immunostaining

After fixation, NPCs were permeabilized for 5 min at 22°C in 0.25% Triton X-100 in PBS and nuclear staining was performed with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 min at 22°C. After washings, NPCs were incubated for 30 min at 37°C in PBS containing 10% bovine serum albumin (BSA) and then overnight at 4°C with CD3ζ antibody (1 µg/mL; Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) diluted in PBS containing 3% BSA and 0.02% azide mixed with a Tuj1 antibody (clone SDL3D10, 2.1 µg/mL; Sigma) to label neurons. After washing, cells were incubated for 45 min at 37°C with FITC-conjugated donkey anti-rabbit (7.5 µg/mL) and/or Alexa Fluor568-goat anti-mouse (2 µg/mL) diluted in PBS containing 3% BSA and 0.02% azide. Cells were washed in PBS and mounted with Vectashield (AbCys, Paris, France) on glass slides for analysis on an

Axioskop 2 plus microscope (Zeiss). Pictures were acquired with 63× objective using a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss) driven by AxioVision Release 4.2 software. The same procedure was used for cultured hippocampal neurons with the following antibodies: anti-myc (clone 9E10, 1 µg/mL; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), tau (1.7 µg/mL; Dako, Carpinteria, CA, USA), anti-EphA4 (clone 4C8H5, 3 µg/mL; Invitrogen) and anti-phospho-Y319-ZAP-70/pY352-Syk (1/100; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). For F-actin staining, cells were incubated with Alexa Fluor568-phalloidin (0.2 units/mL; Invitrogen) for 30 min at 37°C prior to immunostaining. The area and number of pY319-ZAP-70/pY352-Syk clusters were quantified using Image J software. To define clusters, threshold for individual neurons was chosen manually and corresponded to at least two times the average intensity of fluorescence in the neurite. Data analysis was performed using Statview. Values indicate mean ± SEM. Group comparison was made by Mann-Whitney test.

Immunoprecipitation and western blot analysis

For immunoprecipitation, COS-7 cells were transfected with CD3ζ-EGFP, myc-EphA4, or both. Briefly, cells were incubated for 3 h at 37°C with 3 µg of DNA and 3 µL of lipofectamine 2000 (Invitrogen) in a serum- and streptomycin-free DMEM, and the medium was changed with DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS), 100 µg/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin. Two days after transfection, the cells were scraped into Tris-buffered saline (TBS) containing a cocktail of protease inhibitor (PIC; Sigma) and solubilized for 4 hours at 4°C in TBS (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4) containing 1% Triton-X-100 and PIC. The cell lysate was centrifuged for 30 min at 40 000 g, and the supernatant (50 µg of proteins) was then incubated overnight with 1 µg of rabbit anti-GFP antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) coupled to protein A sepharose beads (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). After centrifugation for 2 min at 3000 g, the pellet was washed with TBS containing 1% Triton-X-100 and PIC, then twice with Tris-NaCl (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.4) and twice in TBS. After centrifugation for 2 min at 3000 g, the beads were resuspended in Laemmli buffer and loaded on an sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10% acrylamide) for western blot analysis as described below.

For the mouse brain analysis, forebrains from WT and CD3ζ^{-/-} mice were homogenized using a glass Teflon homogenizer in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 320 mM sucrose and PIC. The resulting suspension was centrifuged at 700 g for 10 min. The supernatant was collected, centrifuged at 150 000 g for 30 min and the pellet was resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. The brain homogenate was solubilized in Laemmli buffer and 30 µg of proteins were loaded on an sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (12% acrylamide) and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with 5% dried milk in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 0.45 M NaCl and 0.1% Tween 20 (TBST). The membrane was then incubated overnight with a mouse EphA4 antibody (3 µg/mL; Invitrogen), or a mouse CD3ζ antibody (2.5 µg/mL; Santa Cruz Biotechnology), or GAPDH antibody (0.2 µg/mL; Santa Cruz Biotechnology) diluted in TBST containing 5% dehydrated milk. Membrane was then washed in TBST, incubated for 1 h in peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1 : 3000) or in peroxidase-conjugated donkey anti-mouse antibody (1 : 2000),

and visualized using an enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK). Quantification of EphA4 and GAPDH signal intensity was performed from five WT and CD3 ζ ^{-/-} animals using Image J software and expressed as a percentage of the intensity obtained in control conditions.

Time-lapse fluorescence imaging

Neuron suspension from E18 rat brain, transfected with either CD3 ζ -EGFP, mGFP or EGFP, was plated at a density of 80×10^3 cells/cm² in Lab-Tek dishes (Nunc, Rochester, NY, USA) coated with poly-L-lysine. After 2 h of plating, the medium was replaced with a phenol-free Ringer solution containing 168 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 10 mM Hepes, 10 mM D-Glucose, 1.3 mM CaCl₂ and 1.3 mM MgCl₂, pH 7.4. Dishes were put in a humid chamber at 32°C placed on an inverted microscope leica DMI6000B (Leica Microsystems, Nanterre, France). Pictures were acquired for 6 h every 5 min with 40 \times and 20 \times objectives using a camera CoolSnap HQ2 (Roper Scientific, Evry, France) driven by Metamorph version 7.56 software (Roper Scientific). Movies were reconstructed with Metamorph 7.56 software. Fluorescence intensity profiles measured at sites of neurite emergence were plotted as a function of time using Image J software. The fluorescent signal was considered to cluster when it remained restricted to the site of sprouting and when a transient increase in the intensity reached at least three times the baseline value.

Neuronal morphology analysis

The number and length of primary neurites emerging and the number of filopodia from the cell body were quantified. Neurites were defined as processes that are more than 0.5 μ m in width and are usually tipped by a growth cone. Filopodia are less developed protrusions with a thinner width than neurites (< 0.5 μ m), and show no growth cone at their tip (Dehmelt and Halpain 2004). For experiments involving transfection, 20 transfected neurons per coverslip were randomly acquired with a 63 \times lens and the number of neurites and filopodia was determined for each cell. Analyses were performed in two coverslips from two to four experiments. For WT and CD3 ζ ^{-/-} mouse cultured neurons, 10 fields per coverslips were randomly chosen with a 40 \times objective, and all the neurons present in the selected field were analyzed for their number of neurites exhibiting or not at least five filopodia along their length. Data are presented as average \pm SEM from two to three cultures prepared from different embryos (two coverslips per culture). For growth cone collapse assay, collapsed and uncollapsed growth cones were scored under blinded conditions using standard criteria (Cox *et al.* 1990). Analyses were performed with 3–4 different embryos from WT, CD3 ζ ^{+/-} and CD3 ζ ^{-/-} mice brain from at least 20 cells per animal. Data analysis was performed using Excel and GraphPad Prism 4 and statistical analysis was done by Mann-Whitney and Student's *t*-test. Images were processed and prepared for printing using Adobe Photoshop.

Results

CD3 ζ aggregation at selective sites of the neuronal cell body correlates with neurite emergence

We first studied the cellular distribution of CD3 ζ during the initiation of neuronal morphological differentiation. For this

purpose, the analysis was conducted in primary cultures of NPCs grown as neurospheres, free-floating cellular aggregates which, after dissociation and plating onto glass coverslips, differentiate to generate neuronal and glial cells. The time of plating was considered to be point 0 of differentiation. Compared with a standard neuronal culture from rat brain embryos, this culture system allowed to maximize the number of recent post-mitotic neurons not yet engaged in morphological differentiation. As soon as 2 h after NPC plating, CD3 ζ immunoreactivity was associated with round and smooth Tuj1-positive cells. In these cells, CD3 ζ was distributed in hot spots and stretches at the cell periphery, delimitating at the cell surface several zones highly enriched in CD3 ζ proteins (Fig. 1a). When a bud appeared at one site of the cell, CD3 ζ immunoreactivity was frequently polarized toward this nascent protrusion (Fig. 1b and c). A few hours later, at 6 h post-differentiation, many neurons emitted between two and five neurites that were highly labeled at their tips for CD3 ζ immunoreactivity, similarly to that of neuronal cultures derived from rat brain embryos (Fig. 1d) (Baudouin *et al.* 2008). Interestingly, CD3 ζ accumulation overlapped with cytoskeleton actin-rich regions as indicated by Alexa 568-phalloidin labeling, even when no processes had yet formed (Fig. 1e and f). One hypothesis that arises from these observations is that CD3 ζ targeting to discrete actin-rich sites at the cell surface of differentiating neurons might contribute to the emergence of the first neurites. To test this possibility, time-lapse imaging was performed on freshly dissociated neurons collected from E18 rat brains transfected with CD3 ζ -EGFP to simultaneously follow the distribution of the fluorescent proteins and neurite extension. Control experiments were performed in cells transfected with a membrane-bound form of GFP (mGFP) or EGFP. Sixty minutes after plating, cells were imaged every 5 min for 6 h (Fig. 2). We quantified the number of newly formed neurites for which a CD3 ζ -EGFP aggregation was noted at the site of emergence, prior neurite outgrowth. We found a transient clustering of CD3 ζ -EGFP matching the site of neurite emergence for 64.6 \pm 10.3% of neurites formed during the recording (Fig. 2a, b and e). CD3 ζ -EGFP aggregation first appeared 42.4 \pm 6.8 min before neurite extension, lasted for 31.5 \pm 5.8 min and was no longer detected as a large cluster bordering the cell body 10.3 \pm 2.8 min before process outgrowth. During the last ten minutes, CD3 ζ -EGFP was frequently associated with filopodia, extending and retracting rapidly before the initiation of neurite outgrowth. As soon as the neurite was formed, CD3 ζ -EGFP rapidly concentrated at the tip of the neurite, as observed for endogenous CD3 ζ (Fig. 2a) (Baudouin *et al.* 2008). In control cells transfected with mGFP, the fluorescent protein was mostly uniformly distributed at the cell surface during the recorded period of time and only rarely aggregated at the site of neurite

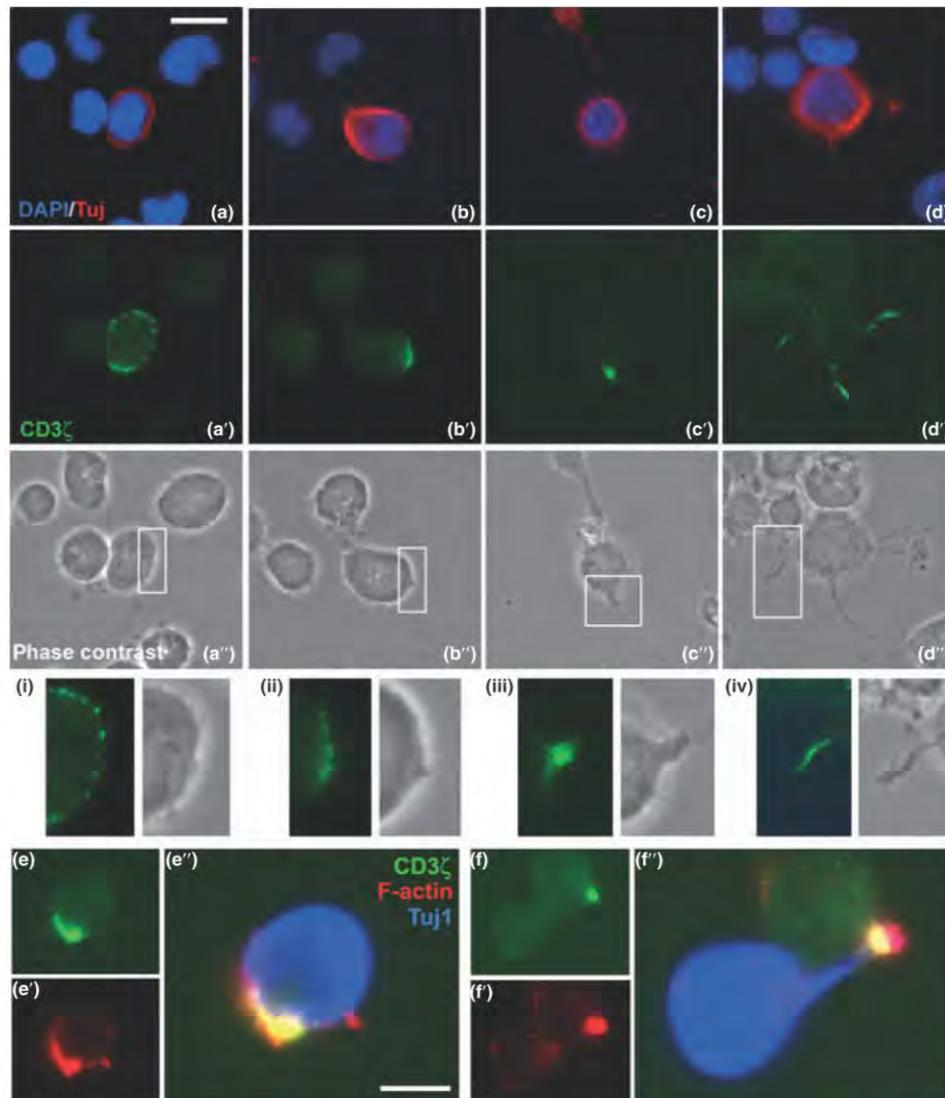


Fig. 1 Distribution of CD3 ζ immunoreactivity in newly born neurons derived from rat NPCs. (a–d'') Double immunolabeling of CD3 ζ (green) and the neuronal marker Tuj1 (red) after 2 h (a–c'') and 6 h (d–d'') of differentiation. Cell nuclei are labeled with DAPI. (i, ii, iii, iv) Magnification of the boxed area in a'', b'', c'' and d''. In spherical newly born neurons, CD3 ζ immunoreactivity is distributed in hot spots and patches at the cell periphery (a–a'' and i). When the neuronal sphere is broken, CD3 ζ immunoreactivity is concentrated at initial budding (b–b''

and ii) and protrusions (c–c'' and iii). During neurite growth, CD3 ζ immunoreactivity redistributes to concentrate at or close to the neurite tip (d–d'' and iv). (e, f) Cells derived from cultured NPCs were labeled after 2 h of differentiation for CD3 ζ (green), Tuj1 (blue) and with Alexa Fluor-568-conjugated phalloidin (red) to visualize F-actin-rich regions. Colocalization between CD3 ζ and F-actin is observed before the initial budding (e–e'') and remained apparent during neurite formation at the tip of growing processes (f–f''). Scale bar, a–d, 10 μ m; e''–f'', 6 μ m.

emergence ($5.7 \pm 3.2\%$; Fig. 2c, d and e). As an additional control, the same procedure was applied to EGFP-transfected cells, which never showed aggregation at the site of neurite emergence (Fig. 2e).

CD3 ζ -EGFP stimulates filopodia formation through a Vav2 pathway

To study the impact of CD3 ζ -EGFP aggregation on the first steps of neurite outgrowth, neurons freshly dissociated from

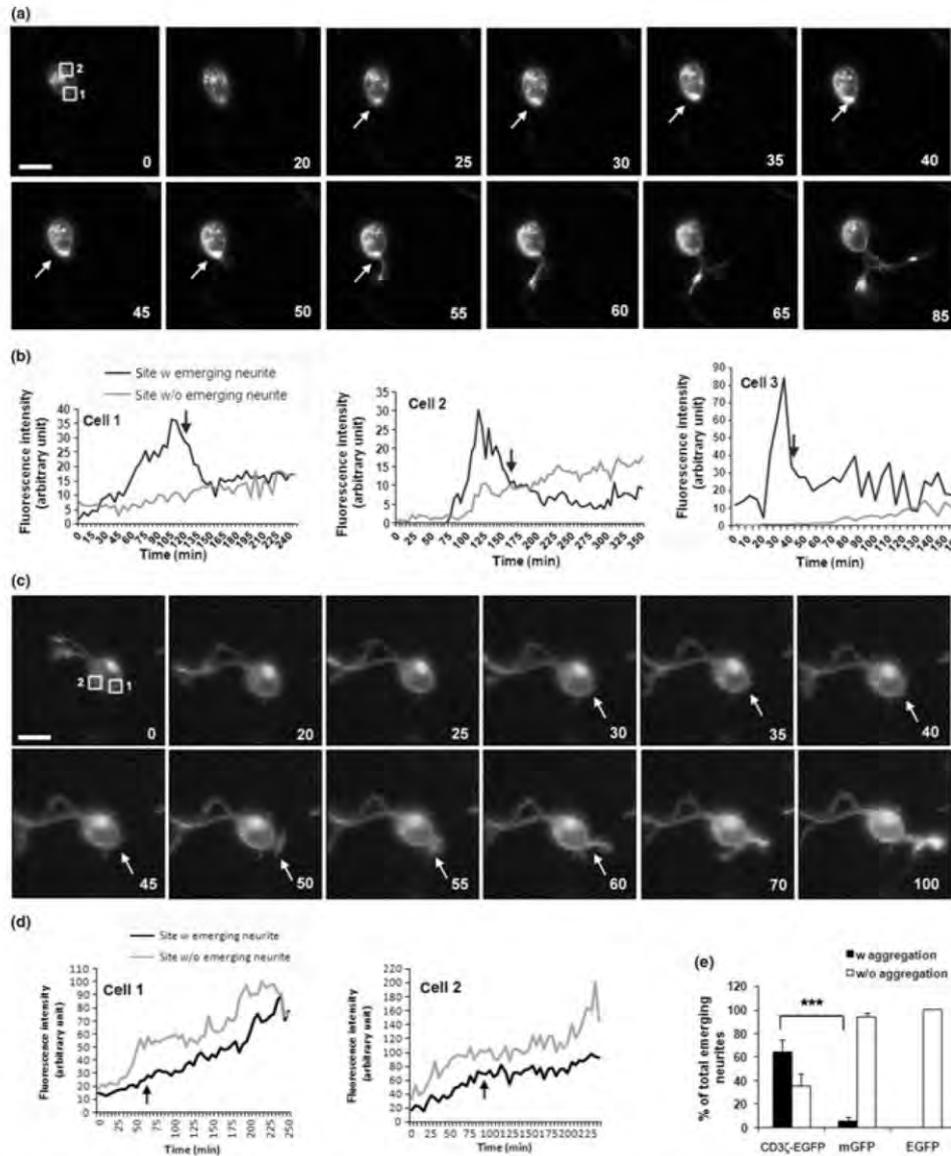


Fig. 2 CD3 ζ accumulation correlates with neurite emergence from neuronal cell body. Time-lapse recording performed immediately after plating of CD3 ζ -EGFP-transfected (a, b) or mGFP-transfected neurons as control (c, d). (a) CD3 ζ -EGFP selectively accumulates in a pole of the cell from which a neurite subsequently emerges (arrow). Boxed areas correspond to the recorded region at the site with (box 1) or without (box2) neurite emergence. (b) Quantification of the fluorescence intensity of CD3 ζ -EGFP measured at sites with (black line) and without (grey line) neurite emergence in 3 representative cells. The fluorescence intensity of CD3 ζ -GFP peaks a few minutes before the emergence of a neurite marked by the arrow. (c) In mGFP-transfected neurons, no selective accumulation of the fluorescent protein was

observed at the site of neurite emergence (arrow). Boxed areas correspond to the recorded region at the site with (box 1) or without (box2) neurite emergence. (d) Quantification of the fluorescence intensity of mGFP measured at sites with (black line) and without (grey line) neurite emergence in two representative cells. The fluorescence intensity of mGFP gradually increases overtime and shows no correlation with neurite initiation marked by the arrow. (e) Quantification of the number of newly formed neurites for which aggregation of the transfected protein was observed or not at the emerging site. Data are presented as percentage of total emerging neurites \pm SEM of 34–37 neurites from 12 to 16 cells analyzed from two experiments. *** $p < 0.001$ (Student's *t*-test) for CD3 ζ -EGFP versus mGFP-transfected neurons. Scale bars, 10 μ m.

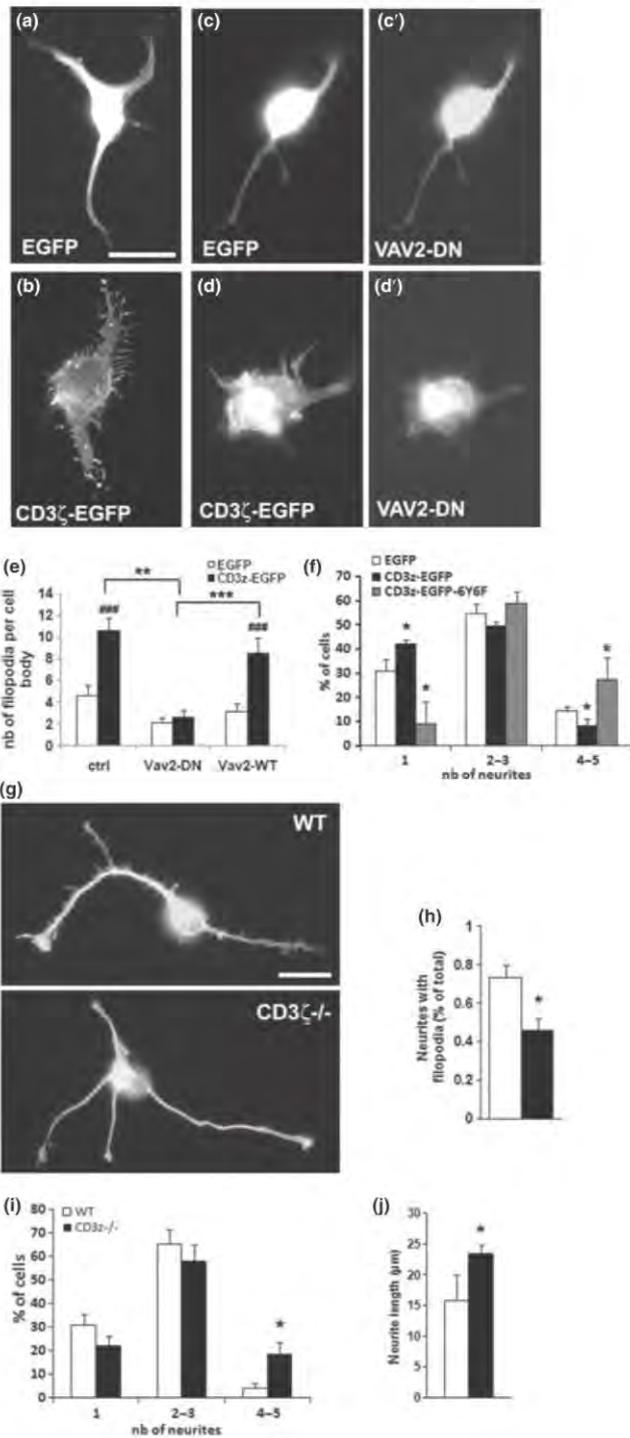
E18 rat brain embryos were transfected with CD3 ζ -EGFP or the control EGFP vector, plated and fixed 24 h later for morphology analysis. Classically, at this stage of culture, hippocampal neurons have developed 1–5 minor neurites that display fine filopodial protrusions (Dotti *et al.* 1988), as we observed in this study. Neurites are defined as processes that are more than 0.5 μ m in width and are usually tipped by a growth cone. Filopodia are less developed protrusions with a thinner width than neurites (< 0.5 μ m) and have no growth cone at their tip. The most striking effect induced by CD3 ζ -EGFP was the presence of numerous neurons exhibiting an unusually high density of filopodia emerging from the cell body, a pattern that was infrequently observed in control EGFP-expressing cells at this stage of culture (Fig. 3a and b). Quantification indicated an average of 4.92 ± 0.99 of filopodia per cell body for EGFP-transfected neurons, and 10.6 ± 1.19 for CD3 ζ -EGFP-transfected cells (Fig. 3c). In addition, CD3 ζ -EGFP expression increased the proportion of neurons containing only one neurite at the expense of those containing 4 to 5 neurites, as compared with EGFP-expressing neurons (Fig. 3f). This finding suggests that CD3 ζ promoted a profuse filopodia formation in young hippocampal neurons that delayed neurite formation. Conversely, when an inactive form of CD3 ζ mutated in its 3 ITAMs was over-expressed, the proportion of neurons exhibiting 4–5 neurites increased while those with one neurite decreased as compared with EGFP-expressing neurons (Fig. 3f), suggesting that CD3 ζ represses neurite emergence. Both filopodia and neurite emergence typically require actin cytoskeleton rearrangements that are highly regulated by small GTPases of the Rho superfamily (da Silva and Dotti 2002). Functional interactions between CD3 ζ and Rho mediated-actin cytoskeleton reorganization have been reported in T cells. Upon binding of MHC-peptide complex to the TCR, CD3 ζ activation induces the phosphorylation of the protein tyrosine kinases ZAP-70/Syk, which in turn serve as docking proteins to recruit signaling molecules, including the Vav family of guanine-nucleotide exchange factors (GEF) for Rho GTPases (Raab *et al.* 1997). Vav activation in T cells participates in cytoskeletal reorganization at the immunological synapse and in clustering of adhesion molecules and receptors (Fischer *et al.* 1998; Tybulewicz 2005). While Vav1 was restricted to the hematopoietic system, Vav2 and 3 were more ubiquitously expressed, notably in neurons for Vav2 (Chauvet *et al.* 2003; Cowan *et al.* 2005). We thus examined whether Vav2 participates in the formation of filopodia induced by CD3 ζ . Freshly dissociated neurons were cotransfected with CD3 ζ -EGFP and either WT Vav2 (Vav2-WT) or a dominant-negative mutant of Vav2 (Vav2-DN), in which Leu212 was replaced by Gln (Kawakatsu *et al.* 2005). Forced expression of Vav2-DN, but not of Vav2-WT, prevented the increase of filopodia formation (Fig. 3c-c', d-d' and e). By contrast, Vav2-DN did not prevent the CD3 ζ -EGFP-dependent effect on primary

neurite number (not shown). Thus, Vav2 likely acted downstream of CD3 ζ to regulate filopodia formation but was not required in the control of the number of primary neurite extensions from the cell body.

To directly assess the role of CD3 ζ in neurite emergence, we examined the morphology of cultured hippocampal neurons lacking functional CD3 ζ . Hippocampal neurons were isolated from E17 mice bearing a targeted mutation in the CD3 ζ gene encoding for a non-functional truncated CD3 ζ (Malissen *et al.* 1993) or WT littermate mice to analyze the morphology of randomly chosen neurons. Neurons were fixed and analyzed at 1 DIV and immunostained for Tau for morphological analysis. Although WT and CD3 $\zeta^{-/-}$ neurons were both competent to form neurites, their morphological profiles were different. Neurites from CD3 $\zeta^{-/-}$ neurons displayed less filopodial extension along their length than WT neurons (Fig. 3g and h). In addition, the number and length of neurites were both enhanced in CD3 $\zeta^{-/-}$ compared with WT neurons (Fig. 3g, i and j). These data suggest that the lack of CD3 ζ in hippocampal neurons limits the sprouting of filopodia along the neurite shaft, causing an acceleration of neurite outgrowth. At 2 DIV, corresponding to a stage of selective axon elongation, neurons from CD3 $\zeta^{-/-}$ mice also showed an increase in neurite length compared with WT neurons. To determine whether the lack of CD3 ζ would differentially affect the growth of the axon versus the minor neurites, the ratio of axonal length/minor neurite length was compared between WT and CD3 $\zeta^{-/-}$ neurons. Similar ratio were found for WT and CD3 $\zeta^{-/-}$ neurons, suggesting that CD3 ζ contributed in the same proportion for axonal and minor neurite outgrowth (ratio axonal length/minor neurite length: 2.9 ± 0.4 for WT; 3.1 ± 0.4 for CD3 $\zeta^{-/-}$, $p = 0.82$).

CD3 ζ is recruited to ephrinA1-activated EphA4 clusters and is required for ephrinA1-induced growth cone collapse of hippocampal neurons

The finding that CD3 ζ -induced filopodia formation in differentiating neurons was mediated through the Rho GEF Vav2 prompted us to explore whether extracellular factors and upstream neurodevelopmental signals reported to require Vav2 might also recruit CD3 ζ . Vav2 has been shown to interact with the receptor tyrosine kinase EphA4 and to be required for ephrinA1-induced EphA4 endocytosis and growth cone collapse (Cowan *et al.* 2005), a strong repulsion event implicated in neurite outgrowth and guidance (Donoghue *et al.* 1996; Gao *et al.* 1998; Brownlee *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2001; Woo *et al.* 2009). We first investigated whether ephrin A1 stimulation of young neurons might induce filopodia formation similarly as we observed upon CD3 ζ over-expression. Neurons at 1 DIV were treated for 45 min with pre-clustered ephrinA1-Fc or control Fc, fixed and immunostained for α -tubulin (tau) to analyze the number of filopodia emerging from the neuronal cell body. As



observed upon CD3 ζ over-expression (Fig. 3e), ephrinA1 stimulation induced an increase in the number of filopodia as compared with Fc application (number of filopodia per cell body: 2.04 ± 0.24 for control, 2.03 ± 0.27 for Fc treatment, 3.53 ± 0.40 for ephrinA1-Fc treatment, $n = 38$, $p < 0.01$; Fig. 4a), raising the possibility of a functional relationship between CD3 ζ and ephrinA1/EphA4 signaling. Upon ephrinA stimulation, EphA4 undergoes autophosphorylation and clustering thought to play an important role in recruiting and activating signaling downstream effectors (Egea *et al.* 2005; Fu *et al.* 2007; Shi *et al.* 2007). We examined whether ephrinA1-induced EphA4 clustering accompanied CD3 ζ redistribution. Hippocampal rat neurons at 2 DIV were

treated for 45 min with pre-clustered ephrinA1-Fc or control Fc, fixed and immunostained for CD3 ζ and EphA4. Under control conditions, both CD3 ζ and EphA4 showed a moderate to low labeling intensity along the developing neurites, contrasting with their apparent enrichment at growth cones (Fig. 4b). EphrinA1 stimulation induced a marked EphA4 receptor clustering along neurites concomitant to a translocation of CD3 ζ in aggregates that largely colocalized with EphA4 clusters, suggesting that ephrinA1-induced EphA4 activation recruited and clustered CD3 ζ to EphA4-associated signaling complexes (Fig. 4b). To determine whether CD3 ζ interacted with EphA4, we examined the ability of CD3 ζ and EphA4 to associate as a complex when

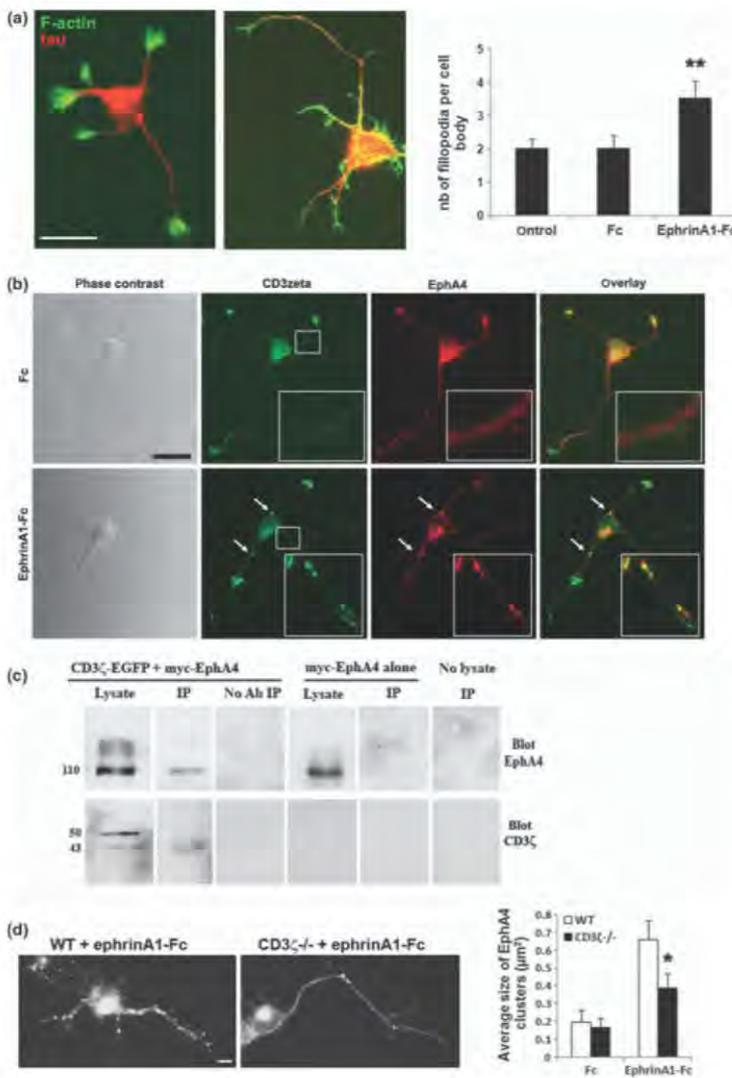


Fig. 4 Coclustering and coimmunoprecipitation of CD3 ζ and EphA4. (a) Cultured neurons from embryonic rat brain were stimulated at 2 DIV for 45 min with 2.5 μ g/mL of pre-clustered Fc or ephrinA1-Fc. After fixation, the neurons were labeled for tau (red) and FITC-conjugated phalloidin (green). Ephrin A1 stimulation induces somatic filopodia formation. ** $p < 0.01$ (Student's *t*-test) compared with control conditions. (b) Cultured neurons from embryonic rat brain were stimulated at 2DIV for 45 min with 2.5 μ g/mL of pre-clustered Fc or ephrinA1-Fc. After fixation, the neurons were immunostained with anti-CD3 ζ (green) and anti-EphA4 (red) antibodies. EphrinA1-Fc treatment induces the formation of overlapping EphA4 and CD3 ζ clusters (arrows). Insets in each panel correspond to the enlarged boxed area. (c) Myc-EphA4 is coimmunoprecipitated with CD3 ζ -EGFP from cotransfected COS-7 cells. COS-7 cells were transfected as indicated and solubilized in 1% Triton X-100. The resulting lysates were immunoprecipitated with a rabbit polyclonal GFP antibody and probed with a mouse EphA4 or CD3 ζ antibody. Input lanes contain 5% of extract used for IP. (d) The ephrin A1-induced aggregation of EphA4 is attenuated in 2 DIV CD3 ζ ^{-/-} neurons compared with WT neurons. * $p < 0.05$ (Student's *t*-test) compared with ephrinA1-Fc-treated WT neurons. Scale bars: a, b, 20 μ m; d, 8 μ m.

coexpressed by transfection in COS-7 cell line. The cells were transfected with CD3 ζ -EGFP in the absence or presence of myc-EphA4 and solubilized using 1% TritonX-100. Two forms of 43 and 50 kDa for CD3 ζ -EGFP were detected by immunoblot (Fig. 4c). The 43 kDa band, corresponded to the expected molecular weight for CD3 ζ -EGFP, while the 50 kDa form likely corresponded to a phosphorylated form of CD3 ζ . Only the 43 kDa form was immunoprecipitated by the GFP antibody, suggesting that the 50 kDa form was inaccessible by the GFP antibody. This might result from the association of the 50 kDa form in a large protein complex preventing the binding of the GFP antibody to CD3 ζ -EGFP. When the cell lysate was immunoprecipitated with a rabbit GFP antibody, myc-EphA4 was coimmunoprecipitated with CD3 ζ -EGFP, indicating that CD3 ζ and EphA4 were associated when coexpressed in the same cells (Fig. 4c). In contrast, when cells were transfected with CD3 ζ -EGFP alone, or myc-EphA4 alone, no EphA4 protein was detected in the immunoprecipitate, indicating the specificity of the coimmunoprecipitation (Fig. 4c). We next asked whether CD3 ζ is required for ephrinA1-induced EphA4 clustering by comparing EphA4 clustering in WT and CD3 ζ ^{-/-} neuron cultures upon ephrinA1 stimulation. We found that the size of EphA4 clusters were significantly lower than those observed in WT neurons (size of EphA4 clusters: $0.20 \pm 0.06 \mu\text{m}^2$ in WT neurons versus $0.17 \pm 0.05 \mu\text{m}^2$ in CD3 ζ ^{-/-} neurons for Fc treatment and $0.66 \pm 0.11 \mu\text{m}^2$ in WT neurons versus $0.39 \pm 0.08 \mu\text{m}^2$ in CD3 ζ ^{-/-} neurons for ephrinA1-Fc treatment; $n = 18-27$, $p < 0.05$; Fig. 4d), suggesting that CD3 ζ contributes to the regulation of ephrinA1-induced EphA4 clustering. Proper clustering of EphA4 receptors is required to elicit the maximal activation of EphA4 signaling, which has been demonstrated to be important for growth cone collapse (Egea *et al.* 2005; Fu *et al.* 2007; Shi *et al.* 2007). We next investigated whether CD3 ζ might be involved in ephrinA1-induced growth cone collapse. Hippocampal neurons derived from WT, CD3 ζ ^{+/-} and CD3 ζ ^{-/-} mice were treated at 2 DIV for 45 min with pre-clustered ephrinA1-Fc or control Fc and the growth cone morphology was examined after immunostaining for α -tubulin and F-actin. Growth cones were scored as collapsed if their peripheral lamellipodia were absent, and if they had fewer than three filopodia, as described previously (Cox *et al.* 1990). Application of the pre-clustered ephrinA1-Fc fusion proteins induced robust growth cone collapse in WT neurons (Fig. 5a and b). In contrast, neurons from CD3 ζ ^{-/-} mice were largely resistant to ephrinA1-induced collapse, while neurons from heterozygote CD3 ζ ^{+/-} mice displayed an intermediate response to ephrinA1-Fc (collapsed growth cones: in WT neurons $35.1 \pm 8.4\%$ for Fc versus $60.1 \pm 6.6\%$ for ephrinA1-Fc, $p < 0.05$; in CD3 ζ ^{+/-} neurons $18.6 \pm 5.6\%$ for Fc versus $49.3 \pm 9.4\%$ for ephrinA1-Fc, $p < 0.01$; in CD3 ζ ^{-/-} neurons $35.4 \pm 8.0\%$ for Fc versus $33.3 \pm 8.4\%$ for ephrinA1-Fc, $p = 0.87$) (Fig. 5b).

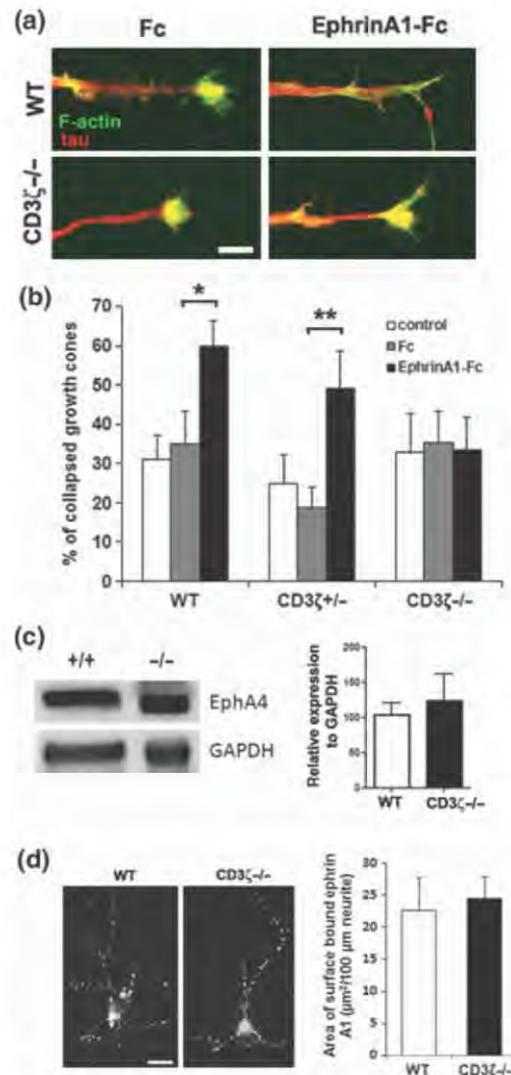


Fig. 5 CD3 ζ mediates ephrinA1-dependent growth cone collapse of hippocampal neurons. (a) Representative growth cones of hippocampal neurons from WT and CD3 ζ ^{-/-} mice treated at 2 DIV with ephrinA1-Fc or Fc as a control, fixed and stained for tubulin with a tau antibody (red) and F-actin (green). Scale bar, 2 μm . (b) The histogram shows average percentages of collapsed growth cones \pm SEM of 60–120 cells from three to four cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (*t*-test). (c) Western blot with EphA4 antibody of forebrain lysate from adult WT (+/+) and CD3 ζ ^{-/-} (-/-) mice. The intensity of EphA4 signal was quantified by densitometry and normalized to the corresponding signal intensity of GAPDH protein. Experimental values represent mean \pm SEM ($n = 5$). (d) WT and CD3 ζ ^{-/-} neurons were incubated for 30 min at 4°C with ephrin A1 to detect ephrin-Eph surface binding. The area of surface bound ephrin A1 is similar in WT and CD3 ζ ^{-/-} cultured neurons. Scale bars: a, 6 μm ; d, 12 μm .

One possible reason for the poor responsiveness of CD3 ζ -deficient neurons to ephrinA1 stimulation might result from a decreased protein expression of EphA4, an Eph receptor previously shown to mediate ephrinA1-induced growth cone collapse (Cowan *et al.* 2005; Beg *et al.* 2007; Wegmeyer *et al.* 2007). We examined EphA4 protein levels by western blot analysis of forebrain lysates from WT and CD3 ζ ^{-/-} mice and found no difference between the two mouse lines, indicating that EphA4 protein expression was normal in CD3 ζ ^{-/-} mice brains (Fig. 5c). In addition, we analyzed the ephrinA1-binding capacity of cultured neurons from WT and CD3 ζ ^{-/-} mice by incubating ephrinA1-Fc or Fc at 4°C to detect ephrin-Eph surface binding. A similar signal intensity and distribution of surface bound ephrin was detected indicating that ephrin A1 binding is comparable in WT and CD3 ζ ^{-/-} neurons (total area of surface bound ephrin per 100 μm of neurite: $22.5 \pm 5.3 \mu\text{m}^2$ in WT neurons versus $24.4 \pm 3.6 \mu\text{m}^2$ in CD3 ζ ^{-/-} neurons, $p = 0.77$; Fig. 5d). Taken together, these findings suggest that the growth cone collapse deficit observed in CD3 ζ ^{-/-} hippocampal neurons likely reflects a defect in ephrinA1-dependent signaling.

EphrinA1/EphA4 pathway induces a CD3 ζ -mediated activation of ZAP-70/Syk protein tyrosine kinases

In T lymphocytes, CD3 ζ is a key component of the TCR-CD3 complex involved in the recognition of MHC-peptide complex present on antigen-presenting cells. Upon TCR-MHC binding, CD3 ζ is activated through phosphorylation of its ITAMs that in turn recruits ζ -chain-associated protein of 70 kDa (ZAP-70), a Syk-family protein tyrosine kinase. Once recruited, ZAP-70 is activated through tyrosine phosphorylation and triggers several downstream signaling cascades, leading to the formation of a functional immune synapse (Blanchard *et al.* 2002; Bunnell *et al.* 2002). We thus investigated whether ephrinA1 stimulation would recruit and activate ZAP-70. Tyrosine phosphorylation of ZAP-70 correlates with its increased kinase activity and is thought to generate docking sites for several SH2 or phosphotyrosine-binding domain-containing enzymes or adaptors required for propagation of the signaling cascade (Burkhardt *et al.* 1994; Di Bartolo *et al.* 1999; Williams *et al.* 1999). To determine the effects of ephrinA1 on ZAP-70 activation, mouse WT neurons at 2 DIV were treated with ephrinA1-Fc or control Fc for 45 min and were then fixed and processed for phospho-ZAP-70 immunostaining using an antibody that detects ZAP-70 only when phosphorylated at Tyr319 (pY319-ZAP-70). This antibody has also been shown to cross-react with Syk, the other member of the ZAP-70/Syk family of tyrosine kinases, when phosphorylated at Tyr352 (pY352-Syk). Under control conditions, pY319-ZAP-70/pY352-Syk staining was weak and distributed in small dots (Fig. 6a). After ephrinA1 treatment, pY319-ZAP-70/pY352-Syk immunolabeling was greatly enhanced and formed large clusters, indicating that a massive tyrosine phosphorylation

of the ZAP-70/Syk kinases was induced by ephrinA1 treatment (size of pY319-ZAP-70/pY352-Syk clusters: $0.11 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$ for Fc treatment versus $0.41 \pm 0.56 \mu\text{m}^2$ for ephrinA1-Fc treatment; $p < 0.001$) (Fig. 6a and b). Moreover, these ephrinA1-induced phospho-ZAP-70/Syk clusters colocalized to activated EphA4 clusters formed along the neurites (Fig. 6a). Together, these results suggest that ephrinA1-dependent EphA4 receptor activation induced the aggregation of CD3 ζ and ZAP-70/Syk protein tyrosine kinases in a molecular complex, leading to the activation of ZAP-70/Syk.

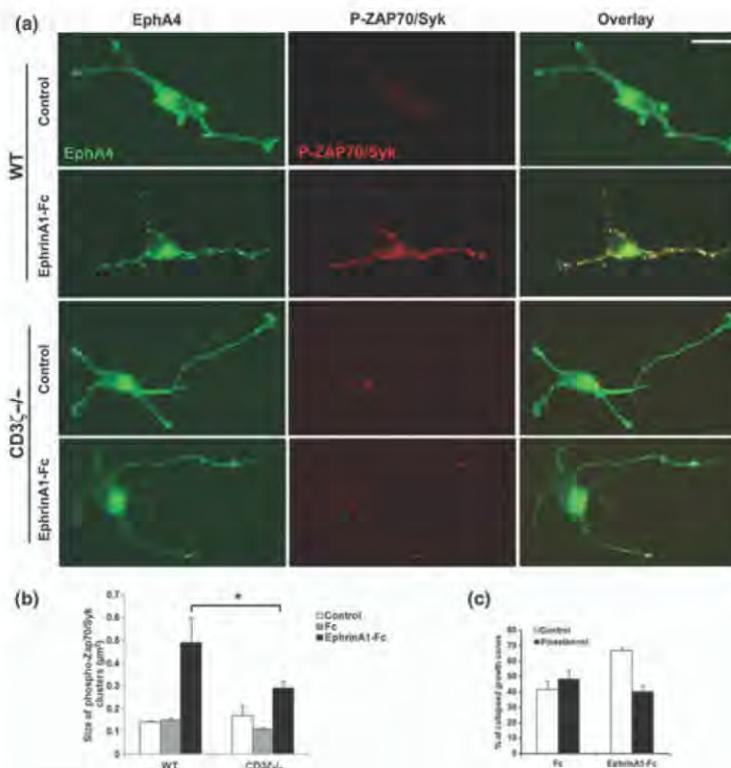
The involvement of CD3 ζ in ephrinA1-induced ZAP-70/Syk activation was assessed by comparing the size of pY319-ZAP-70/pY352-Syk clusters formed upon ephrinA1 stimulation in WT and CD3 ζ ^{-/-} neuron. We found that the size of pY319-ZAP-70/pY352-Syk clusters induced by ephrinA1 treatment were significantly smaller in CD3 ζ ^{-/-} than in WT neurons suggesting that full activation of ZAP-70/Syk kinases by ephrin A1 required CD3 ζ (size of pY319-ZAP-70/pY352-Syk clusters: $0.49 \pm 0.11 \mu\text{m}^2$ for ephrinA1-Fc treatment in WT neurons versus $0.29 \pm 0.03 \mu\text{m}^2$ for ephrinA1-Fc treatment in CD3 ζ ^{-/-} neurons; $n = 30$, $p < 0.05$; Fig. 6a and b).

We next investigated whether the blockade of ZAP-70/Syk kinases would affect ephrinA1-induced growth cone collapse. Neurons at 2 DIV were stimulated by ephrinA1-Fc with 10 μM piceatannol to inhibit ZAP-70/Syk or the vehicle as a control, and the number of collapsed growth cones was counted. The pharmacological blockade of the ZAP-70/Syk kinase family markedly reduced the ephrinA1-induced growth cone collapse (collapsed growth cones: in Fc-stimulated neurons $41.33 \pm 5.7\%$ for vehicle versus $48.0 \pm 8.0\%$ for piceatannol; in ephrinA1-Fc-stimulated neurons $66.7 \pm 1.8\%$ for vehicle versus $40.0 \pm 4.0\%$ for piceatannol) (Fig. 6c). These data suggest that the activation of ZAP-70/Syk by ephrinA1 was functionally linked to its effects on growth cone morphology.

Discussion

In this study, we found that CD3 ζ functions early in neuronal morphogenesis, during the first stages of neuronal differentiation, and we identified ephrinA1-dependent EphA4 receptor activation as an upstream regulator of CD3 ζ and its effector molecules ZAP-70/Syk. In newly born neurons, before neurite extension, we found a transient CD3 ζ aggregation at the cell periphery matching the initiation site of the future neurite. This accumulation of CD3 ζ correlated with a stimulatory effect on filopodia extension via a Rho-GEF Vav2 pathway and a repression of neurite emergence. We showed that the repulsive cue, ephrinA1, through its receptor EphA4, induced the recruitment of both CD3 ζ and activated ZAP-70/Syk to EphA4 receptors clusters. We found that ephrinA1-induced growth cone collapse required

Fig. 6 Activation of ZAP-70/Syk kinases by ephrinA1 is mediated through CD3 ζ and is required for ephrinA1-induced growth cone collapse. (a, b) Neurons from WT and CD3 $\zeta^{-/-}$ mouse brain were treated at 2 DIV with ephrinA1-Fc or Fc as a control, fixed and immunostained for EphA4 (green) and pY319-ZAP-70/pY352Syk (P-ZAP-70/Syk; red). In WT neurons, ephrin A1 induces an increased intensity and size of phosphorylated ZAP-70/Syk clusters, which colocalized with EphA4 clusters. In CD3 $\zeta^{-/-}$ neurons, ephrinA1 induces only a limited clustering of both EphA4 and phosphorylated ZAP-70/Syk. (b) The histogram shows the size of phospho-ZAP-70/Syk clusters \pm SEM of 15–30 cells from two experiments. * $p < 0.05$ (Mann–Whitney). (c) Quantification of the effects of the ZAP-70/Syk inhibitor piceatannol (10 μ M) on ephrinA1-induced collapse growth cone. The histogram shows average percentages of collapsed growth cones \pm SEM of 100–150 cells from two experiments. Scale bar, 25 μ m.



CD3 ζ and the ZAP-70/Syk tyrosine kinase family. Moreover, ephrinA1-induced ZAP-70/Syk activation was inhibited in CD3 $\zeta^{-/-}$ neurons. Altogether, our data suggest that CD3 ζ restrains neurite sprouting by relaying ephrinA1/EphA4 signaling, and that a downstream underlying mechanism may involve the activating Rho GEF Vav2 and the protein tyrosine kinases of the ZAP-70/Syk family (Fig. 7).

We observed that the distribution of CD3 ζ in spherical newly born neurons derived from NPCs was already highly compartmentalized, despite the absence of morphological polarization. CD3 ζ distributed in several hot spots that mostly colocalized with actin-rich regions. This observation strengthens the notion that neurons at early developmental stages are not perfect spheres but already show a certain degree of polarization illustrated by the existence of molecularly defined membrane microdomains (da Silva and Dotti 2002). Time-lapse imaging of CD3 ζ -EGFP-expressing neurons indicated that CD3 ζ accumulation at one site of the cell preceded the subsequent neurite emergence at the same site, suggesting that CD3 ζ might regulate neurite initiation. We found that the over-expression of CD3 ζ -EGFP promoted filopodia formation but repressed neurite outgrowth, whereas the lack of CD3 ζ in CD3 $\zeta^{-/-}$ cultured neurons reduced filopodia extension from neurite shafts and increased neurite length and number. Filopodial extensions and neurite

initiation have been shown to be linked through molecular mechanisms that require the actin cytoskeleton, for which the dynamic assembly is highly regulated by Rho GTPases (da Silva and Dotti 2002; Van Aelst and Cline 2004). We found that the inhibition of the GEF Vav2 prevented the promotion of filopodial formation induced by CD3 ζ . Vav2 activates Rho, Rac and Cdc42, as a result of tyrosine phosphorylation by the protein tyrosine kinases ZAP-70/Syk or c-Src (Abe *et al.* 2000; Kawakatsu *et al.* 2005). In the CNS, Vav2 has been shown to be expressed in differentiating neuroblasts of the rostral migratory stream (Chauvet *et al.* 2003) and to be involved in several developmental processes, such as axon guidance and dendritic development (Cowan *et al.* 2005; Murata *et al.* 2006). Our results suggest that Vav2 participates in the stimulatory effect of CD3 ζ on filopodia formation in young hippocampal neurons. Interestingly, double knockout mice for Vav2 and Vav3 showed defects in the axonal connection pattern of the visual system that strikingly resembled the phenotype of CD3 ζ knock-out mice (Cowan *et al.* 2005; Xu *et al.* 2010), supporting a functional connection *in vivo* between Vav family GEFs and CD3 ζ .

We observed that the CD3 ζ -induced facilitation of filopodia formation coincided with a reduction in neurite formation, suggesting that CD3 ζ promoted a profuse filopodia formation in young hippocampal neurons that delayed

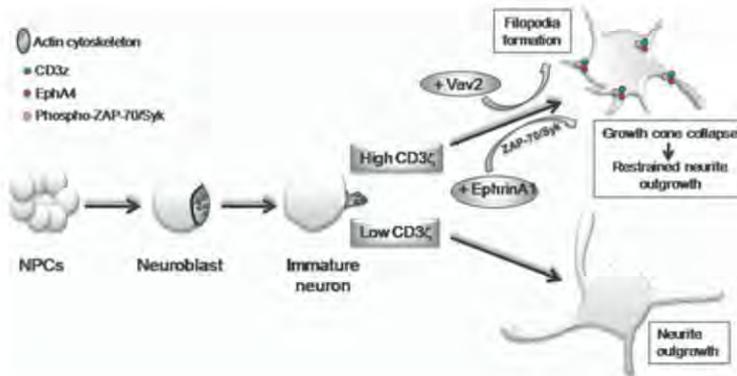


Fig. 7 Schematic representation showing how CD3 ζ may impact on early neuronal morphogenesis.

neurite formation. These results imply that a single molecular signal, CD3 ζ , can mediate a differential effect on filopodia and neurite outgrowth. One possible mechanism underlying these effects might arise from a differential phosphorylation level of CD3 ζ ITAMs, which can occur through 1–6 tyrosine residues. These variations of phosphorylation, resulting from the upstream signal and local cellular environment, ensure the initiation of distinct intracellular signaling pathways (Isakov *et al.* 1995; Osman *et al.* 1995; Tsuchihashi *et al.* 2000), which in neurons might be a molecular mechanism to differentially affect filopodia and neurite outgrowth. The overall resulting contribution of CD3 ζ in early steps of neuronal development is to negatively regulate neuritogenesis. Accordingly, our results suggest that CD3 ζ is involved in EphA4 receptor activation by ephrinA1, a well-characterized neurite retraction cue.

Several lines of evidence indicate that CD3 ζ functions downstream of ephrinA1/EphA4 receptor in neurons. First, under control conditions in young hippocampal neurons in culture, EphA4 and CD3 ζ show a similar pattern of distribution with a particularly high concentration at growth cones. EphrinA1 stimulation induced a massive and parallel redistribution of both proteins resulting in the co-clustering of EphA4 and CD3 ζ in the same aggregates. Second, immunoprecipitation of CD3 ζ from cells coexpressing CD3 ζ and EphA4 resulted in the coimmunoprecipitation of EphA4 indicating an association of CD3 ζ and EphA4 in the same protein complex. Third, neurons lacking CD3 ζ failed to respond to ephrinA1 in a growth cone collapse assay, indicating that CD3 ζ is required for the morphological changes induced by ephrinA1 signaling. Finally, mice lacking CD3 ζ showed defects in the retinotopic mapping of the retinal ganglion cells to the dorsal lateral geniculate nucleus (Huh *et al.* 2000; Xu *et al.* 2010) comparable to ephrinA loss of function (Ellsworth *et al.* 2005; Pfeifferberger *et al.* 2006). Reported signaling pathways activated by ephrinA family/Eph receptors include the tyrosine kinases Src and Fak (Carter *et al.* 2002; Knoll and Drescher 2004;

Zimmer *et al.* 2007; Yue *et al.* 2008), the Rho GTPases through the recruitment of the GEFs ephexin and Vav2 (Shamah *et al.* 2001; Cowan *et al.* 2005) and the spine-associated RapGAP leading to the inactivation of the Ras family GTPases Rap1 and Rap2 (Richter *et al.* 2007). Here, we identified a novel pathway in which EphA receptors regulate CD3 ζ and ZAP-70/Syk activation. This pathway might either operate independently or appertain to one of the other signaling pathways. Particularly interesting to consider are the Src-family kinases and the GEF Vav2 pathways that are both linked to CD3 ζ activation in T cells. In the latter, the current model of TCR-CD3 signaling assumes that binding of MHC-peptide complex to the TCR activates Src kinases, which mediate CD3 ζ phosphorylation required for the docking of ZAP-70. This association subsequently induces downstream signaling events, leading to gene regulation through Ras-associated pathways and to polarization of the actin cytoskeleton through Rho GTPase-associated pathways (Pitcher and van Oers 2003; Baniyash 2004). One can envision in neurons that Src activation reported to occur upon ephrinA stimulation (Knoll and Drescher 2004; Zimmer *et al.* 2007; Yue *et al.* 2008) would induce CD3 ζ recruitment, resulting in the docking of ZAP-70. Activation of ZAP-70 would subsequently engage various downstream effector molecules, including the Vav family GEF to influence filopodia formation and growth cone morphology. In support of this possible signaling pathway, we observed the formation of aggregates containing EphA4, CD3 ζ and phosphorylated ZAP-70/Syk kinases in response to ephrinA1. The accumulation of ephrinA1-induced phosphorylated ZAP-70/Syk clusters was reduced in CD3 ζ ^{-/-} neurons, indicating that activation of ZAP-70/Syk achieved by ephrinA1 is mediated through CD3 ζ . In addition, our results that show the requirement of Vav2 for the stimulatory effect of CD3 ζ on filopodia extension, and the reported ephrinA1-induced activation of Vav2 (Cowan *et al.* 2005) suggest that Vav2 represents a downstream target of an ephrinA1/EphA4-CD3 ζ signaling pathway in neurons. The lack of functional

CD3 ζ in CD3 $\zeta^{-/-}$ neurons and the inhibition of the ZAP-70/Syk kinase family both decreased the ephrinA1-dependent growth cone collapse, indicating that CD3 ζ and ZAP-70/Syk were required for the ephrin-dependent effects on growth cone morphology. The physiological significance of the *in vitro* growth cone collapse assay relates to axon repulsion events that are involved in the establishment and remodeling of neuronal connections during brain development. Because EphA-mediated signaling has been shown to play a critical role in these processes (Klein 2004), it is tempting to speculate that the abnormal segregation of retinal ganglion cell axon projections observed in the thalamus of CD3 $\zeta^{-/-}$ mice (Huh *et al.* 2000; Xu *et al.* 2010) might reflect a defect in EphA downstream pathway causing improper repulsive signal during axon guidance. It has been shown previously that CD3 $\zeta^{-/-}$ mice express a failure in glutamate receptor-mediated synaptic activity in the retina that likely accounts for the disrupted axonal segregation (Xu *et al.* 2010). Given that EphA receptors are implicated in the regulation of glutamatergic synaptic transmission (Fu *et al.* 2007) and in the remodeling of glutamatergic dendritic spines (Murai *et al.* 2003), CD3 ζ might act as pivotal mediator connecting ephrin and glutamate pathways to regulate various aspects of synaptic development and plasticity.

Acknowledgements

We are grateful to Prof. J. P. Soulillou and Dr I. Anegon for their support. We also thank Drs K. Moriyoshi, Y. Takai and P. Scheiffele for kindly providing cDNAs and the European Mouse Mutant Archive for CD3 $\zeta^{-/-}$ mice. This work was supported by INSERM, Fondation Progreffe, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (to HB and PD), Association pour la Recherche sur le Cancer (to PD and ZC), Fondation pour la Recherche Médicale (to SE) and INSERM/Région Pays de la Loire doctoral fellowship (to SJB).

References

Abe K., Rossman K. L., Liu B., Ritola K. D., Chiang D., Campbell S. L., Burridge K. and Der C. J. (2000) Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J. Biol. Chem.* **275**, 10141–10149.

Baniyash M. (2004) TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 675–687.

Barco A., Patterson S., Alarcon J. M., Gromova P., Mata-Roig M., Morozov A. and Kandel E. R. (2005) Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron* **48**, 123–137.

Baudouin S. J., Angibaud J., Loussouarn G., Bonnain V., Matsuura A., Kinebuchi M., Naveilhan P. and Boudin H. (2008) The signaling adaptor protein CD3 ζ eta is a negative regulator of dendrite development in young neurons. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2444–2456.

Beg A. A., Sommer J. E., Martin J. H. and Scheiffele P. (2007) alpha2-Chimaerin is an essential EphA4 effector in the assembly of neuronal locomotor circuits. *Neuron* **55**, 768–778.

Blanchard N., Di Bartolo V. and Hivroz C. (2002) In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* **17**, 389–399.

Boulanger L. M. and Shatz C. J. (2004) Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 521–531.

Brownlee H., Gao P. P., Frisen J., Dreyfus C., Zhou R. and Black I. B. (2000) Multiple ephrins regulate hippocampal neurite outgrowth. *J. Comp. Neurol.* **425**, 315–322.

Bunnell S. C., Hong D. I., Kardon J. R., Yamazaki T., McGlade C. J., Barr V. A. and Samelson L. E. (2002) T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J. Cell Biol.* **158**, 1263–1275.

Burkhardt A. L., Stealey B., Rowley R. B., Mahajan S., Prendergast M., Fagnoli J. and Bolen J. B. (1994) Temporal regulation of non-transmembrane protein tyrosine kinase enzyme activity following T cell antigen receptor engagement. *J. Biol. Chem.* **269**, 23642–23647.

Carter N., Nakamoto T., Hirai H. and Hunter T. (2002) EphrinA1-induced cytoskeletal re-organization requires FAK and p130(cas). *Nat. Cell Biol.* **4**, 565–573.

Chauvet N., Prieto M., Fabre C., Noren N. K. and Privat A. (2003) Distribution of p120 catenin during rat brain development: potential role in regulation of cadherin-mediated adhesion and actin cytoskeleton organization. *Mol. Cell. Neurosci.* **22**, 467–486.

Cowan C. W., Shao Y. R., Sahin M., Shamah S. M., Lin M. Z., Greer P. L., Gao S., Griffith E. C., Brugge J. S. and Greenberg M. E. (2005) Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron* **46**, 205–217.

Cox E. C., Muller B. and Bonhoeffer F. (1990) Axonal guidance in the chick visual system: posterior tectal membranes induce collapse of growth cones from the temporal retina. *Neuron* **4**, 31–37.

Dehmelt L. and Halpain S. (2004) Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J. Neurobiol.* **58**, 18–33.

Di Bartolo V., Mege D., Germain V., Pelosi M., Dufour E., Michel F., Magistrelli G., Isacchi A. and Acuto O. (1999) Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 6285–6294.

Donoghue M. J., Merlie J. P. and Sanes J. R. (1996) The Eph Kinase Ligand AL-1 Is Expressed by Rostral Muscles and Inhibits Outgrowth from Caudal Neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **8**, 185–198.

Dotti C. G., Sullivan C. A. and Banker G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **8**, 1454–1468.

Egea J., Nissen U. V., Dufour A. *et al.* (2005) Regulation of EphA 4 kinase activity is required for a subset of axon guidance decisions suggesting a key role for receptor clustering in Eph function. *Neuron* **47**, 515–528.

Ellsworth C. A., Lyckman A. W., Feldheim D. A., Flanagan J. G. and Sur M. (2005) Ephrin-A2 and -A5 influence patterning of normal and novel retinal projections to the thalamus: conserved mapping mechanisms in visual and auditory thalamic targets. *J. Comp. Neurol.* **488**, 140–151.

Fischer K. D., Kong Y. Y., Nishina H. *et al.* (1998) Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr. Biol.* **8**, 554–562.

Fu W. Y., Chen Y., Sahin M. *et al.* (2007) Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism. *Nat. Neurosci.* **10**, 67–76.

Gao P. P., Yue Y., Zhang J. H., Cerretti D. P., Levitt P. and Zhou R. (1998) Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrin-A5: implications in the development of thalamocortical projections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5329–5334.

- Goslin K., Asmussen H. and Banker G. (1998) Rat hippocampal neurons in low density culture, in *Culturing Nerve Cells*, (Banker G. and Goslin K., eds) pp. 339–370. Cambridge, MA: MIT Press.
- Huh G. S., Boulanger L. M., Du H., Riquelme P. A., Brotz T. M. and Shatz C. J. (2000) Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* **290**, 2155–2159.
- Isakov N., Wange R. L., Burgess W. H., Watts J. D., Aebersold R. and Samelson L. E. (1995) ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J. Exp. Med.* **181**, 375–380.
- Kawakatsu T., Ogita H., Fukuhara T., Fukuyama T., Minami Y., Shimizu K. and Takai Y. (2005) Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the neectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *J. Biol. Chem.* **280**, 4940–4947.
- Kioussis D. and Pachnis V. (2009) Immune and nervous systems: more than just a superficial similarity? *Immunity* **31**, 705–710.
- Klein R. (2004) Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 580–589.
- Knoll B. and Drescher U. (2004) Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J. Neurosci.* **24**, 6248–6257.
- Lanier L. L. (2001) On guard – activating NK cell receptors. *Nat. Immunol.* **2**, 23–27.
- Malissen M., Gillet A., Rocha B. *et al.* (1993) T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *EMBO J.* **12**, 4347–4355.
- McAllister A. K. and van de Water J. (2009) Breaking boundaries in neural-immune interactions. *Neuron* **64**, 9–12.
- Moriyoshi K., Richards L. J., Akazawa C., O’Leary D. D. and Nakanishi S. (1996) Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron* **16**, 255–260.
- Murai K. K., Nguyen L. N., Irie F., Yamaguchi Y. and Pasquale E. B. (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat. Neurosci.* **6**, 153–160.
- Murata T., Ohnishi H., Okazawa H. *et al.* (2006) CD47 promotes neuronal development through Src- and FRG/Vav2-mediated activation of Rac and Cdc42. *J. Neurosci.* **26**, 12397–12407.
- Osman N., Lucas S. C., Turner H. and Cantrell D. (1995) A comparison of the interaction of Shc and the tyrosine kinase ZAP-70 with the T cell antigen receptor zeta chain tyrosine-based activation motif. *J. Biol. Chem.* **270**, 13981–13986.
- Pfeiffenberger C., Yamada J. and Feldheim D. A. (2006) Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. *J. Neurosci.* **26**, 12873–12884.
- Pitcher L. A. and van Oers N. S. (2003) T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol.* **24**, 554–560.
- Raab M., da Silva A. J., Findell P. R. and Rudd C. E. (1997) Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* **6**, 155–164.
- Richter M., Murai K. K., Bourgin C., Pak D. T. and Pasquale E. B. (2007) The EphA4 receptor regulates neuronal morphology through SPAR-mediated inactivation of Rap GTPases. *J. Neurosci.* **27**, 14205–14215.
- Samelson L. E., Harford J. B. and Klausner R. D. (1985) Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* **43**, 223–231.
- Sergent-Tanguy S., Veziers J., Bonnamain V., Boudin H., Neveu I. and Naveilhan P. (2006) Cell surface antigens on rat neural progenitors and characterization of the CD3 (+)/CD3 (-) cell populations. *Differentiation* **74**, 530–541.
- Shamah S. M., Lin M. Z., Goldberg J. L. *et al.* (2001) EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* **105**, 233–244.
- Shi L., Fu W. Y., Hung K. W., Porchetta C., Hall C., Fu A. K. and Ip N. Y. (2007) Alpha2-chimaerin interacts with EphA4 and regulates EphA4-dependent growth cone collapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16347–16352.
- da Silva J. S. and Dotti C. G. (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neurogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 694–704.
- Thams S., Oliveira A. and Cullheim S. (2008) MHC class I expression and synaptic plasticity after nerve lesion. *Brain Res. Rev.* **57**, 265–269.
- Tsuchihashi N., Matsuda S., Reinherz E. L. and Koyasu S. (2000) Two YxxL segments of a single immunoreceptor tyrosine-based activation motif in the CD3zeta molecule differentially activate calcium mobilization and mitogen-activated protein kinase family pathways. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1785–1793.
- Tybulewicz V. L. (2005) Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 267–274.
- Van Aelst L. and Cline H. T. (2004) Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 297–304.
- Wegmeyer H., Egea J., Rabe N. *et al.* (2007) EphA4-dependent axon guidance is mediated by the RacGAP alpha2-chimaerin. *Neuron* **55**, 756–767.
- Williams B. L., Irvin B. J., Sutor S. L., Chini C. C., Yacyszyn E., Bubeck Wardenburg J., Dalton M., Chan A. C. and Abraham R. T. (1999) Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma and Ras activation. *EMBO J.* **18**, 1832–1844.
- Woo S., Rowan D. J. and Gomez T. M. (2009) Retinotopic mapping requires focal adhesion kinase-mediated regulation of growth cone adhesion. *J. Neurosci.* **29**, 13981–13991.
- Xu H. P., Chen H., Ding Q., Xie Z. H., Chen L., Diao L., Wang P., Gan L., Crair M. C. and Tian N. (2010) The immune protein CD3zeta is required for normal development of neural circuits in the retina. *Neuron* **65**, 503–515.
- Yue X., Dreyfus C., Kong T. A. and Zhou R. (2008) A subset of signal transduction pathways is required for hippocampal growth cone collapse induced by ephrin-A5. *Dev. Neurobiol.* **68**, 1269–1286.
- Zhou X., Suh J., Cerretti D. P., Zhou R. and DiCicco-Bloom E. (2001) Ephrins stimulate neurite outgrowth during early cortical neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* **66**, 1054–1063.
- Zimmer G., Kastner B., Weth F. and Bolz J. (2007) Multiple effects of ephrin-A5 on cortical neurons are mediated by SRC family kinases. *J. Neurosci.* **27**, 5643–5653.

En revisions dans *Journal of Neuroscience*

ARTICLE II: Impaired spatial memory in mice lacking CD3 ζ is associated with altered NMDA and AMPA receptors signaling but independent of T cell deficiency.

Antoine Louveau¹²³, Julie Angibaud¹²³, Fabienne Haspot¹²³, Cecilia Opazo⁵, Reynald Thinard¹²³, Virginie Thepenier¹²³, Stéphane Baudouin¹²³, Laurent Lescaudron¹²³, Philippe Hulin⁴, Claudia Riedel⁵, and Hélène Boudin¹²³

¹INSERM, UMR 1064, Nantes F44000 France

²CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITUN, Nantes, F44000 France

³Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France

⁴IFR26, Plateforme PiCell, Nantes, F44000 France

⁵Facultad de Ciencias Biologicas y Medicina, Santiago, Chile
Universidad Andres Bello, Santiago, Chile

Des études antérieures réalisées au sein du laboratoire, mais aussi par d'autres groupes, avaient mis en évidence une expression de CD3 ζ au niveau des synapses des neurones matures. De plus, des études électrophysiologiques réalisées chez la souris adulte avaient impliqué CD3 ζ dans les phénomènes de plasticité synaptique. Dans cette étude, nous avons étudié le rôle de CD3 ζ chez l'animal adulte. Au niveau comportemental, nous avons montré que les souris déficientes pour la protéine CD3 ζ présentaient des défauts d'apprentissage et de mémoire. Les souris CD3 $\zeta^{-/-}$, présentant un SI déficient susceptible de contribuer aux défauts cognitifs observés, ont reçu une greffe de moelle osseuse afin de rétablir leur SI. Par cette approche, nous avons mis en évidence que l'altération des fonctions cognitives était indépendante de l'activité de CD3 ζ au niveau du SI. Nous avons alors examiné au niveau cérébral les conséquences de l'absence de CD3 ζ sur les synapses excitatrices glutamatergiques, dans lesquelles CD3 ζ est enrichi au niveau postsynaptique. L'absence de CD3 ζ chez la souris engendre une diminution de la localisation synaptique de la sous-unité GluN2A des récepteurs NMDA in vitro comme in vivo. Par des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons mis en évidence que CD3 ζ interagissait avec GluN2A, et que l'absence de CD3 ζ abrogeait l'interaction entre GluN2A et PSD95, suggérant que CD3 ζ régule l'agrégation synaptique de GluN2A en modulant l'interaction de cette dernière avec PSD95. Nous avons alors testé l'importance de CD3 ζ dans la plasticité synaptique dépendante des récepteurs NMDA dans un modèle de LTP induite chimiquement sur des cultures de neurones CD3 $\zeta^{-/-}$. Trois événements majeurs ont lieu lors de la mise en place d'une LTP : le recrutement et l'activation par autophosphorylation de la CaMKII, qui conduit, selon deux voies distinctes, à la phosphorylation de la sous-unité GluA1, et au recrutement synaptique des récepteurs AMPA. Nous avons montré que CD3 ζ était important pour la translocation synaptique

et l'autophosphorylation de la CaMKII, et le recrutement synaptique de la sous-unité GluA1. Nos résultats suggèrent que CD3 ζ , en régulant la localisation synaptique de GluN2A, contribue à l'activation synaptique de la CaMKII, et au recrutement synaptique de GluA1 lors de la LTP. L'ensemble de ces résultats intègre CD3 ζ dans les mécanismes moléculaires de la plasticité synaptique et en fait un acteur important pour l'apprentissage et la mémoire (figure 39).

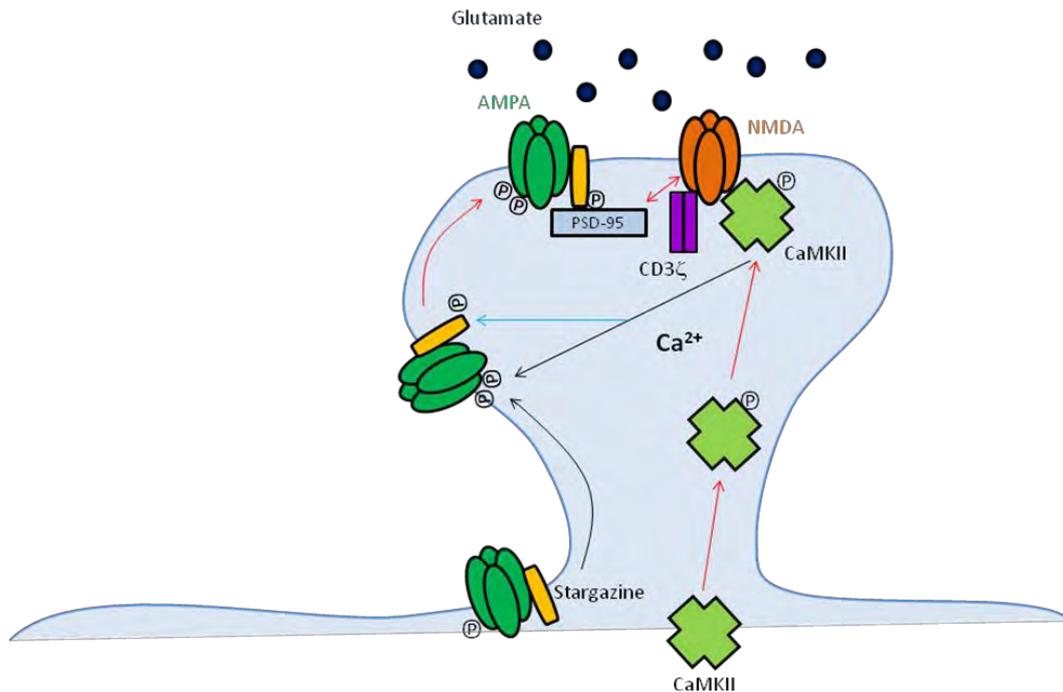


Figure 39 : Schéma du rôle de CD3 ζ dans les réorganisations moléculaires synaptiques durant la LTP. CD3 ζ influence la localisation synaptique de GluN2A en modulant l'interaction de cette dernière avec PSD95. Lors de l'activation des récepteurs NMDA, CD3 ζ permet le recrutement synaptique et la phosphorylation de la CaMKII. De plus, CD3 ζ facilite l'interaction de la CaMKII avec les sous-unités GluN2A et GluN2B des récepteurs NMDA. Bien que la phosphorylation de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA par CaMKII ne soit pas affectée par l'absence de CD3 ζ , le recrutement synaptique des récepteurs AMPA possédant une sous-unité GluA1 est abrogé en absence de CD3 ζ . Une hypothèse est que l'absence de CD3 ζ inhibe la phosphorylation de la stargazine par la CaMKII, empêchant ainsi la capture des récepteurs AMPA à la synapse. Le rôle de CD3 ζ au niveau des réorganisations moléculaires liées à la LTP pourrait être le mécanisme cellulaire à l'origine des défauts d'apprentissage et de mémoire des souris déficientes pour CD3 ζ . Flèches noires : processus non affectés par CD3 ζ ; flèches rouges : processus médiés par CD3 ζ ; flèche bleue : hypothèse de processus médiés par CD3 ζ .

Impaired spatial memory in mice lacking CD3zeta is associated with altered NMDA and AMPA receptors signaling independent of T cell deficiency

Abbreviated title: Role of CD3 ζ in memory and glutamatergic synapses

Antoine Louveau¹, Julie Angibaud^{1,5}, Fabienne Haspot¹, Ma. Cecilia Opazo², Reynald Thinard¹, Virginie Thepenier¹, Stéphane J. Baudouin^{1,6}, Laurent Lescaudron^{1,3,7}, Philippe Hulin⁴, Claudia Riedel² and H el ene Boudin^{1,8}

¹INSERM UMR 1064, ITUN, CHU Nantes, Univ Nantes, France

²Facultad de Ciencias Biológicas y Medicina Universidad Andr s Bello, Santiago Chile

³UFR Sciences et Techniques, Université de Nantes, Nantes, France.

⁴Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) IFR26, France

⁵ Present address: Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, Université Bordeaux Segalen, France

⁶Present address: Biozentrum Universität Basel, CH-4056, Switzerland

⁷Present address: UMR 791, LIOAD, UFR d'Odontologie, University of Nantes, France

⁸ Present address: UMR913, IMAD, University of Nantes, France

Corresponding author: Helene Boudin

INSERM UMR913

University of Nantes

1, rue Gaston Veil

44035 Nantes, France

helene.boudin@univ-nantes.fr

Tel: +33 (0)2 40 41 29 50

Fax: +33 (0)2 40 41 11 10

Number of pages : 42

Number of figures : 7

Number of words for Abstract :247

Number of words for Introduction : 500

Number of words for Discussion : 1395

Acknowledgements

We are grateful to Dr. I Anegon, and Dr. P Naveilhan for their support. We also thank the European Mouse Mutant Archive for CD3 ζ ^{-/-} mice. This work was supported by INSERM,

Fondation Progreffe and ECOS-CONICYT grant n°C11S03. The authors declare no competing financial interests.

Abstract

The immunoreceptors-associated protein CD3 ζ is known for its role in immunity and has also been implicated in neuronal development and synaptic plasticity. However, the mechanism by which CD3 ζ regulates synaptic transmission remains unclear. In this study, we showed that mice lacking CD3 ζ exhibited defects in spatial learning and memory as examined by the Barnes maze and object location memory tasks. Given that peripheral T cells have been shown to support cognitive functions and neural plasticity, we generated CD3 ζ ^{-/-} mice where the peripheral T cells were repopulated to a normal level by syngeneic bone marrow transplantation. Using this approach, we showed that T cell replenishment in CD3 ζ ^{-/-} mice did not restore spatial memory defects, suggesting that the cognitive deficits in CD3 ζ ^{-/-} mice were most likely mediated through a T cell-independent mechanism. In support of this idea, we showed that CD3 ζ proteins were localized to glutamatergic postsynaptic sites where it interacted with the NMDAR subunit GluN2A. Loss of CD3 ζ in brain decreased GluN2A-PSD95 association and GluN2A synaptic localization. This effect was accompanied by a reduced interaction of GluN2 with the key NMDAR downstream signaling protein CaMKinase II (CaMKII). Using the glycine-induced, NMDA-dependent form of chemical LTP in cultured cortical neurons, we showed that CD3 ζ was required for activity-dependent CaMKII autophosphorylation and for the synaptic recruitment of the AMPAR subunit GluA1. Together, these results support the model that the pro-cognitive function of CD3 ζ may be mediated through its involvement in the NMDAR downstream signaling pathway leading to CaMKII-dependent LTP induction.

Introduction

Many canonical immune molecules are expressed in the nervous system, and play important roles in neurodevelopment and synaptic plasticity (Boulanger, 2009). These include molecules of the adaptive immune system such as members of the major histocompatibility complex class I (MHC I) and of the immunoreceptors-associated CD3 complex (Huh et al., 2000; Goddard et al., 2007; Nakamura et al., 2007; Baudouin et al., 2008; Fourgeaud et al., 2010; Glynn et al., 2011). CD3zeta (CD3 ζ) is a transmembrane adaptor signaling protein first characterized in T cells as a component of the CD3 complex, the signaling module of the T Cell Receptor (TCR). This receptor recognizes peptide fragments presented by MHC molecules and is thus responsible for antigenic recognition (Samelson et al., 1985). Moreover, CD3 ζ participates in intrathymic T cell differentiation, which is arrested in mice lacking CD3 ζ , leading to a marked reduction of circulating mature T cells (Liu et al., 1993; Love et al., 1993; Malissen et al., 1993). Genetic inactivation of CD3 ζ also highlighted its critical role in neuronal development and plasticity. At early developmental stages, CD3 ζ acts as a downstream mediator of the ephrinA1/ EphA4 signaling pathway to inhibit neurite extension (Angibaud et al.), and is required for activity-dependent refinement of the retinal ganglion cell axon projections to the thalamus (Huh et al., 2000; Xu et al., 2010). In addition, CD3 ζ negatively regulates dendritic complexity in retinal ganglion cells and cultured hippocampal neurons (Baudouin et al., 2008; Xu et al., 2010). Synaptic functions were also altered in CD3 ζ -deficient mice, which showed a reduced glutamatergic synaptic activity in the retina (Xu et al., 2010) and defects in synaptic plasticity in the hippocampus, reflected by an enhanced long-term potentiation (LTP) and a lack of long-term depression (LTD) (Huh et al., 2000; Barco et al., 2005). However, the role of CD3 ζ in synaptic plasticity-dependent cognitive behavior, in particular in learning and memory, is currently unknown. In addition, the mechanisms by which CD3 ζ regulates synaptic function remain poorly understood and might be initiated by two distinct but non exclusive processes. One process would involve immune-mediated mechanisms triggered by peripheral CD3 ζ -expressing T cells. Indeed,

several studies raised the notion that circulating T cells play a supportive role in cellular plasticity important in neurogenesis and cognition (Brynskikh et al., 2008; Wolf et al., 2009; Derecki et al., 2010; Kipnis et al., 2012), suggesting that the decreased level of circulating T cells in CD3 ζ -deficient mice might impact neural plasticity. The second process would rely on a direct regulation of glutamate receptors distribution and downstream signaling pathways by neuronal CD3 ζ , known to localize at glutamatergic synapses (Baudouin et al., 2008).

In this study, we examined the role of CD3 ζ in spatial learning and working memory. In addition, we explored the significance of the aforementioned mechanisms in CD3 ζ -mediated cognitive behavior and neuronal plasticity. Our data showed that CD3 ζ -deficient mice exhibited impaired learning and memory, independent of T cell deficiency, but associated with decreased synaptic GluN2A and altered NMDA-dependent plasticity manifest by inhibition of CaMKII activation and GluA1 synaptic recruitment.

Materials and methods

Animals

C57BL/6 CD45.2⁺ CD3 ζ ^{+/-} mice were obtained from CDTA center in Orleans (France). Animals were maintained as heterozygotes on a C57BL/6 background. Newborns or 17-day-old mice embryos were genotyped by PCR amplification as described previously (Malissen et al., 1993). C57BL/6 CD45.1⁺ mice were obtained from Charles River. Mice were maintained on a 12h light-dark cycle in a temperature-controlled room with free access to water and food. Age matched littermates were used for all experiments. All protocols were carried out in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals (Agreement #CEEA.2012.42, CEEA.2012.43, CEEA.2012.44).

RNA Extraction and PCR

Total RNAs were extracted from 8-week-old CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice hippocampi and homogenized in 1ml of Trizol reagent for 5 min at room temperature followed by chloroform extraction and isopropanol precipitation. After centrifugation and washing in ethanol, RNA was resuspended in water. After Turbo DNase treatment (Invitrogen), 2 μ g of RNA were reverse-transcribed with a MMLV-reverse transcriptase system (Invitrogen). The synthesized cDNA (200ng) was denatured for 10 min at 96°C and subjected to 40 cycles of 3 sec at 96°C, 3 sec at 60°C, 50 sec at 68°C and a final extension step of 10 sec at 72°C using the Veriti Thermal cycler (Applied Biosystems). The reaction occurred in a total volume of 20 μ l using the AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems). For the amplification of CD3 ζ mRNA, the sense oligonucleotide primer was 5'-AGGGAAGCAGAAGATGAAGTGG-3' and the antisense oligonucleotide primer was 5'-TATGCAGGGCATCATAGGTGTC-3' giving rise to a 485 and 380 base-pairs fragment mRNA for CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice respectively. Internal standards were generated by amplifying the GAPDH mRNA using the following oligonucleotides primers 5'-CTACAGCAACAGGGTGGTGG-3' (sense) and 5'-TATGGGGTCTGGGATGG-3' (antisense). PCR products were loaded on a 1% agarose gel for analysis.

Behavioral studies

Barnes Maze Task. The Barnes maze was used to assess spatial reference memory (Barnes, 1979). One of the advantages of the Barnes maze task is that it is not contaminated by stress, as much as other similar tasks, and no strong aversive stimuli or deprivation is used as reinforcement. The apparatus used in this experiment consisted of a white circular platform (90 cm of diameter) elevated 1m above the floor, with 20 equally spaced holes (5cm of diameter) at the periphery of the maze. A dark escape box was placed under only one hole randomly chosen for each mouse. The maze was placed in a room with distal environmental cues to allow mice to properly locate the target hole. An aversive noise (Combo Tuner Metronome TM40, Korg) was used as motivation to escape in the dark box. The apparatus was clean between each trial in order to prevent the use of local olfactory cues. The test was divided in two phases. During four days, mice were trained four times a day to find the target hole. Sessions within each day were separated by 15 min. Memory performance of the mice was assessed by one trial performed 24h (D5) and 8 days (D12) after the last training. A video camera was used to record the behavior of the mice during both the training sessions and the tests. For the training sessions, mice were gently picked up from the tail and placed for 10 sec in the middle of the platform under a box before the beginning of the session. After 3 min, if the mice did not find the correct hole, they were gently directed toward the target hole and allowed to descend into the escape box where they were left for 1 min in an aversive noise-free environment. The time to enter into the target hole and the velocity of the mice were measured. Search strategies used by the mice to locate the target hole during the training were analyzed across days. Search strategies were scored as random if the mouse displayed a nonsystematic search strategy with multiple crossings through the center of the maze or if it did not locate the hole within the 3 min. Search strategies were scored as serial if the mouse moved around the edge of the maze and past at least three adjacent holes before entering the escape hole. Finally, search strategies were scored as spatial if the mouse moved directly towards the direction of the

escape hole from the center of the maze, and did not explore a hole more than two holes away from the target hole. Proportion of random, serial and spatial strategies was scored for each days of training and compared between mouse genotypes. For the tests trials (D5 and D12), the escape box was removed and mice were allowed to explore the maze for 90 sec. The number of visits (when a mouse dipped its head into a hole) into the target hole and the two direct adjacent holes were measured. CD3 ζ ^{+/+}, CD3 ζ ^{+/-} and CD3 ζ ^{-/-} naïve and grafted (42 days post-graft) mice at 12 weeks of age were used for this study. Analyses were performed on 8 to 11 animals per group. Data are presented as mean \pm SEM. Data analysis was performed using Excel and GraphPad Prism 5 softwares and statistical analyses were performed using Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc tests.

Object Location Memory Task. The experimental apparatus used in this study was a square box made of opaque white plastic (50cm x 50 cm). The mice were first habituated to the box for 15 min. Then the mice were placed for 10 min in the box with 4 different plastic objects positioned in a defined spatial orientation (training). Twenty-four hours later, the mice were placed in the same box with the same four objects but two of them have switched location (test). The time spent exploring the objects in novel and old (familiar) locations was measured during 10 min. Exploration of an object was assumed when the mouse approached an object, when touched it with its vibrissae, snout or forepaws. The object location preference was calculated as the exploration time of the old or novel location objects / total exploration time. Analyses were performed on 12-week-old CD3 ζ ^{+/+} ($n=6$); CD3 ζ ^{+/-} ($n=4$) and CD3 ζ ^{-/-} ($n=5$) mice. Data analyses were performed using Excel and GraphPad Prism 5 softwares and statistical analyses were performed using Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc tests.

Bone Marrow Transplantation (BMT)

Age-matched CD45.2⁺ (6 weeks old) CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice (recipient mice) were anesthetized with an intramuscular injection of Rompun/Ketalar (4mg/kg of xylazine ; 40mg/kg of ketamine) and received X-ray total body irradiation (2Gy) (Faxitron 160 CP) 6 to

10h before BMT. Bone marrow cells (BMCs) were isolated from adult CD45.1⁺ C57BL/6 female mice (donor mice) by flushing the tibiae and femurs using a 26-gauge needle with Media 199 containing 10mM Hepes (Invitrogen), 10µg/ml DNase (Sigma Aldrich) and 4µg/ml gentamycin (BioWhittaker). After filtration through a 100 µm filter, BMCs were centrifuged for 5 min at 800 g at 4°C. BMCs were resuspended in Media 199 containing 10mM Hepes (Invitrogen), 10µg/ml DNase (Sigma Aldrich) and 4µg/ml gentamycin (BioWhittaker) at a density of 30.10⁶ cells per ml. Recipient mice were injected intravenously with 15.10⁶ cells.

Flow Cytometry Analysis

Two, six and eight weeks after BMT, grafted CD3ζ^{+/+} (*n*=11) and grafted CD3ζ^{-/-} (*n*=10) mice were anesthetized with 4% Isoflurane (Forene) with 0.8 L/min of O₂ and 300µl of blood was collected from the maxillar vein with a 20-gauge needle in an eppendorf with 20µl of heparine. The same procedure was performed with 12 week-old naïve CD3ζ^{+/+} (*n*=7) and CD3ζ^{-/-} (*n*=9) mice. After red cell lysis, peripheral blood cells were suspended in FACS Buffer (10g/l BSA and 0.1% Azide in PBS) and stained for 30 min for extracellular markers with antibodies for CD45.2 conjugated to Fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Bioscience, 1µg/ml), and CD3ε (BD Bioscience, 2µg/ml) or TCRβ (BD Bioscience, 1µg/ml) conjugated with phycoerythrine (PE). Labeled cells were analyzed with a FACS LSR II ® (BD Bioscience) and analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc). To obtain an accurate cell count, cells were gated using forward versus side scatter to eliminate debris, pulse width versus area to select singlet cells and DAPI labeling to eliminate dead cells. To determine the percentage of CD3ε and TCRβ cells, the number of CD3ε⁺ and TCRβ⁺ cells was divided by the total of living cells. Data analyses were performed using Excel and GraphPad Prism 5 and statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis Test with Dunn's post-hoc test.

Culture of cortical neuron and pharmacological treatments.

Cultures of astrocytes were first prepared to constitute a glial feeder layer. Briefly, the cortex was dissected from P1 newborn rat forebrains and dissociated by trypsin and DNase. Cells

were then plated at a density of 35×10^3 cells/cm² in minimal essential medium (MEM) containing 10% FCS, 0.6% D-glucose, 100 µg/ml streptomycin. The medium was replaced with serum-free MEM containing N2.1 supplements 24h before the neuron culture.

Mouse cortical neuron culture was prepared from E17 brain of CD3ζ^{-/-} and CD3ζ^{+/+} littermate mice, genotyped by PCR amplification as described above. After dissection of the cortex, the tissue was enzymatically dissociated with trypsin and mechanical trituration. Cells were plated on glass coverslips coated with poly-L-lysine (1mg/ml, Sigma Aldrich) at a density of 7×10^3 cells/cm² for immunostaining or 18×10^3 cells/cm² for Western blot in neuronal plating medium composed of MEM containing 10% FCS, 0.6% D-glucose, 100 µg/ml streptomycin, 100 UI/ml penicillin and 1mM sodium pyruvate. Cells were transferred 3h later to a dish containing a glial feeder layer in serum-free MEM containing N2.1 supplements. At 2 days in vitro (DIV), 5µM of cytosine arabinoside was added. Cells were used at 15 DIV for both immunostainings and Western blot.

For glycine-induced long term potentiation (Gly-LTP), 15DIV neurons were incubated for 5 min in a Mg²⁺ free ACSF (125mM NaCl; 2.5mM KCl; 26.2mM NaHCO₃; 1mM NaH₂PO₄; 11mM glucose; 2.5mM CaCl₂) with 100µM of glycine (Sigma Aldrich) followed by a 15 min incubation in ACSF supplemented with 1.25mM MgCl₂. For forskolin/rolipram treatment (F/R), 15DIV neurons were incubated for 16h with 50µM forskolin (Sigma Aldrich) and 0.1µM rolipram (Sigma Aldrich) in neuronal culture medium. Following treatment, cells were fixed for immunostaining or collected for Western Blot analyses.

Immunostaining

Neurons at 15 DIV were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) and 4% sucrose for 15 min except for NMDA receptor immunostaining for which cells were fixed in MeOH for 20 min at -20°C. Neurons were permeabilized for 5 min at room temperature (RT) in 0.25% Triton-X-100 in PBS (only if PFA fixation), washed twice with PBS, and incubated for 30 min at 37°C in PBS containing 10% BSA. Neurons were incubated overnight at RT with primary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA and 0.02% azide. Antibodies used

were the following: rabbit anti-CD3 ζ (Spring Bioscience, 1 μ g/ml), mouse anti-PSD95 (Abcam, 1 μ g/ml), mouse anti-GAD (Hybridoma Bank, 1:2), rabbit anti-GluA1 (Calbiochem, 0.5 μ g/ml), mouse anti-GluN1 (BD Pharmigen, 2.5 μ g/ml), rabbit anti-GluN2A (Millipore, 5 μ g/ml), mouse anti-GluN2B (NeuroMab, 5 μ g/ml), mouse anti-CamKII α (Affinity Bioreagents, 5.8 μ g/ml), mouse anti-SV2 (Hybridoma Bank); mouse anti-Synapsin I (Synaptic Systems, 2 μ g/ml) and rabbit anti-Synapsin I (Sigma, 0.02 μ g/ml). After washing, neurons were incubated for 45 min at 37°C with the appropriate FITC-conjugated or Alexa 568-conjugated secondary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA and 0.02% azide. Neurons were washed with PBS and mounted with ProLong Gold Antifade Reagents with DAPI (Molecular Probes).

Image analyses and quantification

Images were acquired with 63x (NA 1.4) oil immersion objective using a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss) driven by AxioVision Release 4.2 software. For 3D reconstruction, high-resolution confocal image stacks were acquired using a Leica SP1 laser scanning microscope (Leica Microsystems, Nanterre) equipped with Argon 488 nm-, DPSS 561 nm-, and He-Ne 594 nm lasers, and a 63x (NA 1.4) oil immersion objective. In each sample, the two fluorophores (Alexa 488 paired with Alexa 594) were imaged separately using sequential scanning to eliminate the possibility of overlapping emission. The step size of the z-stack was 0.25 μ m. 3D reconstruction was performed using Amira 3d V4.1 Software (Visualization Sciences Group, Bordeaux).

The quantification was performed using Image J software. The number of clusters (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluA1, PSD95) per length unit of dendrite was determined for each selected neuron in one to two dendrites. To define clusters, thresholds for individual neurons and channels was chosen manually and corresponded to at least two times the average intensity of fluorescence in the dendritic shaft. To define synaptic clusters, the binary images of each postsynaptic molecule (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluA1 and PSD95) were compared with binary images of synapsin clusters. Any postsynaptic cluster that had at least one pixel

of overlap with a presynaptic cluster was defined as synaptic. For Gly-LTP experiments, the percentage of synaptic GluA1 clusters corresponds to the percentage of thresholded GluA1 puncta overlapping with a binary image of the PSD95 image. The number of CamKII-immunoreactive spines was counted in two dendrites of each selected neurons

A total of 30-40 neurons were analyzed for each experimental condition from three to four independent cultures. Data analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 software. Values indicate mean \pm SEM. Group comparison was made by Student t test or by Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc tests as indicated.

Western blot and Coimmunoprecipitation

To analyze CD3 ζ protein expression, forebrains from adult CD3 ζ ^{+/+} ($n=5$) and CD3 ζ ^{-/-} ($n=6$) mice were homogenized using a Teflon homogenizer in RIPA lysis buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM EDTA, pH8.0) and solubilised during 30 min at 4°C. The resulting suspension was centrifuged at 20,000g for 20 min and the supernatant was analyzed by Western Blot. The synaptosome and synaptic membrane fractions were obtained from forebrains of 30-day-old Sprague-Dawley rats. Forebrains were homogenized using a Teflon in 5mM Tris-HCl, pH7.4 containing 320mM sucrose, 0.5mM EGTA and protein inhibitor cocktail (PIC; Sigma Aldrich). After centrifugation at 1,000g for 10 min, the supernatant (S1) was saved. The pellet was washed, homogenized in the previous buffer and centrifuged for 10 min at 1,000g. The second supernatant (S2) was collected, mixed with the first supernatant (S1) and then centrifuged at 4°C for 20 min at 12,000g. The pellet (total membrane fraction P2) was resuspended in 5mM Tris-HCl pH 8.1 containing 320mM sucrose, 0.5mM EGTA and 1mM dithiothreitol. The resulting suspension was layered on a discontinuous sucrose step gradient (0.32M/1M/1.2M sucrose in 5mM Tris-HCl pH 8.1) and centrifuged at 150,000g for 2h at 4°C. The synaptosome fraction was collected at the interface between the 1/1.2M sucrose gradient and diluted 10 times with the lysis buffer (5mM Tris-HCl pH 8.1 containing 0.5mM EGTA). For synaptic membrane preparation, the synaptosome fraction was incubated under soft agitation for 30 min at 4°C.

The lysed solution was centrifuged at 33,000g for 30 min at 4°C and the pellet was resuspended in 5mM Tris-HCl pH 8.1 containing 320mM sucrose, 0.5mM EGTA and 1mM dithiothreitol. The resulting suspension was layered on a discontinuous sucrose step gradient (0.32M/1M/1.2M sucrose in 5mM Tris-HCl pH 8.1) and centrifuged at 250,000g for 1h at 4°C. The synaptic membrane fraction was collected at the interface between the 1/1.2M sucrose gradient.

To analyze the protein expression of the synaptic receptors (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN1) in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice brain, membrane brain homogenates (P2) and synaptosome-enriched fractions were generated. Forebrains from adult CD3 ζ ^{+/+} (*n*=4) and CD3 ζ ^{-/-} (*n*=4) mice were homogenized using a glass Teflon homogenizer in 10mM Tris-HCl, pH7.4 containing 320mM sucrose and PIC. The resulting suspension was centrifuged at 700g for 10 min. The supernatant was collected, centrifuged at 100,000g for 30 min and the pellet was resuspended in 10mM Tris-HCl, pH7.4 (P2). For synaptosome-enriched membrane fraction, the pellet of the membrane fraction was resuspended in 5mM Tris-HCl pH 8.1 containing 0.5% of Triton-X-100, 320mM sucrose and PIC and solubilised for 1h at 4°C. The resulting suspension was centrifuged at 100,000g for 1h at 4°C. The pellet was then resuspended in the same buffer and centrifuged at 100,000g for 1h at 4°C. The pellet was resuspended in 5mM Tris-HCl pH 8.1 containing 0.5% of Triton-X-100, 320mM sucrose and PIC.

For neuronal culture analyses, 15 DIV neurons were scrapped into cold PBS containing PIC, pelleted, and resuspended in Laemmli buffer. Analyses were performed on 3-4 different cell cultures.

For coimmunoprecipitation, membrane brain homogenates from CD3 ζ ^{+/+} (*n*=4) and CD3 ζ ^{-/-} (*n*=4) brains were solubilised in TBS (50mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.4) containing 1% Triton-X-100 and PIC for 4h at 4°C. After centrifugation for 30 min at 20,000g, the supernatant was collected and incubated overnight with 4 μ g of rabbit anti-CD3 ζ (Spring Bioscience), mouse anti-CD3 ζ (Santa Cruz Biotechnologies), anti-GluN2A (Millipore) or anti-GluN2B (Millipore) antibodies coupled to protein A or protein G sephrose beads (GE

Healthcare). After centrifugation for 2 min at 3,000g, the pellet was washed with TBS containing 1% Triton-X-100 and PIC, then twice with Tris-NaCl (50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH7.4) and twice with TBS. After centrifugation for 2 min at 3,000g, the beads were resuspended in Laemmli buffer and analyzed by immunoblot. For control experiments, the same procedure was followed except that the solubilized membrane suspension was added to sepharose beads coupled to control IgG antibodies.

All samples (between 7 and 30µg) were boiled at 95°C for 5 min then transferred to ice before being loaded on a 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with 5% dried milk in 20mM Tris-HCl pH 7.4 containing 0.45M NaCl and 0.1% Tween 20 (TBST) except for phosphoprotein for which the membrane was blocked with 5% BSA in TBST. The membrane was then incubated overnight with a primary antibody diluted in TBST containing 5% dried milk (5% BSA for phosphoprotein). The primary antibodies used in this study were: mouse anti-EphA4 (Invitrogen, 1µg/ml), rabbit anti-CD3ζ (Spring Bioscience, 0,5µg/ml), mouse anti-PSD95 (Abcam, 1µg/ml), mouse anti-GluN1 (BD Pharmigen, 1µg/ml), rabbit anti-GluN2A (Millipore, 2µg/ml), mouse anti-GluN2B (NeuroMab, 2µg/ml), rabbit anti-GluA1 (Calbiochem, 5µg/ml), rabbit anti-Phospho831 GluA1 (Millipore), rabbit anti-Phospho286 CamKII (Promega, 1:200) mouse anti-CamKIIα (Thermo Scientific, 0.5µg/ml) or mouse anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnologies, 0.2µg/ml). The membrane was then washed in TBST, incubated for 1h in peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1000) or in peroxidase-conjugated donkey anti-mouse antibody (1:1000) respectively, and visualized using an enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK) and Fujifilm LAS-400 imaging analysis system. Quantification of signal intensity was performed using Muligauge V3.0 software. For phosphorylation analysis, signal intensity of the phosphoprotein was divided by the signal of the total protein and normalized to control values. The statistical analysis was performed using Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. For co-immunoprecipitation quantification, signal intensity of the coimmunoprecipitated protein was normalized to the signal intensity of the protein in the input sample then divided by the signal intensity of the immunoprecipitated protein. The

CD3 ζ ^{-/-} values were normalized to CD3 ζ ^{+/+} values. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software.

Results

CD3 ζ knock out leads to spatial learning and working memory deficits

The expression of a nonfunctional truncated CD3 ζ mRNA, lacking exon 2, was verified in the hippocampus of CD3 ζ ^{-/-} mice (Fig. 1A). Immunoblots from mouse brain homogenates labeled with CD3 ζ antibody confirmed that no CD3 ζ protein was expressed in the knock-out mice, as previously described (Fig. 1B) (Malissen et al., 1993).

Ten to twelve weeks old CD3 ζ ^{-/-} mice old did not differ significantly from congenic CD3 ζ ^{+/+} animals in overall health and appearance, body weight, and in spontaneous behavior in the home cage. The learning and spatial memory performances of CD3 ζ ^{-/-} mice were evaluated with the Barnes circular maze test, a hippocampus-dependent cognitive task that requires spatial reference memory (Barnes, 1979; Bach et al., 1995). Both CD3 ζ ^{+/+} ($n=8$) and CD3 ζ ^{-/-} ($n=11$) mice learned to locate the escape hole with the hidden box during the course of the training period (days 1–4), as indicated by a progressive reduction in the time needed to reach the target hole (Fig.1C). However, CD3 ζ ^{-/-} mice did not perform as well as CD3 ζ ^{+/+} mice, as indicated by a significant increase of the time needed to find the escape hole at Day 2 and Day 4 of the training as compared to CD3 ζ ^{+/+} mice (Day 2: CD3 ζ ^{+/+}: 96.5±11.3 sec; CD3 ζ ^{-/-}: 142.8±11.3 sec $p<0.05$; Day 4: CD3 ζ ^{+/+}: 50.9±15.4 sec; CD3 ζ ^{-/-}: 103.2±13.34 sec $p<0.05$, Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test; Fig. 1C). No difference in velocity between the groups was observed indicating that CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice showed comparable motor capacity (Fig. 1D). However, CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice showed a different search strategy profile to locate the escape tunnel during the training period. Initially, both wild-type and mutant mice mainly employed the random search strategy, in which mice explored many holes in an unsystematic fashion, with many center crossings. At Day 1, the proportion of random strategy is 96.8 %±3.1 and 97.7 %±2.3 for CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice respectively (Fig. 1E,F). As from Day 2, CD3 ζ ^{+/+} transiently employed the serial search strategy, characterized by a methodical exploration of consecutive hole, and thereafter progressively shift to a spatial search strategy, the most efficient strategy in which

mice take the direct course to the escape tunnel. While mutant mice were able to shift from the random to the serial-search strategy, they failed to use the spatial-search strategy consistently (Fig. 1E,F). At Day 4, i.e. at the end of the training period, the spatial-search strategy was employed by $40.6\% \pm 14.9$ and $15.9\% \pm 5.1$ of $CD3\zeta^{+/+}$ ($n=8$) and $CD3\zeta^{-/-}$ ($n=11$) mice, respectively ($p < 0.05$; Two way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test). Probe trials in which the escape box was removed were performed at Day 5 and Day 12. The working memory was assessed by counting the number of nose pokes into the target hole, which corresponds to the former location of the escape box, and to its adjacent holes. For both probe tests at days 5 and 12, the group of $CD3\zeta^{+/+}$ mice showed a preference for the target hole as compared to adjacent holes indicating a good memory of that location (number of nose pokes for the target vs adjacent holes is 3.5 ± 0.5 vs 0.775 ± 0.19 at Day 5 $p < 0.001$; 2.71 ± 0.56 vs 1 ± 0.24 at Day 12 $p < 0.05$; Two way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test; Fig. 1G,H). By contrast, the group of $CD3\zeta^{-/-}$ mice showed no significant difference between the target and adjacent holes, suggesting impairment in working memory (number of nose pokes = 1.74 ± 0.39 vs 0.71 ± 0.17 at Day 5, $p > 0.05$; 1.22 ± 0.59 vs 0.5 ± 0.17 at Day 12, $p > 0.05$; Two way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test). It has been reported that $CD3\zeta^{-/-}$ mice exhibited developmental abnormalities of the visual system (Huh et al., 2000; Xu et al., 2010), which might in turn affect their visual abilities required to locate the escape hole using extra maze visual cues. By contrast, $CD3\zeta^{+/+}$ mice showed an absence of retinal deficiency and an electroretinogram similar to that of $CD3\zeta^{+/+}$ mice (Xu et al., 2010). Thus, the behavior of $CD3\zeta^{+/+}$ mice in the Barnes maze should entirely reflect the learning and memory performance of these mice without the interference of potential visual defects. During the course of the training period, $CD3\zeta^{+/+}$ mice exhibited a similar pattern than the $CD3\zeta^{-/-}$ mice with a significant increase in the time needed to reach the target hole at Day 4 compared to $CD3\zeta^{+/+}$ mice ($CD3\zeta^{+/+}$ 50.9 ± 15.4 sec, $CD3\zeta^{-/-}$ 101.7 ± 23.3 sec; $p < 0.05$; Two way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test; Fig 1.C). As shown in Fig. 1G,H, probe trials performed at days 5 and 12 indicated that $CD3\zeta^{+/+}$ mice did not significantly differentiate

between the target and adjacent holes. Compared to CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice, the group of CD3 ζ ^{+/-} mice showed an intermediate phenotype suggesting a gene dose-dependent effect on memory. This result shows that the poor performance of the heterozygous CD3 ζ ^{+/-} mice in the Barnes maze is attributable to spatial learning and memory deficits and not to visual impairment.

Spatial learning and working memory were also assessed using a spatial location memory task. In this task, mice were habituated for 10 min to four different objects placed in a defined spatial orientation. Mice were tested 24h later in a new object configuration in which two objects were moved to a novel location. Contacts with the “old location” and “novel location” objects were counted in both sessions. There were striking effects on reexploration of the displaced objects, in which a renewed interest (increased contacts) with the object was observed in wild-type but not in CD3 ζ ^{-/-} and CD3 ζ ^{+/-} mice as indicated by the percentage of preference for the novel location compared to the old location (CD3 ζ ^{+/+} 60.33±3.75% vs 39.66±3.75, $n=6$ $p < 0.05$; CD3 ζ ^{+/-} 49.53±2.34% vs 50.45±2.34%, $n=5$, $p>0.05$; CD3 ζ ^{-/-} 48.23±3.70% vs 51.77±3.70%, $n=4$, $p>0.05$; Two way ANOVA with Bonferroni comparison post-hoc test). Altogether, these results support a role of CD3 ζ in spatial learning and working memory.

Impaired spatial memory of CD3 ζ ^{-/-} mice is independent of T cell deficiency

Mice lacking CD3 ζ exhibited a marked decrease in circulating mature T cells (Liu et al., 1993; Love et al., 1993; Malissen et al., 1993), which might account for the cognitive impairment observed in CD3 ζ ^{-/-} mice. Indeed, in mice with normal immune system, depletion of T cells by administration of anti-CD4 antibodies or the immunosuppressive drug FTY720 results in cognitive impairment within 7 days in a water maze paradigm (Wolf et al., 2009; Derecki et al., 2010). Immunodeficient mice injected with splenocytes from wild-type counterparts showed a significant improvement of their performance on learning and memory tasks (Kipnis et al., 2004), while injection of T cell-depleted splenocytes did not affect their

performance, indicating that cognitive improvement was T cell dependent (Brynskikh et al., 2008; Ron-Harel et al., 2008). To examine whether the T cell deficiency of CD3 ζ ^{-/-} mice might underlie their impaired memory performance, CD3 ζ ^{-/-} mice were repopulated to a normal level of T cells by syngeneic BMT, and subsequently evaluated for memory performance in the Barnes maze. Donor and recipient mice expressed different alleles of the CD45, and can therefore be differentiated by flow cytometry using this congenic marker. Irradiated CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} CD45.2 mice received 15×10^6 bone marrow cells from C57BL/6 CD45.1 mice and immune cell reconstitution was analyzed by flow cytometry from blood samples at 14, 42 and 56 days post-transplantation (Fig. 2A). Importantly, all the grafted mice developed multilineage chimerism as assessed by the presence of monocytes and B cells (data not shown) as soon as 4 days post-BMT and by the presence of T cells 42 days post-BMT. We observed a progressive increase of donor-derived T cells (CD45.2⁺) in both CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice (Fig 2.A). Forty-two days after BMT, the proportion of mature T cells (CD3 ϵ ⁻ and TCR β ⁻ positive cells) in grafted CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice was similar to naïve CD3^{+/+} mice. This result indicated that the bone marrow cells engrafted efficiently and that transplanted CD3 ζ ^{-/-} mice develop normal level of donor-derived T cells (CD3 ϵ ⁺ 25.99 \pm 1.56% and 18.61 \pm 1.37% of total cells for grafted CD3 ζ ^{+/+} and grafted CD3 ζ ^{-/-} mice respectively; TCR β ⁺ 26.51 \pm 1.62% and 20.50 \pm 1.42% of total cells for grafted CD3 ζ ^{+/+} and grafted CD3 ζ ^{-/-} mice respectively; $n=10-11$, $p>0.05$; Kruskal-Wallis Test with Dunn's post-hoc test; Fig. 2B,C). Working memory was assessed in the Barnes maze at Day 42 post-BMT (D42). Despite T cell replenishment, grafted CD3 ζ ^{-/-} mice still showed no preference for the target hole compared to the adjacent holes (Fig. 2D). Notably, comparable levels of T cells were observed in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice at the end of the behavioral session at Day 56 suggesting that the efficiency of T cell repopulation remained similar in both groups during the entire behavioral test period (Fig. 2A). The failure of T cell replenishment to restore memory performance in CD3 ζ ^{-/-} mice suggested that the impaired learning and working memory of CD3 ζ ^{-/-} mice is likely independent of the T cell deficiency.

Decrease of synaptic GluN2A subunit and GluN2A-PSD95 interaction in CD3 ζ ^{-/-} mice

In the central nervous system, CD3 ζ is mostly expressed in neurons (Baudouin et al., 2008; Xu et al., 2010; Angibaud et al., 2011). In cortical cultured neurons from CD3 ζ ^{+/+} mice, CD3 ζ immunoreactivity is distributed in clusters mainly overlapping the glutamatergic synaptic marker PSD95 in agreement with previous data from rat hippocampal cultured neurons (Fig. 3A) (Baudouin et al., 2008). Moreover, no overlap was observed between CD3 ζ and the GABAergic synaptic marker glutamic acid decarboxylase (GAD), indicating the preferential localization at glutamatergic synapses (Fig. 3B). No CD3 ζ staining was observed in CD3 ζ ^{-/-} neurons supporting the specificity of the immunostaining provided by the CD3 ζ antibody (Fig. 3C). To further detail the synaptic localization of CD3 ζ , neurons immunolabeled for CD3 ζ and either the postsynaptic NMDA receptor (NMDAR) subunit GluN1 or the presynaptic protein SV2 were analyzed by confocal microscopy to achieve a 3D-reconstruction. The representation of 3D reconstruction indicated an overlap of the CD3 ζ and GluN1 immunolabelings whereas CD3 ζ clusters were mostly apposed to SV2 clusters without any detectable overlap, supporting a postsynaptic localization of CD3 ζ in cortical neurons (Fig. 3D). The synaptic localization of CD3 ζ was further confirmed by immunoblot analysis from rat brain in which the expression of CD3 ζ was detected in the synaptic membrane fraction (Fig. 3E). We next assessed by immunofluorescence studies in cortical neuron cultures whether the lack of CD3 ζ would affect the distribution of glutamate receptors. Immunostainings for NMDAR and AMPA glutamate receptor (AMPA) subunits and for the scaffolding molecule PSD95 were performed at 15 DIV in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} cultured neurons. For each synaptic proteins examined, the total number of clusters along dendrite, including synaptic and extrasynaptic clusters, was similar in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} neurons (Fig. 4A). By contrast, the number of synaptic clusters, quantified by double labeling with the presynaptic protein Synapsin I, showed that the proportion of synaptic NMDAR subunit GluN2A was reduced in CD3 ζ ^{-/-} neurons as compared to CD3 ζ ^{+/+} neurons

(56.02±3.27% and 39.48±3.87% of total clusters in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} neurons respectively, $n=30$, $p<0.01$; Student t test) (Fig. 4A,B,C). The number of synaptic clusters for GluN1, GluN2B, AMPAR subunit GluA1 and PSD95 was unchanged. In agreement with these in vitro data, Western blots performed with synaptosome-enriched fractions from mice brain indicated that the amount of GluN2A was significantly reduced in mutant mice as compared with CD3 ζ ^{+/+} (GluN2A signal intensity normalized to GAPDH level is 338.56±43.4 in CD3 ζ ^{+/+}; 164.75±7.77% in CD3 ζ ^{-/-}, $n=5$, $p<0.01$; Two way ANOVA with Bonferroni post-hoc test), while no modification of GluN1 and GluN2B expression level was observed (Fig. 4D,E). Interestingly, no significant change in GluN1, GluN2B or GluN2A subunit levels was detected in the whole membrane fraction (Fig. 4D,E). These results suggest that the lack of CD3 ζ selectively affects synaptic accumulation of GluN2A without interfering with the cellular expression levels. We next ask whether CD3 ζ would interact with glutamate receptors by performing coimmunoprecipitation experiments. Mice brain homogenates solubilized in 1% Triton X-100 were immunoprecipitated with a monoclonal CD3 ζ antibody and the immunoprecipitates were analyzed by immunoblot for GluN2A and GluA1. As shown in Fig. 4F, only GluN2A was detected in the protein complex. Control experiments using a nonspecific IgG or performed with CD3 ζ ^{-/-} brain lysate showed an absence of GluN2A signal in the immunoprecipitated complex, indicating the specificity of the interaction between CD3 ζ and GluN2A. Having shown that CD3 ζ interacts with GluN2A and that its absence downregulates the synaptic localization of GluN2A, we speculated that CD3 ζ may facilitate the association of NMDARs with the membrane-associated guanylate kinases (MAGUK) protein PSD95, a major scaffolding molecule involved in the cell surface stabilization and synaptic localization of NMDARs (Kornau et al., 1995; Steigerwald et al., 2000; Lavezzari et al., 2003). To test this hypothesis, the association between PSD95 and its preferential interacting subunit GluN2A was studied by immunoprecipitation assay in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice brain lysates. PSD95 immunoprecipitated with GluN2A in CD3 ζ ^{+/+} but not in CD3 ζ ^{-/-} brain lysate, indicating that the interaction between PSD95 and GluN2A is disrupted in CD3 ζ ^{-/-}

-/- mice (Fig. 4G). These experiments identify CD3 ζ as a novel interacting partner of GluN2A. This interaction seems to consolidate the association between GluN2A and PSD95, which might consequently promote the synaptic expression of GluN2A-containing NMDARs in neurons.

Defect in activity-dependent CaMKII autophosphorylation in CD3 ζ *-/-* neurons

In addition to the synaptic anchoring of NMDARs, PSD95 is critical to assemble NMDA receptor-associated protein complex, thereby supporting the functional coupling of NMDARs with downstream signaling at synapses (Sheng and Kim, 2011; Sanz-Clemente et al., 2013). We thus investigated whether the lack of CD3 ζ might affect downstream signaling pathways at glutamatergic synapses.

We have previously reported that CD3 ζ interacts with the ephrin receptor EphA4 and acts downstream of an ephrinA1/EphA4 pathway to mediate early neuronal morphogenesis (Angibaud et al., 2011). In mature neurons, EphA4 is a component of the glutamatergic synapses and is involved in the regulation of dendritic spine morphology and hippocampal synaptic plasticity (Grunwald et al., 2004; Murai and Pasquale, 2004; Inoue et al., 2009). Increased synaptic activity induces the processing of EphA4 by γ -secretase, resulting in the formation of a cleaved EphA4 intracellular domain (EICD), which has the ability to enhance the formation of dendritic spines (Inoue et al., 2009). We postulated that CD3 ζ might be part of a NMDA-EphA4 receptor protein complex, and might therefore regulate the level of EphA4 processing in a coordinated manner with synaptic activation. We thus examined whether the lack of CD3 ζ would alter the level of EICD. Western blot analysis of EICD showed no difference in brain lysates from CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice (Fig. 5A,B). The processing of EphA4 was further analyzed in primary cortical neuron cultures in which the spontaneous synaptic activity was increased by application of the adenylate cyclase activator forskolin and the phosphodiesterase inhibitor rolipram (F/R), a treatment previously shown to induce EICD production (Inoue et al., 2009). This treatment enhanced the processing of EphA4 similarly in

CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} neurons (Fig. 5C,D), indicating that CD3 ζ is likely not involved in the synaptic activity-induced processing of EphA4.

Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is a key synaptic signaling molecule at glutamatergic synapses and has a well-documented role in the induction of LTP (Lisman et al., 2012). The current model is that the opening of NMDARs during the induction of LTP leads to calcium entry that triggers activation of CaMKII. This calcium elevation induces the synaptic translocation of CaMKII and its binding to NMDARs. Then, the autophosphorylation at the threonine-286 (T286) in the alpha isoform switches the kinase into an active conformation which persists even after the calcium concentration falls to baseline levels. The autophosphorylation of CaMKII is a prerequisite for changes in synaptic strength, such as LTP (Giese et al., 1998; Hudmon and Schulman, 2002). We examined whether the synaptic translocation and level of autophosphorylated CaMKII would be affected by the lack of CD3 ζ . NMDA-dependent synaptic plasticity was induced in cortical neuron cultures using a glycine-induced LTP protocol (Gly-LTP). Application of glycine in the absence of Mg²⁺ relies on synaptic release of glutamate and thus activates only synaptic NMDARs (Lu et al., 2001), resulting in LTP manifest by long-lasting increase in mEPSC amplitude and frequency (Lu et al., 2001; Kopec et al., 2006) and synaptic translocation of CaMKII and GluA1 (Liao et al., 2001; Lu et al., 2001; Oh and Derkach, 2005; Sharma et al., 2006). In CD3 ζ ^{+/+} neurons, Gly-LTP stimulates the translocation of CaMKII from dendritic shafts to spines by more than two fold whereas this effect was abolished in CD3 ζ ^{-/-} neurons (control vs Gly-LTP $p < 0.001$ for CD3 ζ and $p > 0.05$ for CD3 ζ ^{-/-}, Two way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test; Fig. 6A,B). Moreover, increased of autophosphorylated CaMKII at T286 was significantly induced by Gly-LTP in CD3 ζ ^{+/+} but absent in CD3 ζ ^{-/-} neurons (Fig. 6C,D; control vs Gly-LTP $p < 0.05$ for CD3 ζ ^{+/+} and $p > 0.05$ for CD3 ζ ^{-/-}, Two way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test). A key event to maintain the synaptic localization and active conformation of CaMKII is the binding of CaMKII to several postsynaptic density proteins, among which GluN2 subunits of the NMDAR appears to be of primary importance.

The interaction of CaMKII with the GluN2A and GluN2B subunits was assessed by coimmunoprecipitation from CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice brain lysates. CaMKII was immunoprecipitated with GluN2A from CD3 ζ ^{+/+} mice brain but not from CD3 ζ ^{-/-} mice brain (Fig. 6 E). By contrast, CaMKII was immunoprecipitated with GluN2B in both CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} brain homogenates. However, CaMKII signal was consistently lower in CD3 ζ ^{-/-} deficient than in wild-type brain suggesting a reduced interaction between GluN2B and CaMKII in CD3 ζ ^{-/-} neurons (Fig. 6 E,F). In addition, we observed a stronger coimmunoprecipitated CaMKII signal with GluN2B than with GluN2A, consistent with the reported higher affinity of CaMKII to GluN2B than to GluN2A (Strack and Colbran, 1998; Gardoni et al., 1999; Leonard et al., 1999). These data suggest that the reduced activity-induced synaptic accumulation and phosphorylation at T286 of CaMKII in CD3 ζ ^{-/-} neurons likely results from a defective CaMKII-NMDAR interaction.

The lack of CD3 ζ ^{-/-} impairs activity-dependent synaptic recruitment of the AMPAR subunit GluA1

The decrease of CaMKII activation in CD3 ζ ^{-/-} neurons might impact AMPARs channel properties and trafficking. Activated CaMKII promotes the enhancement of AMPA-mediated transmission during LTP through two main processes. One process increases the conductance of AMPARs through a CaMKII-dependent phosphorylation of GluA1, mainly at Ser831 (S831) (Kristensen et al., 2011). The second process is the insertion of AMPARs into synapses. This mechanisms is thought to be achieved through the CaMKII dependent-phosphorylation of the GluA1 auxiliary subunit stargazin, which in turn allows AMPAR to bind to PSD95, resulting in the anchoring of AMPARs at the synapse (Tomita et al., 2005; Opazo et al., 2010). We thus asked whether activity-dependent GluA1 phosphorylation at Ser831 or GluA1 recruitment at synaptic sites would be affected by the lack of CD3 ζ . Cortical neuron cultures were subjected to Gly-LTP; the cells were then collected and analyzed by Western blot for the level of phosphorylated GluA1 at S831 using a phospho-S831 GluA1 antibody.

The Gly-LTP protocol induced an increase of the phospho-S831 GluA1 similarly in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} neurons (Fig. 7A,B). The effect of Gly-LTP on the synaptic recruitment of GluA1 was achieved by immunofluorescence studies. Neurons were immunolabeled for GluA1 and the postsynaptic marker PSD95. Synaptic GluA1 was defined as GluA1 clusters colocalized with PSD95 clusters. Gly-LTP induced a more than 2 fold increase of synaptic GluA1 in CD3 ζ ^{+/+} neurons compared with mock-stimulated control (Two way ANOVA with Bonferroni post-hoc test $p < 0.01$; Fig. 7 C,D). By contrast, CD3 ζ ^{-/-} neurons failed to undergo the synaptic accumulation of GluA1 upon Gly-LTP (Two way ANOVA with Bonferroni post-hoc test $p > 0.05$; Fig. 7 C,D). As a control, PSD95 protein clustering was unaffected by genotype or stimulation (Fig. 7E). These results suggest that the deficiency of CaMKII autophosphorylation in CD3 ζ ^{-/-} neurons preserves the signaling pathway required for the GluA1 phosphorylation at S831 but affects the synaptic recruitment of GluA1.

Discussion

This study identified for the first time the immunoreceptors-associated protein CD3 ζ as a key mediator in learning and memory. We found that the impaired cognitive behavior of CD3 ζ ^{-/-} mice is independent of T cell deficiency, but associated with major alterations of glutamatergic synapses. Specifically, our data showed that CD3 ζ promotes GluN2A synaptic localization and the formation of GluN2-CaMKII complexes. Moreover, CD3 ζ is required for NMDA-dependent CaMKII activation and for the synaptic recruitment of the AMPAR subunit GluA1. Together, these results support the model that the pro-cognitive function of CD3 ζ may be mediated through its involvement in the NMDAR downstream signaling pathway leading to CaMKII-dependent LTP induction.

Our study showed that CD3 ζ -deficient mice exhibited impaired learning behavior and working memory as examined by spatial learning and memory tasks in the Barnes maze and a spatial location memory task. In CD3 ζ ^{-/-} mice, the level of circulating mature T cells is dramatically reduced (Liu et al., 1993; Love et al., 1993; Malissen et al., 1993). Given the importance of peripheral circulating T cells in cognitive functions and neural plasticity (Yirmiya and Goshen, 2011; Kipnis et al., 2012), CD3 ζ ^{-/-} mice were repopulated to a normal level of T cells by syngeneic BMT. This approach did not restore the cognitive deficit of CD3 ζ ^{-/-} mice, indicating that replenishment with WT T cells had no influence on cognitive behavior of CD3 ζ ^{-/-} mice. One possibility is that the low numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells produced in CD3 ζ ^{-/-} mice (Shores et al., 1998) might be sufficient to maintain the required T cell repertoire in the meninges, shown to constitute a candidate site for beneficial T cell interaction with CNS (Derecki et al., 2010; Radjavi et al., 2013), and therefore sufficient to preserve the T cell-based support of learning and memory. Our results suggest strongly that the dominant cause for cognitive deficit of CD3 ζ ^{-/-} mice involved the brain per se rather than peripheral immune defects. Consistent with this interpretation, we found a postsynaptic enrichment of CD3 ζ at glutamatergic synapses and defects in Gly-LTP in CD3 ζ ^{-/-} neurons

suggesting essential postsynaptic functions of CD3 ζ at glutamatergic synapses, in agreement with previous studies in the hippocampus and the retina (Huh et al., 2000; Xu et al., 2010). We now delineate a mechanism by which CD3 ζ contributes to the plasticity of glutamatergic synapses. We found that CD3 ζ promotes GluN2A synaptic localization and GluN2-CaMKII interaction. CaMKII binding to the NMDAR subunit GluN2 seems to have a key role in the CaMKII-dependent LTP induction (Barria and Malinow, 2005; Zhou et al., 2007). Accordingly, our data show that CD3 ζ is required for activity-induced CaMKII autophosphorylation and GluA1 synaptic recruitment, two key events for LTP and memory formation (Lisman et al., 2012). Together, these data suggest that the role of CD3 ζ in cognition is mediated by its contribution to the NMDAR downstream signaling pathway leading to CaMKII activation and subsequent synaptic translocation of GluA1.

Our results showed that the lack of CD3 ζ in cortical neuron cultures inhibited Gly-LTP as reflected by a marked decrease of CaMKII autophosphorylation and GluA1 synaptic translocation. However electrophysiological recording in CD3 ζ ^{-/-} hippocampal slices reported an enhanced NMDA-dependent LTP compared to WT mice (Huh et al., 2000). The conflicting conclusions between the two studies likely result from the difference in experimental systems (brain hippocampal slices vs cortical neuron culture), and more importantly, in the paradigm used to induce LTP. Accordingly, LTP elicited by weak tetanic stimulations of 5 or 10 Hz was abrogated in LIMK1 deficient mice while a more robust stimulation induced by high frequency of 50 or 100 Hz was shown to have the opposite effect in LIMK1 knockout mice which then exhibited enhanced LTP (Meng et al., 2002). We induced NMDAR-dependent LTP in cortical neurons by a Gly-induced protocol that requires spontaneous release of glutamate from opposing terminals to specifically activate postsynaptic NMDARs, which is thought to mimic standard weak LTP protocol (Lu et al., 2001; Kopec et al., 2006; Fortin et al., 2010). In contrast, Huh et al. used a strong high frequency stimulation (4x100Hz) to induce LTP (Huh et al., 2000). Similarly to LIMK1, the

lack of CD3 ζ might differentially affect the propensity to develop LTP depending on the paradigm used to induce LTP.

The lack of CD3 ζ in GluN2A-containing protein complex affects GluN2A in two ways: first, its synaptic localization, as demonstrated *in vivo* by immunoblot of synaptosome-enriched fraction from CD3 ζ ^{-/-} mice brain and *in vitro* by GluN2A immunofluorescence of cortical neuron cultures; second, and its association with PSD95 as demonstrated by coimmunoprecipitation experiments. Given the key involvement of PSD95 in the expression and stabilization of GluN2A at synapses (Kornau et al., 1995; Sprengel et al., 1998; Steigerwald et al., 2000), the role of CD3 ζ in regulating synaptic GluN2A might be mediated through its regulation of GluN2A-PSD95 interaction. However about 50% reduction of synaptic GluN2A was observed in CD3 ζ ^{-/-} mice, in contrast to the total loss of GluN2A-PSD95 association in CD3 ζ ^{-/-} mice brain. This discordance suggests that the synaptic localization of GluN2A also relies on mechanisms independent of a GluN2A-PSD95 interaction, consistent with previous studies showing significant functional role of other MAGUKs, such as SAP97 and SAP102, and additional GluN2 binding partners, such as alpha-actinin, in the synaptic localization of NMDARs (Wyszynski et al., 1997; Dunah et al., 2000). Our data showed that the decrease in synaptic GluN2A in CD3 ζ ^{-/-} neurons is associated with a massive reduction of Gly-LTP-induced translocation of CaMKII to dendritic spine and CaMKII autophosphorylation at threonine-286. It is now well established that CaMKII autophosphorylation is a significant downstream event of NMDARs activation leading to the increase of AMPAR-mediated transmission during plasticity, and we show now that CD3 ζ is required in this process. The maintenance of CaMKII at postsynaptic sites for prolonged period of time and persistence into an active state critically depends on CaMKII binding to the GluN2 subunit of NMDARs (Lisman et al., 2012). Accordingly, we found a defect in CaMKII interaction with GluN2 in CD3 ζ ^{-/-} mice brain as reflected by lower co-IP of CaMKII with GluN2A as well as GluN2B in CD3 ζ ^{-/-} mice. CD3 ζ has three immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) in its intracellular domain, which serve as docking

site for several kinases, enabling the formation of TCR-signaling protein complex during T cell activation (Pitcher and van Oers, 2003). By analogy with T cells, neuronal CD3 ζ might contribute to the stabilization of CaMKII in the close proximity of NMDARs at synaptic sites through an ITAM-mediated docking activity.

To address the consequences of CD3 ζ -mediated signaling cascade in CaMKII-dependent synaptic plasticity, we focused our studies on two main CaMKII-dependent signaling processes leading to the potentiation of AMPA receptor function. One process is the phosphorylation at S831 of the GluA1 subunit of the AMPAR resulting in an increase of the channel conductance (Derkach et al., 1999; Patterson et al., 2010; Lisman et al., 2012). The second process involves an increase in the number of AMPARs at synapse (Shi et al., 1999). Extrasynaptic mobile AMPARs are trapped through the CaMKII-mediated phosphorylation of the auxiliary subunit stargazin and its binding to PDZ domain scaffolds, such as PSD95 (Tomita et al., 2005; Bats et al., 2007; Opazo et al., 2010). We found that the lack of CD3 ζ had no effect on the phosphorylation of GluA1 at S831 but inhibited the activity-induced synaptic recruitment of GluA1. This finding is consistent with previous studies demonstrating that the capture of AMPARs at synapse through a CaMKII-mediated signaling is independent of AMPARs phosphorylation at S831 (Opazo et al., 2010). Thus CD3 ζ is required for the activity-driven enhancement of AMPARs at synapse. The exact mechanism by which CD3 ζ selectively supports the synaptic recruitment of GluA1 remains to be determined. The cytoplasmic domain of CD3 ζ contains a stretch of basic amino acid residues shown to bind with high affinity to phosphoinositides, including the phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate (PIP3). This CD3 ζ -phosphoinositide interaction is required in T cells for the stable accumulation of TCR-CD3 complex at the immunological synapse (DeFord-Watts et al., 2011). PIP3 plays a critical role in the maintenance and in the CaMKII-induced increase of AMPARs at synaptic membrane (Arendt et al., 2010). PIP3 seems to act at a very local scale, by ensuring PSD-95-mediated clustering of AMPARs at the postsynaptic membrane and, therefore, preventing receptor dispersion into the neighboring extrasynaptic membrane

of the spine. It is possible that CD3 ζ contributes to the activity-induced synaptic recruitment of AMPARs by linking PIP3 with AMPAR-stargazin complex through PSD95.

References

- Angibaud J, Louveau A, Baudouin SJ, Nerriere-Daguin V, Evain S, Bonnamain V, Hulin P, Csaba Z, Dournaud P, Thinard R, Naveilhan P, Noraz N, Pellier-Monnin V, Boudin H (2011) The immune molecule CD3zeta and its downstream effectors ZAP-70/Syk mediate ephrin signaling in neurons to regulate early neuritogenesis. *J Neurochem* 119:708-722.
- Arendt KL, Royo M, Fernández-Monreal M, Knafo S, Petrok CN, Martens JR, Esteban JA (2010) PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci*. 13:36-44.
- Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M (1995) Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell* 81:905-915.
- Barco A, Patterson S, Alarcon JM, Gromova P, Mata-Roig M, Morozov A, Kandel ER (2005) Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron* 48:123-137.
- Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93:74-104.
- Barria A, Malinow R (2005) NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 48:289-301.
- Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53:719-734.
- Baudouin SJ, Angibaud J, Loussouarn G, Bonnamain V, Matsuura A, Kinebuchi M, Naveilhan P, Boudin H (2008) The signaling adaptor protein CD3zeta is a negative regulator of dendrite development in young neurons. *Mol Biol Cell* 19:2444-2456.
- Boulanger LM (2009) Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 64:93-109.

- Brynskikh A, Warren T, Zhu J, Kipnis J (2008) Adaptive immunity affects learning behavior in mice. *Brain Behav Immun* 22:861-869.
- DeFord-Watts LM, Dougall DS, Belkaya S, Johnson BA, Eitson JL, Roybal KT, Barylko B, Albanesi JP, Wulfing C, van Oers NS (2011) The CD3 zeta subunit contains a phosphoinositide-binding motif that is required for the stable accumulation of TCR-CD3 complex at the immunological synapse. *J Immunol* 186:6839-6847.
- Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinnes KM, Crihfield A, Lynch KR, Kipnis J (2010) Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med* 207:1067-1080.
- Derkach V, Barria A, Soderling TR (1999) Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3269-3274.
- Dunah AW, Wyszynski M, Martin DM, Sheng M, Standaert DG (2000) alpha-actinin-2 in rat striatum: localization and interaction with NMDA glutamate receptor subunits. *Brain Res Mol Brain Res* 79:77-87.
- Fortin DA, Davare MA, Srivastava T, Brady JD, Nygaard S, Derkach VA, Soderling TR (2010) Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca²⁺-permeable AMPA receptors recruited by CaM-kinase I. *J Neurosci* 30:11565-11575.
- Fourgeaud L, Davenport CM, Tyler CM, Cheng TT, Spencer MB, Boulanger LM (2010) MHC class I modulates NMDA receptor function and AMPA receptor trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:22278-22283.
- Gardoni F, Schrama LH, van Dalen JJ, Gispen WH, Cattabeni F, Di Luca M (1999) AlphaCaMKII binding to the C-terminal tail of NMDA receptor subunit NR2A and its modulation by autophosphorylation. *FEBS Lett* 456:394-398.
- Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ (1998) Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279:870-873.

- Glynn MW, Elmer BM, Garay PA, Liu XB, Needleman LA, El-Sabeawy F, McAllister AK (2011) MHC1 negatively regulates synapse density during the establishment of cortical connections. *Nat Neurosci* 14:442-451.
- Goddard CA, Butts DA, Shatz CJ (2007) Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6828-6833.
- Grunwald IC, Korte M, Adelmann G, Plueck A, Kullander K, Adams RH, Frotscher M, Bonhoeffer T, Klein R (2004) Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nat Neurosci* 7:33-40.
- Hudmon A, Schulman H (2002) Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 364:593-611.
- Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ (2000) Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290:2155-2159.
- Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Togawa A, Matsui C, Arita K, Katahira-Tayama S, Sato T, Yamauchi E, Oda Y, Takai Y (2009) Synaptic activity prompts gamma-secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation. *J Cell Biol* 185:551-564.
- Kipnis J, Gadani S, Derecki NC (2012) Pro-cognitive properties of T cells. *Nat Rev Immunol* 12:663-669.
- Kipnis J, Cohen H, Cardon M, Ziv Y, Schwartz M (2004) T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8180-8185.
- Kopec CD, Li B, Wei W, Boehm J, Malinow R (2006) Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci* 26:2000-2009.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.

- Kristensen AS, Jenkins MA, Banke TG, Schousboe A, Makino Y, Johnson RC, Huganir R, Traynelis SF (2011) Mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. *Nat Neurosci* 14:727-735.
- Lavezzari G, McCallum J, Lee R, Roche KW (2003) Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology* 45:729-737.
- Leonard AS, Lim IA, Hemsworth DE, Horne MC, Hell JW (1999) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3239-3244.
- Liao D, Scannevin RH, Huganir R (2001) Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors. *J Neurosci* 21:6008-6017.
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S (2012) Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13:169-182.
- Liu CP, Ueda R, She J, Sancho J, Wang B, Weddell G, Loring J, Kurahara C, Dudley EC, Hayday A, et al. (1993) Abnormal T cell development in CD3-zeta^{-/-} mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine. *Embo J* 12:4863-4875.
- Love PE, Shores EW, Johnson MD, Tremblay ML, Lee EJ, Grinberg A, Huang SP, Singer A, Westphal H (1993) T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* 261:918-921.
- Lu W, Man H, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, Wang YT (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 29:243-254.
- Malissen M, Gillet A, Rocha B, Trucy J, Vivier E, Boyer C, Kontgen F, Brun N, Mazza G, Spanopoulou E, et al. (1993) T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *Embo J* 12:4347-4355.
- Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Janus C, Cruz L, Jackson M, Lu WY, MacDonald JF, Wang JY, Falls DL, Jia Z (2002) Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35:121-133.

- Murai KK, Pasquale EB (2004) Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *Neuroscientist* 10:304-314.
- Nakamura K, Hirai H, Torashima T, Miyazaki T, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsuji M, Lin QS, Tsukamoto K, Nishimura H, Ono M, Watanabe M, Hirose S (2007) CD3 and immunoglobulin G Fc receptor regulate cerebellar functions. *Mol Cell Biol* 27:5128-5134.
- Oh MC, Derkach VA (2005) Dominant role of the GluR2 subunit in regulation of AMPA receptors by CaMKII. *Nat Neurosci* 8:853-854.
- Opazo P, Labrecque S, Tigaret CM, Frouin A, Wiseman PW, De Koninck P, Choquet D (2010) CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* 67:239-252.
- Patterson MA, Szatmari EM, Yasuda R (2010) AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15951-15956.
- Pitcher LA, van Oers NS (2003) T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol* 24:554-560.
- Radjavi A, Smirnov I, Derecki N, Kipnis J (2013) Dynamics of the meningeal CD4 T-cell repertoire are defined by the cervical lymph nodes and facilitate cognitive task performance in mice. *Mol Psychiatry*.
- Ron-Harel N, Segev Y, Lewitus GM, Cardon M, Ziv Y, Netanel D, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Domany E, Schwartz M (2008) Age-dependent spatial memory loss can be partially restored by immune activation. *Rejuvenation Res* 11:903-913.
- Samelson LE, Harford JB, Klausner RD (1985) Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 43:223-231.
- Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW (2013) Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist* 19:62-75.
- Sharma K, Fong DK, Craig AM (2006) Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Mol Cell Neurosci* 31:702-712.

- Sheng M, Kim E (2011) The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R (1999) Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284:1811-1816.
- Shores EW, Ono M, Kawabe T, Sommers CL, Tran T, Lui K, Udey MC, Ravetch J, Love PE (1998) T cell development in mice lacking all T cell receptor zeta family members (Zeta, eta, and FcepsilonRIgamma). *J Exp Med* 187:1093-1101.
- Sprengel R, Suchanek B, Amico C, Brusa R, Burnashev N, Rozov A, Hvalby O, Jensen V, Paulsen O, Andersen P, Kim JJ, Thompson RF, Sun W, Webster LC, Grant SG, Eilers J, Konnerth A, Li J, McNamara JO, Seeburg PH (1998) Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* 92:279-289.
- Steigerwald F, Schulz TW, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH, Kohr G (2000) C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors. *J Neurosci* 20:4573-4581.
- Strack S, Colbran RJ (1998) Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 273:20689-20692.
- Tomita S, Adesnik H, Sekiguchi M, Zhang W, Wada K, Howe JR, Nicoll RA, Brecht DS (2005) Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature* 435:1052-1058.
- Wolf SA, Steiner B, Akpinarli A, Kammertoens T, Nassenstein C, Braun A, Blankenstein T, Kempermann G (2009) CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J Immunol* 182:3979-3984.
- Wyszynski M, Lin J, Rao A, Nigh E, Beggs AH, Craig AM, Sheng M (1997) Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385:439-442.

Xu HP, Chen H, Ding Q, Xie ZH, Chen L, Diao L, Wang P, Gan L, Crair MC, Tian N (2010)

The immune protein CD3zeta is required for normal development of neural circuits in the retina. *Neuron* 65:503-515.

Yirmiya R, Goshen I (2011) Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and

neurogenesis. *Brain Behav Immun* 25:181-213.

Zhou Y, Takahashi E, Li W, Halt A, Wiltgen B, Ehninger D, Li GD, Hell JW, Kennedy MB,

Silva AJ (2007) Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning. *J Neurosci* 27:13843-13853.

Legends

Figure 1. Impaired learning and memory in CD3 ζ ^{-/-} mice.

A, Identification of a truncated CD3 ζ mRNA in CD3 ζ ^{-/-} mouse hippocampus by PCR amplification. GAPDH amplification products indicated that PCR was performed on comparable level of cDNA. **B**, Undetectable expression of CD3 ζ protein in CD3 ζ ^{-/-} mice. Brain lysates from CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice were immunoblotted with an anti-CD3 ζ antibody. **C-I**, Cognitive behavior of CD3 ζ ^{-/-} mice in the Barnes maze task (C-H) and in the object location memory task (I). **C**, Performance measured as time to reach the target escape hole improved significantly in all groups over the course of training, but CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} groups required a significant increased amount of time to find the escape route. Data are mean \pm SEM ($n=8-11$), * $p<0.05$ (CD3 ζ ^{+/+} vs CD3 ζ ^{-/-}), # $p<0.05$ (CD3 ζ ^{+/+} vs CD3 ζ ^{+/-}) by Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. **D**, No difference in average velocities was found between CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice. Data are mean \pm SEM ($n=8-11$). **E**, Schematic diagram depicting the search strategies employed by the mice during the training period. **F**, Percentage of random, serial, or spatial search strategy used by the mice over the course of training. Data are mean \pm SEM ($n=8-11$). Compared to CD3 ζ ^{+/+} mice, the proportion of spatial search strategy used by CD3 ζ ^{-/-} mice is significantly reduced at Day 4, $p<0.05$ Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. **G-H**, Probe tests were performed after the last training session on the Barnes maze, at Day 5 (G) and Day 12 (H). Spatial memory was assessed by measuring the number of visits into the target hole and the two adjacent holes. CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice failed to show a preference for the target hole at both days 5 and 12. Data are mean \pm SEM ($n=7-11$) * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ by Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. **I**, CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} failed to show preference for a novel object location in the object location memory task. The histogram represents the percentage of object location preference measured by the time spent in exploring objects in old or novel location/total time spent in exploring objects during a 10 min

period. Data are mean \pm SEM ($n=4-6$) * $p<0.05$ by Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test.

Figure 2. Impaired spatial memory of CD3 ζ ^{-/-} mice is independent of T-cell deficiency.

A, Analysis of T cell population in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice before (naïve) and after (grafted) BMT at days 14, 42 and 56. Representative flow-cytometry dot plots of peripheral mononuclear cells stained for CD3 ϵ (T cell marker) and CD45.2 (recipient cell marker). Number in the corner of each quadrant corresponds to the percentage of the corresponding cell population. **B,C**, Percentage of T cells quantified with the T cell markers CD3 ϵ (B) and TCR β (C) in peripheral blood cells from 12-week-old CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice ($n= 7-10$). Data are mean \pm SEM. * $p< 0.05$ by Kruskal-Wallis with Dunn's Multiple comparison tests. Comparisons were made with naive CD3 ζ ^{+/+} group. **D**, Memory performance of grafted CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice in the Barnes maze task analyzed 42 days after BMT. Probe trials were performed at Day 5 of the test, after four days of training. Spatial memory was assessed by measuring the number of visits into the target hole and the two adjacent holes. Naïve and grafted CD3 ζ ^{-/-} mice failed to show a preference for the target hole. Data are mean \pm SEM ($n=8-11$). *** $p<0.001$ ** $p<0.01$ by Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc tests.

Figure 3. CD3 ζ localizes to glutamatergic postsynaptic sites.

A, Cortical cultures of CD3 ζ ^{+/+} neurons were fixed at 15 DIV and immunolabeled for CD3 ζ (red) and the glutamatergic postsynaptic marker PSD95 (green). CD3 ζ clusters were distributed along dendritic processes and mainly colocalized with PSD95 clusters as shown at higher magnification of the boxed region. **B**, Double labeling of CD3 ζ with GABAergic synaptic marker GAD shows no overlap between CD3 ζ and GAD clusters. **C**, Cultures of CD3 ζ ^{-/-} cortical neurons show an absence of CD3 ζ staining. **D**, Representation of 3D confocal microscopy reconstruction from cultured neurons immunolabeled for CD3 ζ (green)

and the glutamatergic postsynaptic marker GluN1 (red) or the presynaptic marker SV2 (red). **E**, Western blot analysis of brain homogenate, synaptosome and synaptic membrane prepared from adult rat brain. For each sample, 20-40µg of proteins were loaded on a 10% SDS-PAGE under non-reductive condition and immunoblotted with antibodies against CD3ζ, PSD95 and GAPDH. Scale bars, 10 µm.

Figure 4. CD3ζ is required for the synaptic localization of GluN2A and GluN2A-PSD95 interaction.

A, The number of GluN1, GluN2A, GluN2B, GluA1 and PSD95 clusters per length of dendrite was measured in 15 DIV CD3ζ^{+/+} and CD3ζ^{-/-} cultured cortical neurons immunostained for each protein ($n=3-4$). **B**, Levels of synaptic GluN1, GluN2A, GluN2B, GluA1 and PSD95 clusters in 15 DIV CD3ζ^{+/+} and CD3ζ^{-/-} cultured cortical neurons immunostained by double labeling of each postsynaptic protein with the presynaptic protein synapsin I. Data are mean \pm SEM ($n=3-4$) *** $p<0.01$, Mann-Whitney test. **C**, Representative images of 15 DIV cultured cortical neurons from CD3ζ^{+/+} and CD3ζ^{-/-} mice double-labeled with GluN2a and Synapsin I. Scale bar, 10µm. **D**, Western blot analysis of NMDAR subunits in total membrane fraction and synaptosome-enriched fraction from CD3ζ^{+/+} and CD3ζ^{-/-} mice brain. **E**, Quantification of the expression of NMDAR subunits in the total membrane fraction and synaptosome-enriched fraction of CD3ζ^{+/+} and CD3ζ^{-/-} mice brain normalized to GAPDH. Data are mean \pm SEM ($n=4$ for each group) ** $p<0.01$, Mann-Whitney test. **F**, GluN2A, but not GluA1, is coimmunoprecipitated with CD3ζ from CD3ζ^{+/+} mice brain lysate. Mice brain membrane homogenates solubilized in 1% Triton X-100 were immunoprecipitated with CD3ζ antibody. The immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and probed with GluN2A or GluA1 antibodies. GluN2A is not detected in protein complex immunoprecipitated from CD3ζ^{-/-} mice brain lysate. Input lanes contain 5% of extract used for IP. **G**, Disruption of GluN2A-PSD95 interaction in CD3ζ^{-/-} mice. CD3ζ^{+/+} and CD3ζ^{-/-} mice brain membrane homogenates

solubilized in 1% Triton X-100 were immunoprecipitated with GluN2A antibody and immunoblotted with a PSD95 antibody. Input lanes contain 5% of extract used for IP.

Figure 5. CD3 ζ is not required for the activity-induced processing of EphA4.

A, Western blot analysis of the cleaved EphA4 intracellular domain EICD in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice brain. Forebrain from CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice were solubilized in RIPA buffer and analyzed by Western Blot using an EphA4 antibody. **B**, For quantification, EICD signals were divided by EphA4 signals ($n=4$). **C**, Western blot analysis of the activity-induced increase of cleaved EphA4 intracellular domain EICD in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} cultured cortical neurons. Cultured neurons at 15 DIV were incubated for 16h with DMSO (CTRL) or forskolin and rolipram (F/R), and EphA4 processing was assessed by Western Blot using an EphA4 antibody. **D**, Quantification of the EICD/EphA4 ratio (percentage of control). Data are mean \pm SEM ($n=3$).

Figure 6. CD3 ζ is required for the activity-induced CamKII translocation to dendritic spines, autophosphorylation and association with the NMDAR subunits GluN2.

A, CaMKII detected by immunofluorescence showed an increased localization to dendritic spines in response to Gly-LTP in CD3 ζ ^{+/+}, but not CD3 ζ ^{-/-}, cultured cortical neurons. Scale bar, 5 μ m. **B**, The number of CamKII-positive dendritic spines per length of dendrite was measured in 15 DIV CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} cultured cortical neurons immunostained for CamKII. Data are mean \pm SEM ($n=3$) *** $p<0.001$ by Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. **C**, The increase of CamKII phosphorylation at T286 in response to Gly-LTP is abolished in CD3 ζ ^{-/-} neurons. The total level of CamKII is unaffected by genotype or stimulation. CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} cultured cortical neurons at 15 DIV were stimulated by Gly-LTP, and the cellular extracts were analyzed by Western blot using antibodies against phospho-T286 CamKII and total CamKII. **D**, For immunoblots quantification, phospho-T286 CamKII signals were divided by total CamKII signals and normalized to control values. The

data represent the mean \pm SEM ($n=4$) * $p<0.05$ by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. **E**, Coimmunoprecipitation of the GluN2A-CamKII and GluN2B-CamKII complex from CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} mice brain. Mice brain membrane homogenates solubilized in 1% Triton X-100 were immunoprecipitated with GluN2A or GluN2B antibodies. The immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and probed with CamKII antibody. Input lanes contain 5% of extract used for IP. **F**, Quantification of the coimmunoprecipitated CamKII signals with GluN2B antibody from mice brain lysates. Signal intensity of coIP CaMKII was normalized to signal intensity of CaMKII input, divided by signal intensity of IP GluN2B and normalized to CD3 ζ ^{+/+} value. Value is mean \pm SEM ($n=3$).

Figure 7. CD3 ζ is required for activity-induced GluA1 synaptic translocation.

A, Western blot analysis of the activity-induced increase of GluA1 phosphorylation at S831 in CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} cultured cortical neurons. Cultured neurons at 15 DIV were stimulated by Gly-LTP, and the cellular extracts were analyzed by Western blot using antibodies against phospho-S831 GluA1 and total GluA1. **B**, Quantification shown as a ratio of phospho-S831 GluA1 to total GluA1 normalized to the mean control. In both CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} neurons, Gly-LTP induced an increase of phospho-S831 compared to unstimulated cells. Values are mean \pm SEM ($n=4$), $p=0.02$ by Two-way ANOVA. **C**, GluA1 detected by immunofluorescence (red) showed an increased synaptic localization in response to Gly-LTP in CD3 ζ ^{+/+}, but not CD3 ζ ^{-/-}, cultured cortical neurons. Scale bar, 5 μ m. **D**, Levels of synaptic GluA1 determined by the number of GluA1-PSD95 clusters/total GluA1 clusters. Data are mean \pm SEM ($n=4$) ** $p<0.01$ by Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. **E**, The number of PSD95 clusters per length of dendrite was determined in 15 DIV CD3 ζ ^{+/+} and CD3 ζ ^{-/-} cultured cortical neurons immunostained for PDS95. Data are mean \pm SEM ($n=4$).

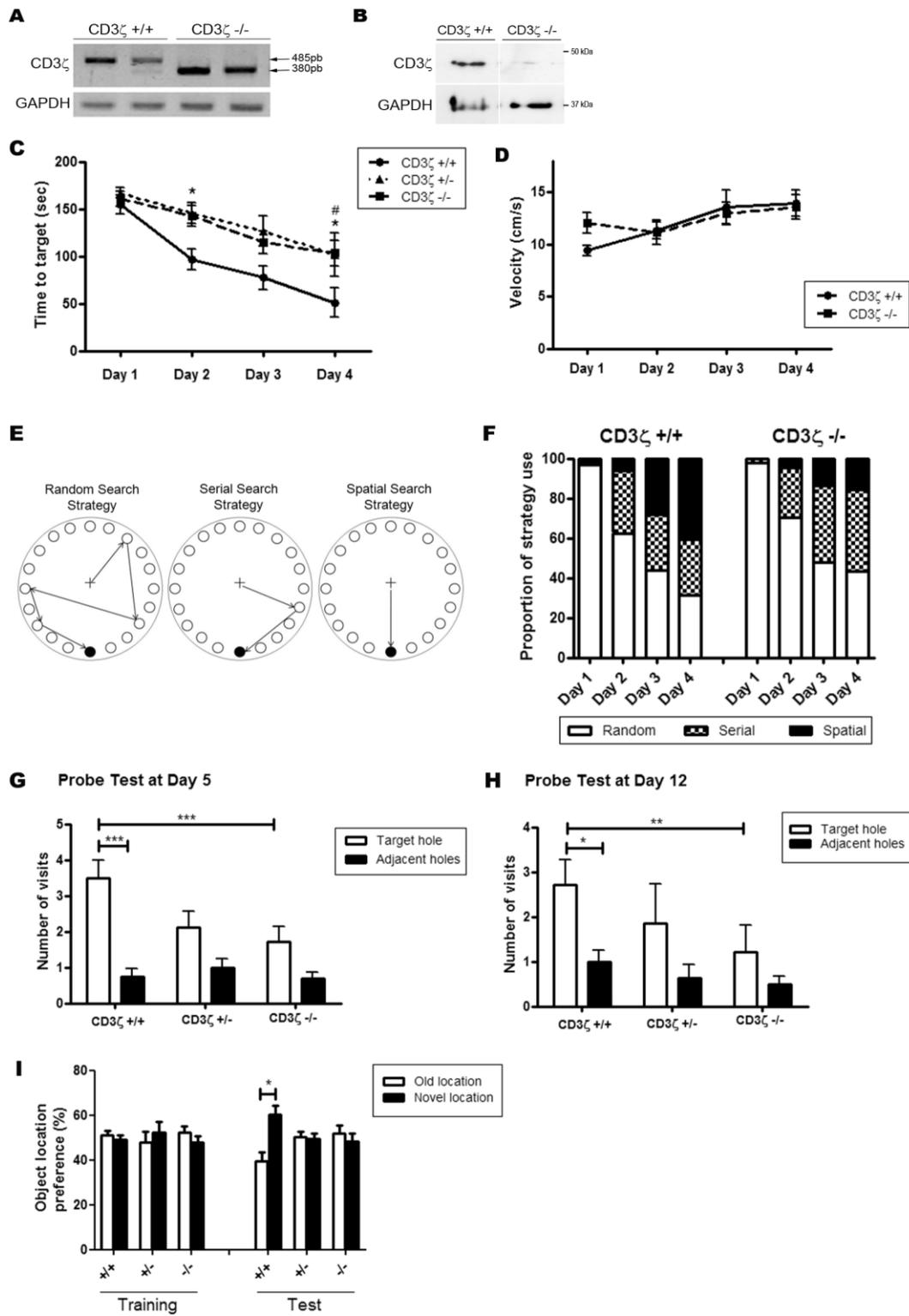


Figure 1

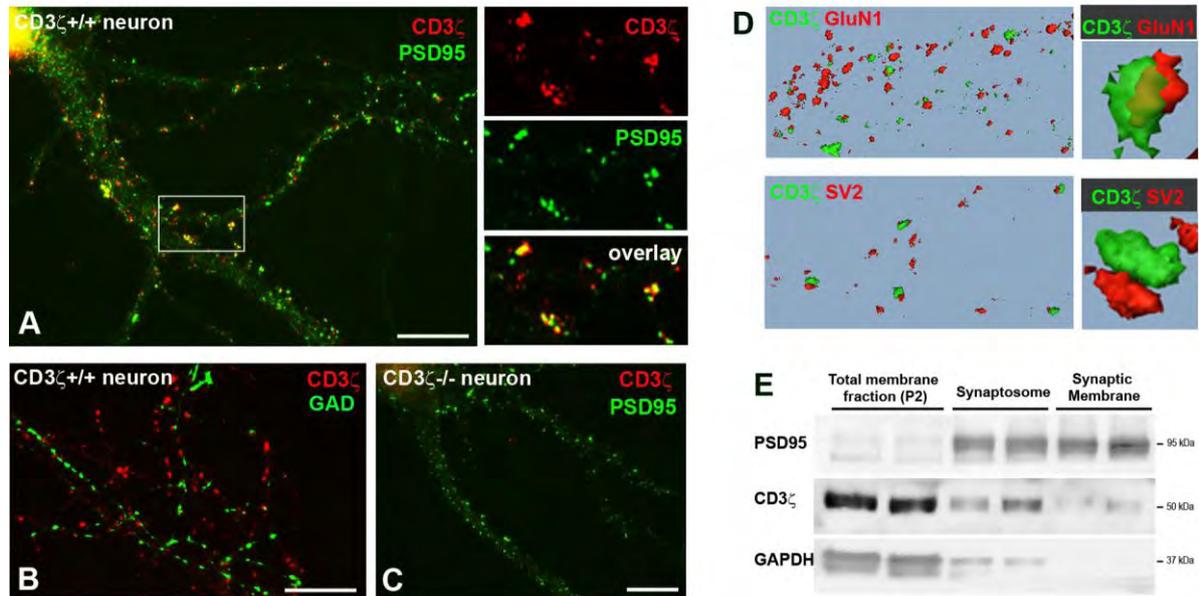


Figure 3

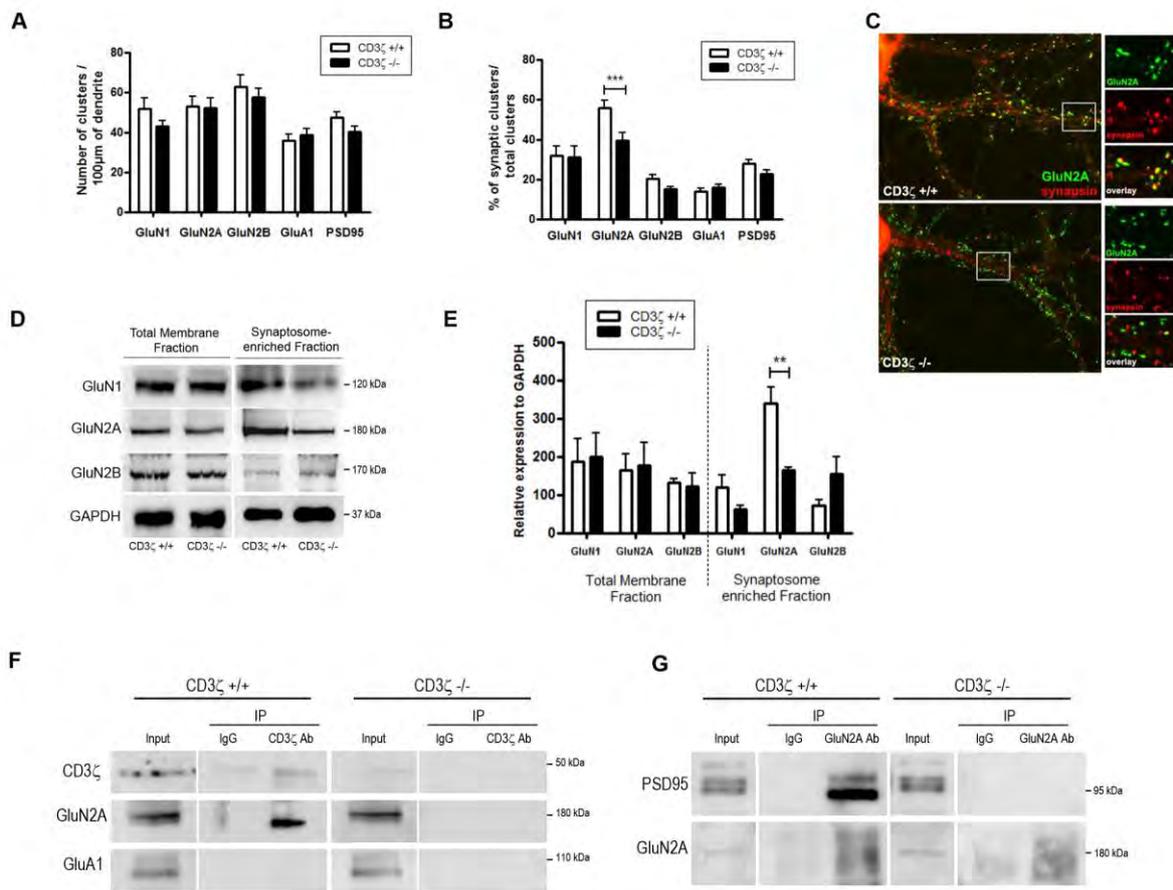


Figure 4

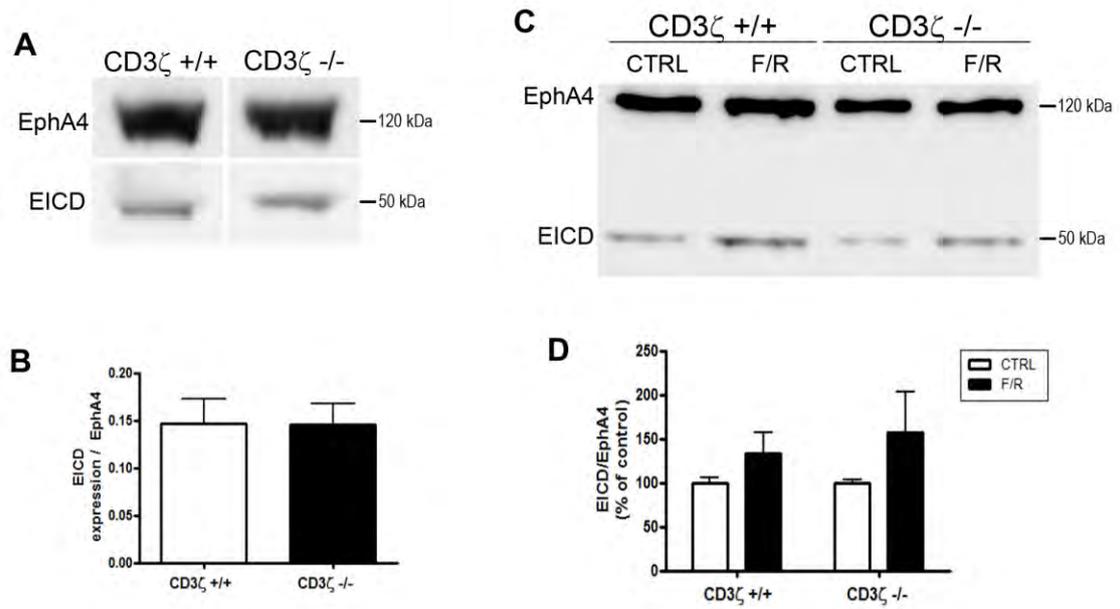


Figure 5

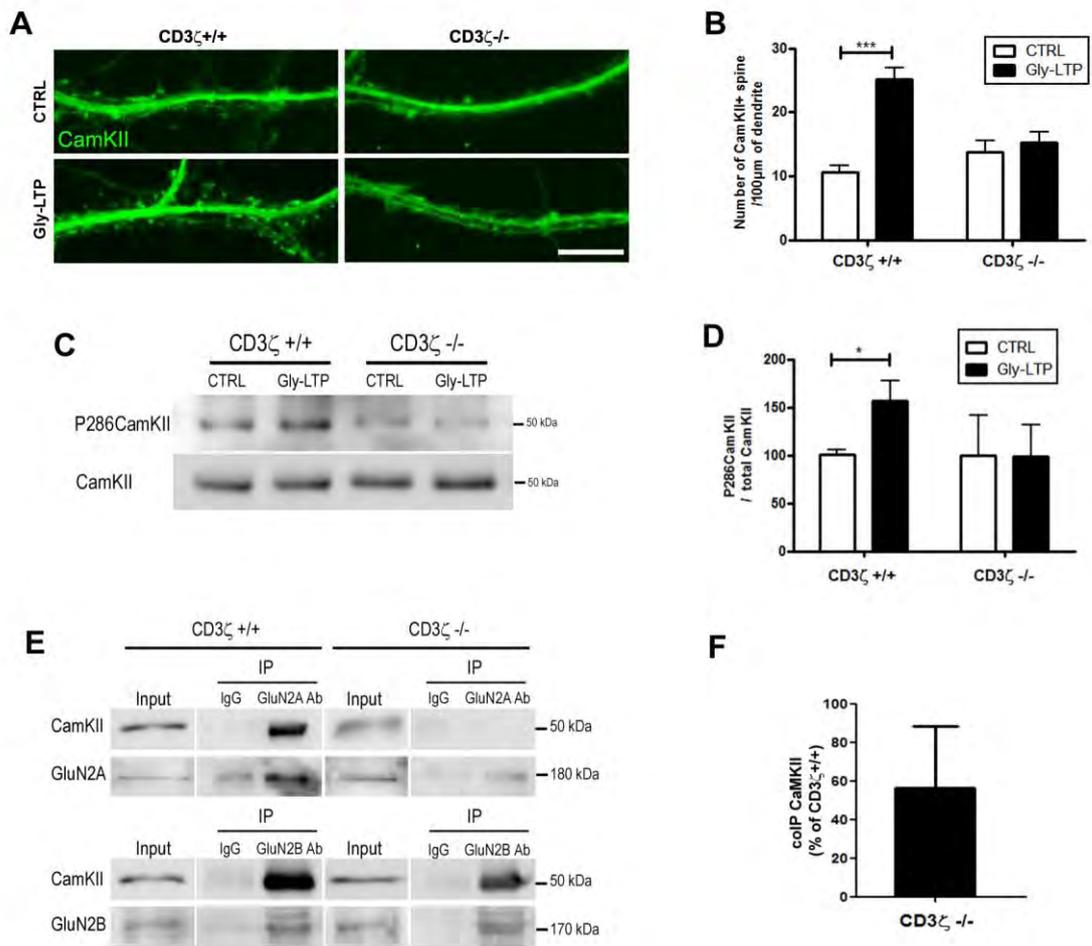


Figure 6

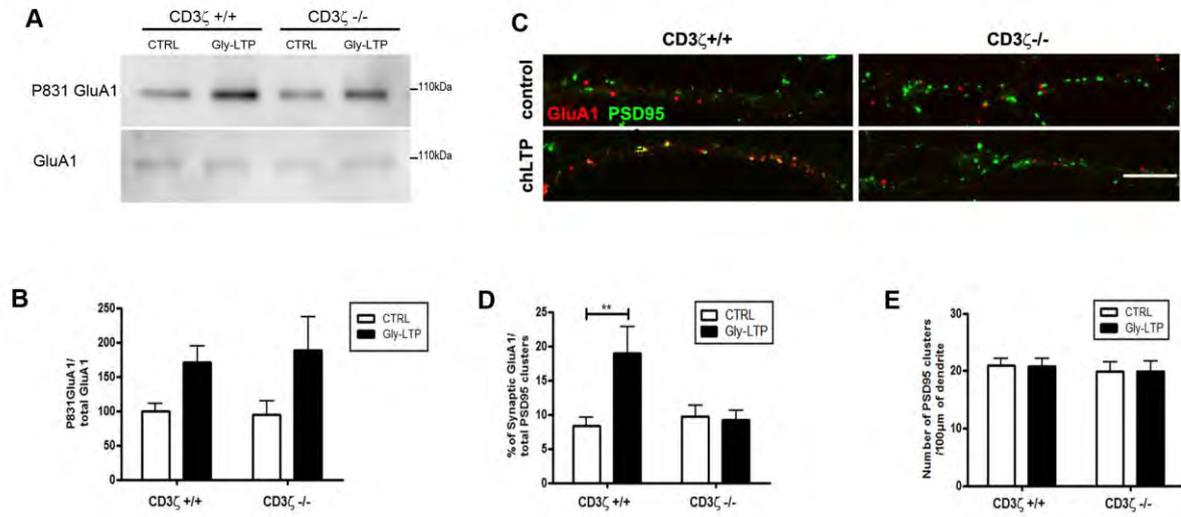


Figure 7

Projet 2 : La voie de co-stimulation CTLA4/CD80-CD86 dans le SNC

Résultats : Action neurotrophique de CTLA4-Ig par activation du récepteur CD86 microglial

Résultats : Action neurotrophique de CTLA4-Ig par activation du récepteur CD86 microglial

INTRODUCTION

Le signal fourni par le TCR n'est pas suffisant pour l'activation complète du lymphocyte T. Un signal de co-stimulation est nécessaire afin de dépasser l'état d'anergie des lymphocytes T et induire leur prolifération et la sécrétion de cytokines (Greenwald et al., 2005). Un grand nombre de voies de co-stimulation a été décrit dans les lymphocytes T mais la voie la plus caractérisée est la voie CD28/CD80-CD86/CTLA4 (Chen and Flies, 2013). La fixation des récepteurs CD80-CD86 exprimés par les CPA sur le CD28, porté par les lymphocytes T, va fournir un signal d'activation à ces derniers alors que la liaison au CTLA4 va inhiber l'activation des lymphocytes T (Chen and Flies, 2013). L'interaction entre CTLA4 et CD80-CD86 résulte en l'inhibition de l'activation des lymphocytes T par deux mécanismes distincts : l'inhibition de la sécrétion d'IL-2 et le blocage de la prolifération dans les lymphocytes T (Olthoff et al., 1997), et l'induction de la molécule immunosuppressive indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) dans la CPA (Grohmann et al., 2002; Mellor and Munn, 2004) (figure 40). Ainsi, la molécule CTLA4-Ig, issue de la fusion entre le CTLA4 et la partie Fc d'une IgG humaine, est une molécule puissante pour réguler la réponse immunitaire puisqu'elle permet de bloquer la voie de costimulation CD28/CD80-CD86/CTLA4 et d'induire la production d'IDO par les CPA (Finger and Bluestone, 2002).

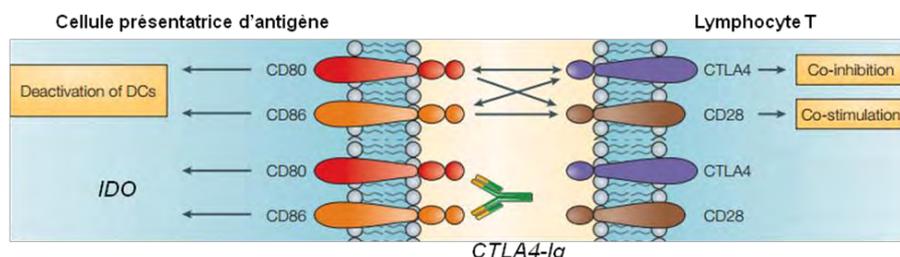


Figure 40 : Mécanismes d'inhibition de l'activation des lymphocytes T par CTLA4-Ig. Lors de l'interaction d'un lymphocyte T avec une CPA, CD28 fournit un signal activateur alors que CTLA4 fournit un signal inhibiteur au lymphocyte T. CTLA4-Ig, en se fixant sur les récepteurs CD80-CD86 bloque l'activation médiée par CD28 et induit l'expression de la molécule immunosuppressive IDO par la CPA. Adapté de Chen, 2004.

Les molécules CD80-CD86 ne sont pas exprimées uniquement par les CPA du système immunitaire mais sont aussi exprimées par les cellules du SNC. En effet, plusieurs études ont montré, dans certaines conditions inflammatoires pathologiques, l'expression de CD80 et CD86, majoritairement par la microglie (Bechmann et al., 2001; Bohatschek et al., 2004; Duncan and Miller, 2011), mais aussi par les astrocytes (Zeinstra et al., 2003), les neurones (Liu et al., 2006a) et les cellules souches neurales (Imitola et al., 2004). Cependant, la fonction de ces récepteurs au sein du SNC et les effets potentiels de leur activation sur les cellules du cerveau restent inconnus.

La modulation de la réponse immunitaire est particulièrement importante dans le cadre de l'utilisation de la xénotransplantation comme thérapie pour les maladies neurodégénératives, notamment pour la maladie de Parkinson. En effet, même si une récupération fonctionnelle a été observée lors de la transplantation de neuroblastes porcins dans un modèle rongeur de la maladie de Parkinson (Galpern et al., 1996; Huffaker et al., 1989), les xénogreffes sont rejetées après 5 à 7 semaines en l'absence de traitement immunosuppresseur (Barker et al., 2000; Melchior et al., 2002). Dans le laboratoire, il a été généré un porc transgénique dont les neurones expriment le CTLA4-Ig humain afin de moduler localement la réponse immunitaire et permettre une immunosuppression locale et non plus systémique (Martin et al., 2005). Dans une étude préclinique actuellement en cours, la greffe intracérébrale de neurones porcins transgéniques exprimant CTLA4-Ig induit une meilleure préservation de la greffe et une amélioration motrice chez des primates modèles de la maladie de Parkinson par rapport aux animaux greffés avec des neurones normaux (Abstract AJT Rabin et al, 2011). Le CTLA4-Ig libéré localement au niveau de la greffe pourrait diminuer la réponse immunitaire et permettre ainsi la survie de la greffe. Cependant, étant donné l'expression cérébrale des molécules cibles de CTLA4-Ig que sont CD80 et CD86, CTLA4-Ig pourrait également agir directement sur les cellules du cerveau, et participer, au moins en partie, aux effets bénéfiques observés chez le primate.

Pour mieux comprendre l'action de CTLA4-Ig au niveau cérébral, nous avons utilisé un modèle de greffe de neurones exprimant CTLA4-Ig dans le cerveau de rat. Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet de l'expression locale de CTLA4-Ig sur les cellules du cerveau, notamment les

neurones et la microglie. Dans un second temps, nous avons caractérisé, *in vitro*, l'effet du CTLA4-Ig sur la morphologie de la microglie et sur l'expression de molécules inflammatoires et neurotrophiques. Ces études nous ont permis de proposer un rôle du CTLA4-Ig sur la microglie et d'émettre des hypothèses quant aux conséquences de l'activation des récepteurs CD86 microgliaux sur les cellules du cerveau.

MATERIELS ET METHODES

Animaux : Les rats SPD et LEWIS 1.A proviennent de la société Janvier. Ils sont maintenus en quarantaine durant une semaine avant leur utilisation, dans une salle à température contrôlée avec un accès libre à l'eau et la nourriture. Les animaux sont maintenus sous un cycle jour-nuit de 12h. Tous les protocoles utilisés sont en accord avec les standards français d'éthiques pour l'utilisation des animaux de laboratoire (Autorisation #CEEA.2012.43).

Grefe intracérébrale : Les neuroblastes porcins sont issus du mésencéphale ventral d'embryons de porc à 28 jours de gestation. Les rats LEWIS 1.A adultes sont anesthésiés puis placés dans un cadre stéréotaxique (Stoelting). Une injection de 4.10^5 cellules est réalisée unilatéralement dans le striatum de rat.

Culture Cellulaire : Les cultures mixtes d'astrocytes/microglies sont préparées à partir de cortex de rats nouveau-nés à P1. Les cortex sont disséqués puis dissociés par un traitement avec de la trypsine et de la DNase. Les cellules sont ensuiteensemencées à une densité de 20.10^3 cellules/cm² dans un milieu DMEM (Gibco 31885-023) contenant 10% de sérum de veau fœtal et 100µg/ml de streptomycine. Pour les analyses immunocytochimiques, les cellules sontensemencées sur des lamelles en verre de 18mm enrobées de poly-L-lysine à 100µg/ml alors que pour les analyses qPCR, les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture de 10cm de diamètre. Le milieu est changé tous les 3 jours. Les cellules sont maintenues en culture pendant 10-12 jours jusqu'à ce que les astrocytes soient à confluence et que le rapport astrocytes/microglies soit de 50/5.

Avant traitement, le CTLA4-Ig, molécule de fusion entre la molécule CTLA4 et le fragment Fc d'une IgG1 humaine, ou le contrôle Fc sont agrégés pendant 30 min avec 5.4µg/ml d'anticorps anti-fragment Fc d'IgG1 humaine. Les cultures mixtes d'astrocytes/microglies sont traitées pendant 24h avec le CTLA4-Ig ou le fragment Fc selon la concentration mentionnée dans les résultats.

Immunomarquage : Les rats greffés avec des neurones porcins WT ou exprimant le CTLA4-Ig sont anesthésiés avec du sodium phénobarbital, 28 jours après la greffe, puis perfusés en

intracardiaque avec une solution de PBS froid contenant 4% de paraformaldéhyde permettant la fixation du cerveau. Les cerveaux sont alors récupérés et conservés à 4°C pendant 7 jours dans la solution de fixation, puis immergés dans des solutions de PBS-Sucrose de concentrations croissantes (15% de sucrose puis 30% de sucrose). Des coupes coronales de 20µm sont réalisées par cryostat et déposées sur des lames de microscopie gélatinées. Afin de visualiser la greffe, les peroxydases endogènes sont inactivées par un traitement de 15 min avec une solution de PBS contenant 0.06% d'H₂O₂ et 50% de méthanol. Les coupes sont ensuite perméabilisées et saturées pendant 40min avec une solution de PBS contenant 10% de sérum d'âne et 0.1% de Triton-X-100. Afin de visualiser les neurones porcins, les coupes sont incubées sur la nuit à 4°C avec un anticorps dirigé contre les neuronfilaments porcins NF70 à 5µg/ml (Clone DP5, Université Paris VII) dilué dans une solution de PBS contenant 2% de sérum d'âne et 0.1% de Triton-X-100. Après lavage, les coupes sont incubées pendant 1h avec un anticorps secondaire biotinylé. Les anticorps fixés sont alors révélés grâce au kit ABC plus DAB Nickel (Vector) puis les lames sont montées avec le milieu de montage Eukitt (Sigma). Pour les marquages immunofluorescents, l'étape d'inactivation des peroxydases endogènes n'est pas réalisée et les coupes sont incubées avec des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome (tableau I) puis les lames sont montées avec le milieu de montage ProLong Gold Antifading (Molecular Probes).

Les cultures mixtes astrocytes/microglies sont fixées pendant 15 minutes à température ambiante dans une solution de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde et 4% de sucrose. Les cellules sont ensuite perméabilisées pendant 5 minutes à température ambiante avec une solution de PBS contenant 0.25% de Triton-X-100, lavées avec du PBS, puis incubées pendant 30 min à 37°C avec une solution de PBS contenant 10% de BSA. Les cellules sont ensuite incubées sur la nuit à température ambiante avec les anticorps primaires dilués dans du PBS contenant 3% de BSA et 0.02% d'azide (Tableau I). Après lavage, les cellules sont incubées pendant 45 min à 37°C avec les anticorps secondaires dilués dans une solution de PBS contenant 3% de BSA et 0.02% d'azide. Les cellules sont ensuite lavées au PBS puis montées entre lame et lamelle grâce au milieu de montage ProLong Gold Antifading avec DAPI (Molecular Probes).

Anticorps Primaires					
Anticorps	Cible	Référence/ Clone	Origine	Concentration initiale	Dilution
Anti-NF70	Neurofilaments 70 kDa	MAB5294	Millipore	5mg/ml	1/1000
Anti-CD80	Récepteur CD80	Clone 3H5	Hybridome	2mg/ml	1/1000
Anti-CD86	Récepteur CD86	Clone 24F	Hybridome	2mg/ml	1/1000
Rabbit anti-Iba 1	Ionized calcium-binding adaptor molecule 1	10904.1.AP	Proteintech	100µg/ml	1/100
Mouse anti-Iba 1	Ionized calcium-binding adaptor molecule 1	MABN92	Millipore	1mg/ml	1/100
Anti-Ox42	Cd11b-c	Clone WT-5	Hybridome	2mg/ml	1/400
Anti-GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein	Z0335	DAKO	1mg/ml	1/500

Anticorps Secondaires					
Anticorps	Cible	Référence/ Clone	Origine	Concentration initiale	Dilution
Anti-IgG (H+L) de lapin biotinylé	IgG de lapin	111-035-003	Jackson ImmunoResearch	0,5mg/ml	1/1000
Anti-IgG (H+L) de souris FITC	IgG de souris	715 095 151	Jackson ImmunoResearch	1,5mg/ml	1/500
Anti-IgG (H+L) de lapin Alexa 568	IgG de lapin	A11011	Molecular Probes	2mg/ml	1/1000

Tableau I : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunomarquages.

Analyse d'images : Les lames ont été analysées avec un microscope Axioskop 2 plus (Zeiss) et les images ont été acquises avec un objectif x40 ou x63 grâce à une caméra digitale (AxioCam HRC, Zeiss) associée au logiciel AxioVision Release. La quantification de la longueur des projections axonales a été réalisée grâce au logiciel ImageJ. Les fibres axonales ont été mesurées à partir du bord de la greffe. Un total de 20-25 fibres a été mesuré à partir de 3-4 animaux différents par groupe. Pour la mesure de l'index de morphologie microgliale, le nombre de prolongements et la longueur des prolongements présentés par la microglie ont été mesurés grâce au logiciel ImageJ. L'index de morphologie microgliale a été obtenu par multiplication du nombre de prolongements par la longueur moyenne des prolongements de la microglie. Un total de 30-40 cellules a été analysé à partir de 3-4

animaux différents par groupe. L'analyse des données a été réalisée avec Excel et l'analyse statistique avec le logiciel GraphPad Prism 5.0. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. La comparaison des groupes a été faite grâce au test t de student. La quantification de la proportion de microglies présentant des morphologies condensées, amiboïdes, uni/bipolaires ou multipolaires a été réalisée en divisant le nombre de cellules présentant la morphologie par le nombre total de microglies. Un total de 20-50 champs a été analysé à partir de 3-5 expériences indépendantes. L'analyse des données a été réalisée avec Excel et l'analyse statistique avec le logiciel GraphPad Prism 5.0. Les données sont représentées en moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été faite grâce aux tests ANOVA à 1 (analyse de variance) ou 2 voies suivis d'un post-test de Bonferroni comme indiqué.

Analyse qPCR : Après traitement avec le contrôle Fc ou le CTLA4-Ig pendant 24h, les cultures mixtes sont incubées pendant 4h à 37°C sous rotation à 250rpm afin de permettre la séparation des microglies (surnageant) et des astrocytes (adhérentes). Après centrifugation du surnageant, le culot de microglies est resuspendu dans 1ml de Trizol et incubé pendant 5 min à RT. Les ARN totaux sont alors récupérés par extraction au chloroforme suivi d'une précipitation à l'isopropanol. Après centrifugation et lavage à l'éthanol, les ARN sont resuspendus dans de l'eau. Après un traitement avec la Turbo DNase, 2 μ g d'ARN est rétro-transcrit avec le système de reverse-transcription MMLV (Invitrogen). La PCR quantitative en temps réelle est réalisée à partir de l'ADNc rétro-transcrit en utilisant le système de détection StepOnePlus (Life Technologies) et le master mix Power Sybr Green (Applied Biosystems). Les oligonucléotides utilisés sont présentés dans le tableau II. L'HPRT a été utilisé comme gène contrôle pour normaliser les variations de la quantité d'ADNc mise en réaction. L'expression relative a été calculée en utilisant la méthode 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak et al, 2001). Un total de 4-5 expériences indépendantes a été réalisé pour cette étude. L'analyse des résultats a été effectuée avec Excel et l'analyse statistique avec le logiciel GraphPad Prism 5.0. Les données sont présentées en moyennes \pm SEM. La comparaison des groupes a été faite grâce au test de Kruskal-Wallis.

Nom	Séquence	
CD86	<i>For</i>	5'-ACA GCA AAA GAC ACC CAC GG-3'
	<i>Rev</i>	5'-CTT GTT TCA TTC TGA GCC TCC TC-3'
CD80	<i>For</i>	5'-GGC ATT GCT GTC CTG TGA TTA C-3'
	<i>Rev</i>	5'-GGA GTA GTT GTT AGC GAT GTC GTA-3'
TNFα	<i>For</i>	5'-CTT ATC TAC TCC CAG GTT CTC TTC AA-3'
	<i>Rev</i>	5'-GAG ACT CCT CCC AGG TAC ATG G-3'
IL-1β	<i>For</i>	5'-AGT CAC TCG CAT GGC ATG TG-3'
	<i>Rev</i>	5'-ATA TGT CGG GCT GGT TCC AC-3'
CD16	<i>For</i>	5'-GTG AAC CTA GAC CCT GAA TGG G-3'
	<i>Rev</i>	5'-CAC TGT CCT TAA CTC TGG CAC T-3'
CD32	<i>For</i>	5'-TGC TCT CAC GGA CTT TGT ACC-3'
	<i>Rev</i>	5'-GGA GTA GCA GCC AGT CAG AAA T-3'
iNOS	<i>For</i>	5'-GAC CAA ACT GTG TGC CTG GA-3'
	<i>Rev</i>	5'-TAC TCT GAG GGC TGA CAC AAG G-3'
Arginase1	<i>For</i>	5'-TGA ACC AAC TCT TGG GAA G-3'
	<i>Rev</i>	5'-GTG ATG CCC CAG ATG ACT TT-3'
CD14	<i>For</i>	5'-CAA CAG GCT GGA TAG GAA ACC T-3'
	<i>Rev</i>	5'-TGA CTA CGC CAG AGT TAT ACG C-3'
CD23	<i>For</i>	5'-TCC TTC TAT GGC ACT GGG AAA C-3'
	<i>Rev</i>	5'-TTG TGA CAT CTG AAG AGC CTG G-3'
TGFβ	<i>For</i>	5'-CTC AAC ACC TGC ACA GCT CC-3'
	<i>Rev</i>	5'-ACG ATC ATG TTG GAC AAC TGC T-3'
BDNF	<i>For</i>	5'-GCC CAA GCA AGA AAA CCA TAA-3'
	<i>Rev</i>	5'-GTT GTG GTT TGT TGC CGT TGC CAA GAA-3'
GDNF	<i>For</i>	5'-GCC GCC GAA GAC GAC TCC CTC-3'
	<i>Rev</i>	5'-GTG CCG CCG CTT GTT TAT CTG-3'
NGF	<i>For</i>	5'-CTC ATC CAC CCA CCC AGT CT-3'
	<i>Rev</i>	5'-AGC CTG TTT GTC GTC TGT TGT C-3'

Tableau II : Séquences des oligonucléotides.

RESULTATS

A- Caractérisation de l'effet *in vivo* de l'expression de CTLA4-Ig

A-1 Action bénéfique de CTLA4-Ig sur la pousse axonale

Un porc transgénique exprimant la molécule CTLA4-Ig par les neurones a été généré par le laboratoire dans le but de réaliser des greffes intracérébrales pour le traitement de maladies neurodégénératives (Martin et al., 2005). Ces animaux transgéniques ont été utilisés pour des transplantations intracérébrales chez le rat et le primate (Martin et al 2005, Abstract AJT Rabin et al 2011). Les résultats de l'étude pré-clinique actuellement en cours ont mis en évidence que l'expression de CTLA4-Ig par les neurones greffés induisait une meilleure préservation de la greffe et une amélioration de l'activité motrice chez des primates traités au MPTP (modèle de la maladie de Parkinson) par rapport aux animaux greffés avec des neurones WT (Abstract AJT Rabin et al, 2011). Afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets observés *in vivo*, nous avons analysé chez le rat les greffes de neurones porcins WT et exprimant le CTLA4-Ig. L'analyse a été conduite 28 jours après la greffe. A ce stade, les précurseurs neuronaux se sont différenciés en neurones et aucun signe de rejet n'est présent dans le cerveau (Michel et al., 2006; Michel-Monigadon et al., 2010). Les neurones porcins ont été visualisés par immunohistochimie avec un anticorps reconnaissant de manière spécifique les neurofilaments porcins NF70 (neurofilament 70kDa). Alors que la pénétration, dans le parenchyme cérébral, des axones des neurones WT apparaît minimale, les axones des neurones exprimant le CTLA4-Ig présentent des projections plus longues dans le parenchyme cérébral entourant la greffe (Figure 1 ; longueur des prolongements axonaux hors de la greffe : $331.4 \pm 87.88 \mu\text{m}$ pour les neurones WT (n=21) ; $568.4 \pm 87.77 \mu\text{m}$ pour les neurones exprimant le CTLA4-Ig (n=25) ; *p=0.0367 ; Test t de Student). Ces résultats suggèrent que le CTLA4-Ig, sécrété localement par les neurones, favorise la pousse axonale *in vivo*.

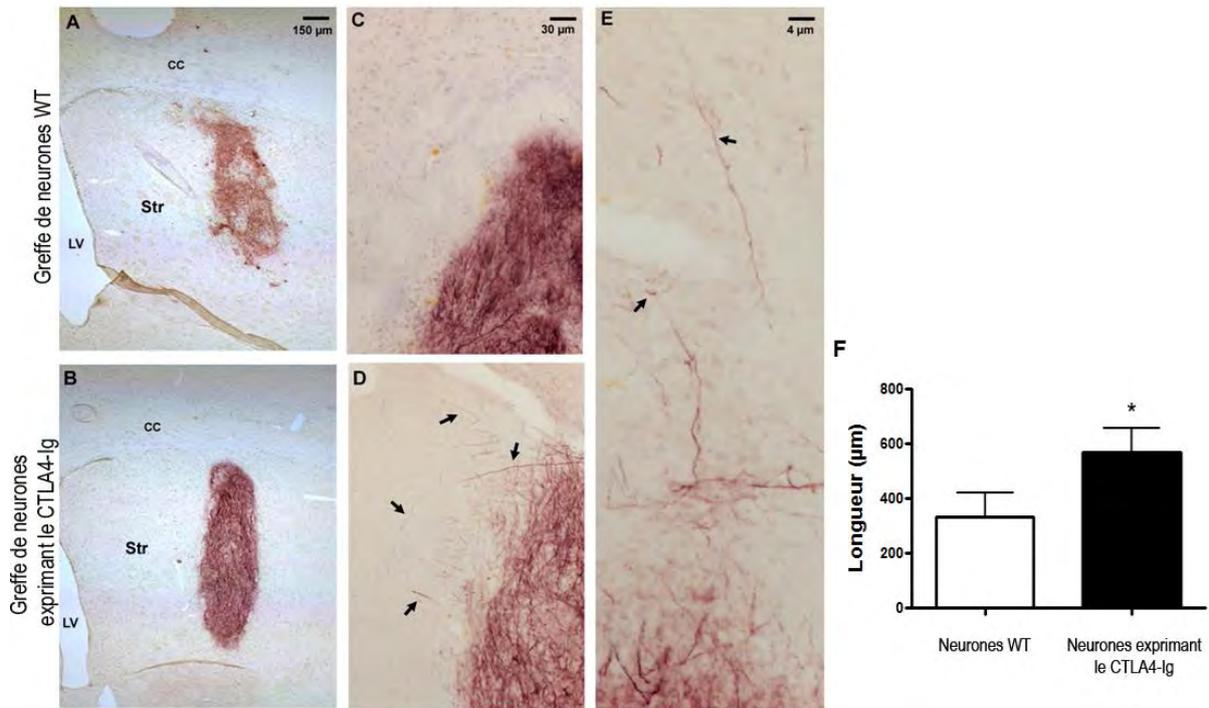


Figure 1 : Elongation axonale des neurones porcins greffés dans le striatum de rat. Les cerveaux de rats greffés avec des neurones WT (A-C) ou des neurones exprimant le CTLA4-Ig (B-D-E) ont été prélevés 28 jours après la greffe et les axones ont été marqués avec l'anticorps NF70 dirigé contre les neurofilaments porcins. (F) Quantification de la longueur des prolongements axonaux en dehors de la zone de greffe. Les données représentent les longueurs moyennes des axones \pm SEM mesurées à partir du bord de la greffe (neurones WT $n=21$; neurones exprimant le CTLA4-Ig $n=25$; $*p=0.0367$; Test t de Student).

A-2 Expression de récepteurs au CTLA4-Ig dans le cerveau de rat greffé

La molécule de fusion CTLA4-Ig est un ligand des récepteurs de co-stimulation CD80 et CD86 (Poirier et al., 2011). Dans le SNC, CD80 et CD86 sont principalement exprimés par la microglie (Bechmann et al., 2001; Bohatschek et al., 2004), mais ont aussi été décrits sur les astrocytes (Zeinstra et al., 2003), les neurones (Liu et al., 2006b) et les cellules souches neurales (Imitola et al., 2004) selon les modèles expérimentaux. Afin d'identifier l'expression et la localisation de CD80 et CD86 dans le modèle de greffe intracérébrale chez le rat, les coupes de cerveaux provenant de rats greffés avec des neurones WT ou exprimant CTLA4-Ig ont été marquées par immunohistochimie avec des anticorps contre CD80 et CD86. Dans nos conditions, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression de CD80 dans le cerveau des rats greffés suggérant que l'expression de CD80 n'est pas induite dans notre modèle. L'anticorps anti-CD86 a produit un marquage restreint au site de greffe. Des doubles marquages pour CD86 avec un marqueur microglial (ionized calcium-binding adapter

molécule Iba1) ou astrocytaire (glial fibrillary acidic protein ou GFAP) ont été réalisés. Le marquage de la molécule CD86 est uniquement observé au niveau des cellules microgliales localisées dans la greffe et dans sa périphérie proche (Figure 2 A-B). Les microglies plus éloignées du site de greffe ou situées du côté contralatéral au site de greffe ne présentent pas de marquage pour CD86 (Figure 2 C). Les astrocytes ne semblent pas présenter de marquage pour CD86, même au niveau de la greffe (Figure 2 D). De plus, il ne semble pas y avoir de différences dans la localisation et l'intensité du marquage entre les greffes réalisées avec des neurones WT et celles réalisées avec des neurones exprimant CTLA4-Ig (Figure 2 A). Ces résultats suggèrent que la microglie est le type cellulaire principalement ciblé par CTLA4-Ig dans le cerveau.

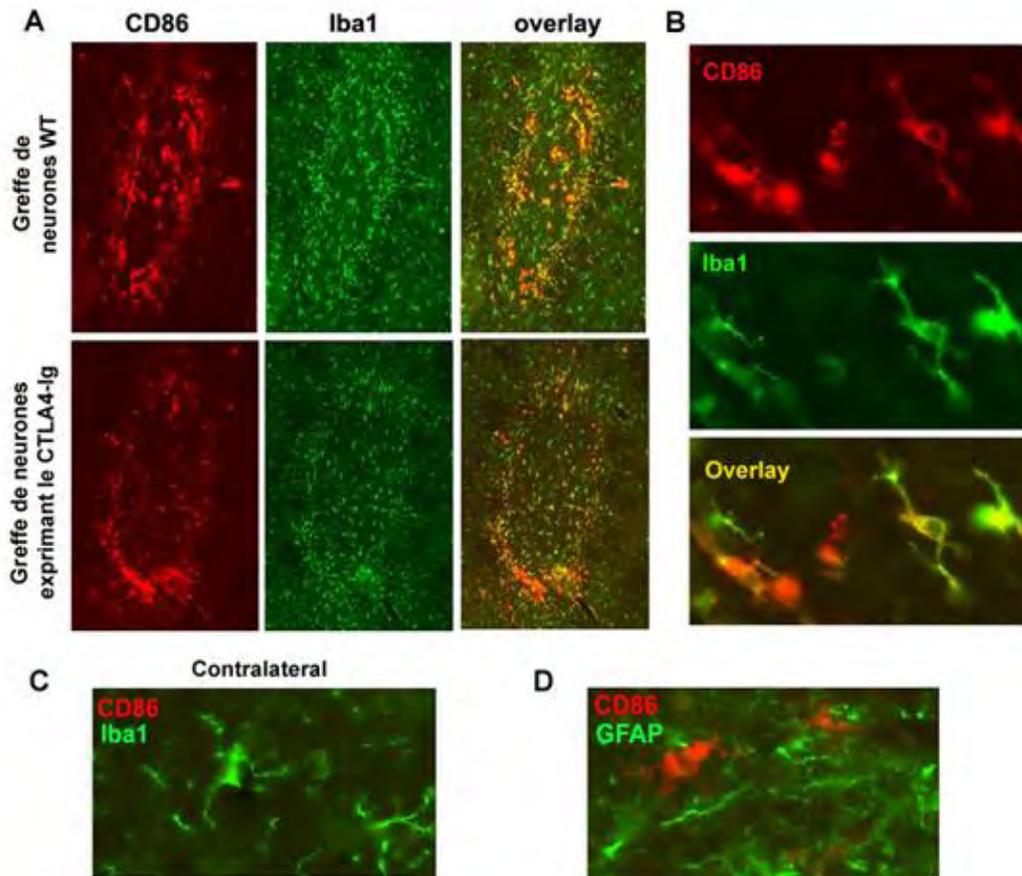


Figure 2: Expression microgliale de CD86 au niveau de la greffe. Des doubles marquages de CD86 et du marqueur microgliale Iba1 (A-B-C) ou du marqueur astrocytaire GFAP (D) ont été réalisés sur des coupes de cerveaux de rats greffés avec des neurones WT ou exprimant CTLA4-Ig. Le marquage CD86 est localisé au niveau des microglies (A-B) situées dans la greffe et sa proche périphérie (A). CD86 n'est pas détecté sur les microglies en contralatéral de la greffe (C). Les astrocytes sont dépourvus de marquage CD86, même au niveau de la greffe (D).

A-3 Effet du CTLA4-Ig sur la morphologie microgliale

Nous avons étudié l'impact de CTLA4-Ig sur la morphologie de la microglie. En effet, la morphologie de la microglie varie en fonction de son état d'activation, et représente un facteur important illustrant la fonction de la microglie (Jonas et al., 2012; Kettenmann et al., 2011; Vinet et al., 2012) (Figure 3 A). Grâce aux marquages immunohistochimiques des microglies par le marqueur Iba1 sur les coupes de cerveaux de rats greffés, nous avons pu constater que la morphologie de la microglie variait suivant les animaux. La microglie varie d'une morphologie compacte avec peu de prolongements, généralement assez courts, jusqu'à une morphologie ramifiée présentant de longs prolongements (Figure 3 B). Afin de quantifier la morphologie de la microglie en prenant en compte le nombre et la longueur des prolongements, nous avons calculé un index de morphologie microgliale correspondant au nombre de prolongements multiplié par la longueur des prolongements. Avec ce calcul, il apparaît que l'index de morphologie microgliale est augmenté lors d'une greffe avec des neurones exprimant CTLA4-Ig en comparaison avec la greffe de neurones WT (Figure 3 C ; index de morphologie microgliale : 29.51 ± 3.063 pour la greffe de neurones WT (n=28) ; 55.05 ± 3.794 pour la greffe de neurones exprimant CTLA4-Ig (n=40) ; ***p<0.001 ; Test t de Student). Ces résultats suggèrent que CTLA4-Ig induit des modifications de la morphologie microgliale.

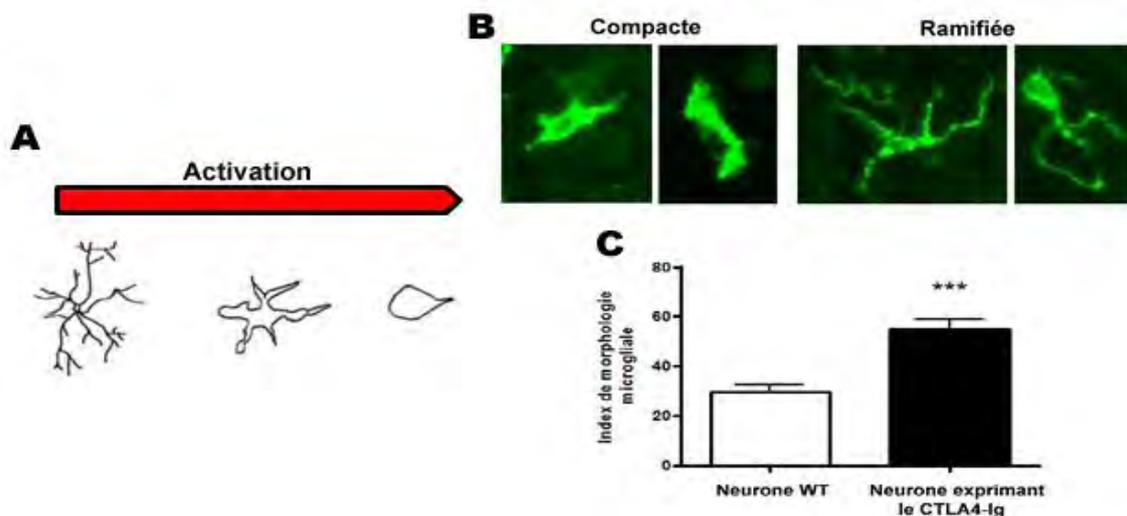


Figure 3 : Morphologie des microglies au niveau de la greffe de neurones porcins dans le striatum de rat. (A) Schéma représentatif de la morphologie de la microglie en fonction de l'activation dans un contexte de transection de nerf optique (adapté de Jonas et al., 2012). (B) Représentation des deux types majeurs de

morphologie identifiés grâce au marqueur *Iba1*. (C) Quantification de l'index de morphologie microgliale (correspondant au produit du nombre de prolongements et de la longueur des prolongements microgliaux) obtenu dans les greffes de neurones WT et de neurones exprimant CTLA4-Ig. Les données représentent les moyennes \pm SEM. (WT : $n=28$; CTLA4-Ig : $n=40$; *** $p<0.001$; Test *t* de Student).

De plus, nous avons mis en évidence qu'il existait une corrélation entre l'index de morphologie microgliale et la longueur des prolongements axonaux (Figure 4). En effet, plus la microglie présente une morphologie ramifiée, correspondant à un index de morphologie élevé, plus la longueur des axones des neurones greffés est élevée. Ces résultats indiquent que les modifications de la morphologie microgliale induites par CTLA4-Ig sont corrélées à la longueur des axones.

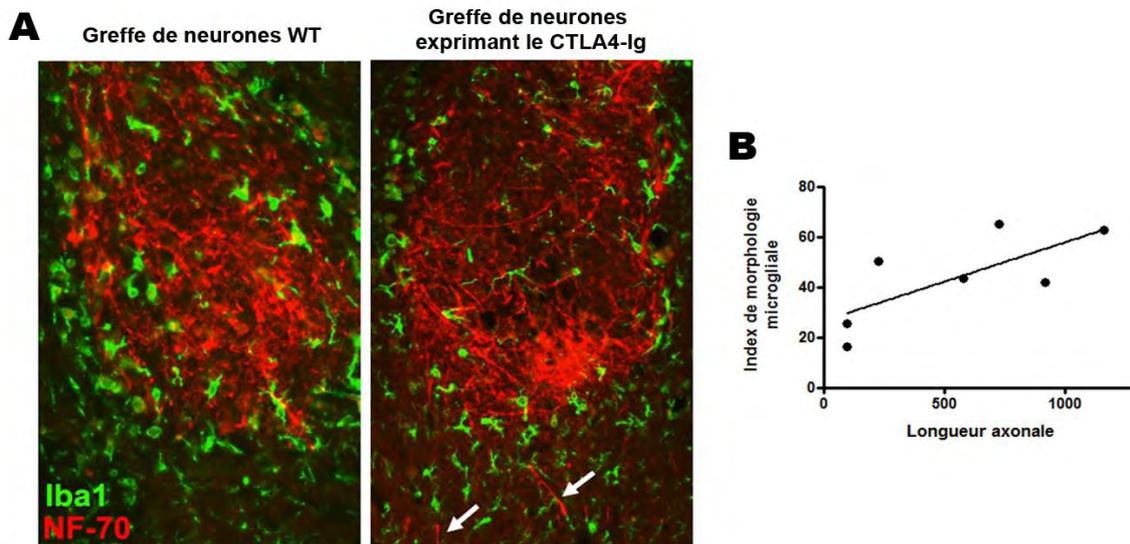


Figure 4 : Corrélation entre les modifications morphologiques et l'élongation axonale dans le striatum de rats greffés avec des neurones porcins. (A) Marquage immunofluorescent des microglies (marqueur *Iba1* vert) et des neurones greffés (marqueur NF70 rouge) au niveau de la greffe de neurones WT ou exprimant CTLA4-Ig. Les flèches indiquent les prolongements axonaux projetant en dehors de la greffe entourés de microglie de morphologie ramifiée. (B) Corrélation entre la longueur des prolongements axonaux projetant en dehors de la greffe et l'index de morphologie microgliale. ($n=7$ animaux ; régression linéaire $R^2=0.5339$)

B- Etude *in vitro* de l'effet du CTLA4-Ig sur la microglie

B-1 Expression des récepteurs de CTLA4-Ig par la microglie *in vitro*

Afin de caractériser plus précisément les effets du CTLA4-Ig sur la microglie, nous avons réalisé des cultures mixtes d'astrocytes et de microglies à partir de cortex de rats nouveau-nés traitées directement avec du CTLA4-Ig murin ou son contrôle Fc (correspondant au fragment Fc de l'IgG humaine du CTLA4-Ig). Les cellules ont été maintenues en culture pendant 10-12 jours afin d'atteindre la confluence des astrocytes et un ratio astrocytes : microglies de 50 : 5. Tout d'abord, nous

avons examiné l'expression des récepteurs CD80 et CD86 par PCR quantitative (qPCR) et immunocytochimie. L'analyse qPCR sur les microglies isolées, après décollement par agitation, montre que la microglie exprime à la fois CD80 et CD86 dans nos conditions de culture (Figure 5 A). L'analyse du marquage immunocytochimique sur les cultures mixtes astrocytes/microglies montre une expression exclusivement microgliale de CD80 et CD86. Cependant, le marquage CD80 est d'intensité plus faible et apparaît plus restreint que le marquage CD86 (Figure 5 B), suggérant que l'expression de CD86 serait majoritaire comparée à celle de CD80. Nos résultats montrent donc que les récepteurs CD86 et CD80 sont exprimés par la microglie *in vitro*.

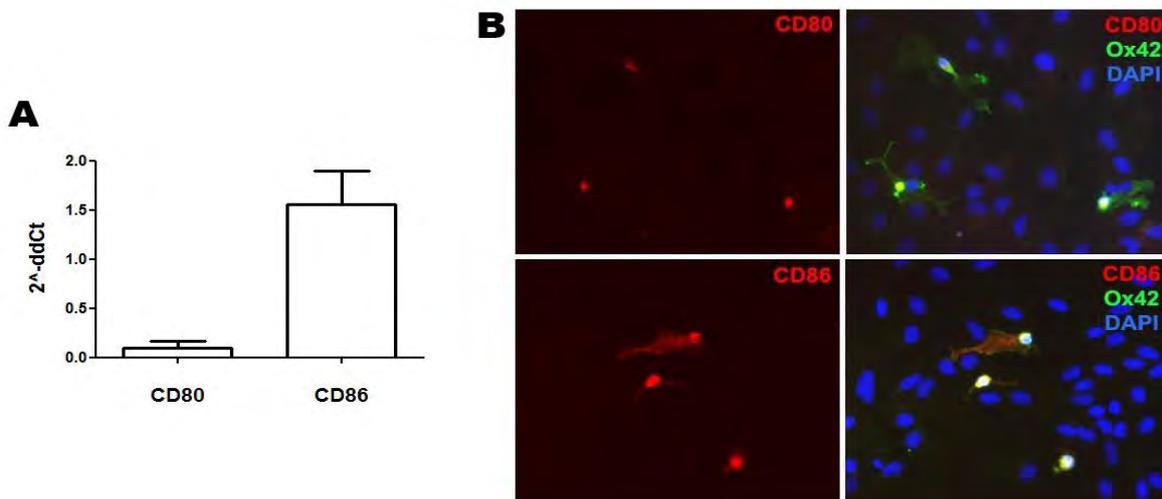


Figure 5: Expression microgliale des récepteurs CD80 et CD86 *in vitro*. (A) Quantification de l'expression relative de l'ARNm de CD80 et CD86 sur des microglies isolées d'une culture mixte. Les données représentent les moyennes \pm SEM ($n=5$ expériences indépendantes). (B) Double marquage CD80-CD86 (rouge) avec le marqueur microglial Ox42 (vert) sur des cultures mixtes astrocytes/microglies.

B-2 Effet de l'activation des récepteurs CD80-CD86 microgliaux par CTLA4-Ig sur la morphologie microgliale

Après avoir caractérisé l'expression des récepteurs de CTLA4-Ig sur la microglie dans notre modèle de culture, nous avons analysé l'effet du CTLA4-Ig sur la morphologie microgliale. Nous avons observé qu'un traitement pendant 24h avec 2 μ g/ml de CTLA4-Ig induisait des modifications majeures de la morphologie microgliale. Afin de quantifier cet effet, nous avons classé la morphologie des microglies en 4 catégories suivant des critères préalablement publiés dans d'autres études (Jonas et

al., 2012; Kettenmann et al., 2011; Szabo and Gulya, 2013). (i) La morphologie condensée correspond à une microglie de petite taille, ronde et ne présentant aucun prolongement. Cette morphologie correspondrait à un état activé de la microglie. (ii) La morphologie amiboïde se rapporte à des microglies de grandes tailles avec un large cytoplasme. Elles sont de formes irrégulières et ne présentent pas de prolongements bien définis. Cet état de la microglie est associé à une activation plus importante de la microglie que l'état condensé, à la sécrétion de molécules inflammatoires et à une activité phagocytaire (Kettenmann et al., 2011; Otani et al., 2011; Szabo and Gulya, 2013). Enfin, la dernière morphologie correspond aux microglies ramifiées avec (iii) un à deux prolongements (uni/bipolaires) ou (iiii) plus de deux prolongements (multipolaires). Cette morphologie microgliale semble apparentée à un phénotype plus anti-inflammatoire ou à un état dé-activé de la microglie (Figure 6 A). Après 24h de traitement des cultures mixtes d'astrocytes et microglies par 2µg/ml de la molécule contrôle Fc ou de CTLA4-Ig, les cellules ont été fixées et la morphologie microgliale a été analysée après immunomarquage avec un anticorps contre la protéine microgliale Iba1. La proportion de chacune des catégories de morphologie a alors été quantifiée. Les traitements Fc et CTLA4-Ig induisent de manière similaire une augmentation de la proportion de microglies amiboïdes (Figure 6 B ; % de microglies amiboïdes : sans traitement= 20.9±2.6% ; Fc=42.42±5.7% ; CTLA4-Ig=39.31±4.2% ; n=28-30 ; **p<0.01 ; ***p<0.001 ; ANOVA 2 voies avec post-test de Bonferroni). L'induction de ces effets à la fois par le traitement contrôle Fc et le traitement CTLA-Ig suggère qu'ils sont induits par la partie Fc, commune aux deux traitements. Cependant, par rapport au traitement Fc, CTLA4-Ig induit une augmentation de la proportion de microglies multipolaires (Figure 6 B ; % de microglies multipolaires : Fc=7.18±2.9% ; CTLA4-Ig=26.5±4.0% ; n=28-30 ; **p<0.01 ; ANOVA 2 voies avec post-test de Bonferroni). Nos résultats *in vitro* semblent indiquer que CTLA4-Ig induit une modification morphologique de la microglie vers un profil ramifié.

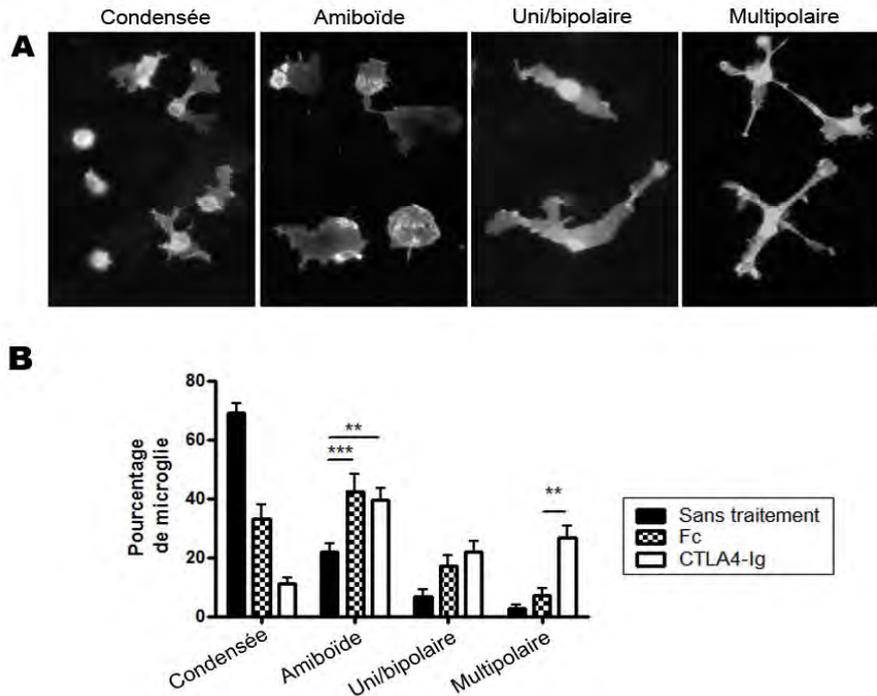


Figure 6 : Modifications morphologiques de la microglie induite par CTLA4-Ig. (A) Représentation des quatre catégories de morphologie observées dans notre modèle de culture mixte astrocytes/microglies après marquage avec un anticorps anti-Iba1. (B) Quantification de la proportion de microglies présentant une morphologie condensée, amiboïde, uni/bipolaire ou multipolaire en fonction du traitement avec le contrôle Fc ou CTLA4-Ig. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM (n=28-30 à partir de 3 expériences indépendantes ; **p<0.01 ; ***p<0.001 ; ANOVA 2 voies avec post-test de Bonferroni)

Etant donné que les récepteurs CD80 et CD86 ont tous deux été détectés sur la microglie en culture, nous avons recherché si ces deux récepteurs étaient impliqués dans les changements morphologiques induits par CTLA4-Ig. Pour cela, nous avons utilisé des anticorps bloquants spécifiques de CD80 et CD86. Les cultures mixtes astrocytes/microglies ont été traitées par la molécule contrôle Fc ou CTLA4-Ig en présence de l'anticorps 3H5, bloquant CD80, ou de l'anticorps 24F, bloquant CD86 (Maeda et al, 1997) et la proportion de microglies multipolaires a été quantifiée. Alors que l'ajout d'un anticorps contrôle (IgG1) ou de l'anticorps 3H5 préserve l'effet de CTLA4-Ig sur la morphologie multipolaire de la microglie (% de microglies multipolaires : Fc=5.64 \pm 1.80% ; CTLA4-Ig=16.86 \pm 2.98% **p<0.01 ; CTLA4-Ig+IgG1=16.26 \pm 3.40% *p<0.05 ; CTLA4-Ig+3H5=15.58 \pm 1.85% *p<0.05 ; n=20-28 ; Analyse de variance avec post-test de Bonferroni), l'addition de l'anticorps 24F, bloquant CD86, inhibe l'action de CTLA4-Ig (% de microglies

multipolaires : $Fc=5.64\pm 1.80\%$; $CTLA4-Ig+24F=10.77\pm 1.71\%$; $n=20-28$; $p>0.05$). Les expériences contrôles réalisées sur les cellules traitées seulement avec les anticorps IgG1, 3H5 ou 24F ne montrent aucun effet significatif par rapport aux cellules traitées avec le fragment Fc (% de microglies multipolaires : $Fc=5.64\pm 1.80\%$; $3H5=8.77\pm 2.12\%$; $24F=7.26\pm 2.05\%$; $IgG1=5.51\pm 2.02\%$; $n=20-28$; $p>0.05$). Nos résultats semblent indiquer que la modification de morphologie induite par CTLA4-Ig soit médiée par CD86.

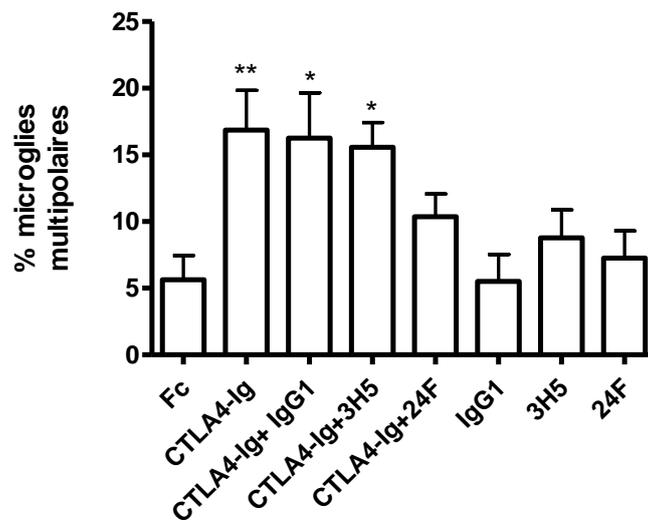


Figure 6 : Médiation de l'effet de CTLA-Ig par les récepteurs CD86. Quantification de la proportion de microglies multipolaires parmi des microglies traitées par CTLA4-Ig associé ou non avec un anticorps bloquant CD80 ou CD86 ou un anticorps contrôle IgG1. Les données sont représentées en moyennes \pm SEM ($n=20-28$ à partir de 3 expériences indépendantes ; $**p<0.01$; $*p<0.05$; Analyse de variance avec post-test de Bonferroni).

Afin de caractériser les effets de CTLA4-Ig sur la morphologie microgliale, des expériences de dose-réponse et de cinétique ont été réalisées. Les cultures astrocytes/microglies ont été traitées avec des concentrations croissantes de 0.2 à 5 μ g/ml de la molécule contrôle Fc et de CTLA4-Ig, et la proportion de microglies multipolaires a été quantifiée après 24h de traitement. Nous avons observé que seuls les traitements avec 2 et 5 μ g/ml de CTLA4-Ig étaient capables d'induire une augmentation significative de la proportion de microglies multipolaires en comparaison avec le traitement Fc (Figure 7 ; % de microglies multipolaires : Fc à 2 μ g/ml=10.45 \pm 1.85% ; CTLA4-Ig à 2 μ g/ml=22.88 \pm 2.76% ; $n=20-50$; $***p<0.001$; Fc à 5 μ g/ml=13.44 \pm 2.77% ; CTLA4-Ig à 5 μ g/ml=31.42 \pm 3.98% ; $n=20-50$;

**p<0.01 ; ANOVA 2 voies avec post-test de Bonferroni). De plus, la proportion de microglies multipolaires semble augmenter avec des concentrations croissantes de CTLA4-Ig (Figure 7). La concentration de 5µg/ml de CTLA4Ig produisant l'effet le plus important sur la morphologie microgliale, cette concentration a été choisie pour le reste de l'étude.

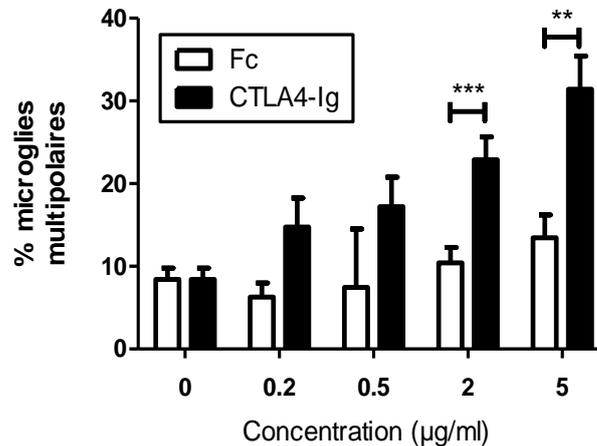


Figure 7 : Effet dose-réponse du CTLA4-Ig. Quantification du pourcentage de microglies multipolaires en fonction de la concentration du contrôle Fc et du CTLA4-Ig. Les données sont représentées en moyennes ± SEM (n=20-50 à partir de 3 à 5 expériences indépendantes ; **p<0.01 ; ***p<0.001 ; ANOVA 2 voies avec post-test de Bonferroni).

La cinétique d'action du CTLA4-Ig à 5µg/ml sur la morphologie microgliale a été étudiée en analysant la proportion de microglies multipolaires après 6h, 12h, 24h et 48h de traitement. L'analyse montre que CTLA4-Ig induit une augmentation significative de la proportion de microglies multipolaires uniquement après 24h de traitement (Figure 8 : % de microglies multipolaires à 24h : Fc= 10.045±1.92% ; CTLA4-Ig=17.7±2.60% ; n=30 ; ***p<0.001 ; ANOVA 2 voies avec post-test de Bonferroni).

Ainsi, nous avons mis en évidence que CTLA4-Ig induit des modifications de la morphologie microgliale dépendantes de la concentration et du temps de traitement. De ces expériences, les conditions de traitement choisies pour la suite de l'étude sont une concentration de 5 µg/ml durant 24h.

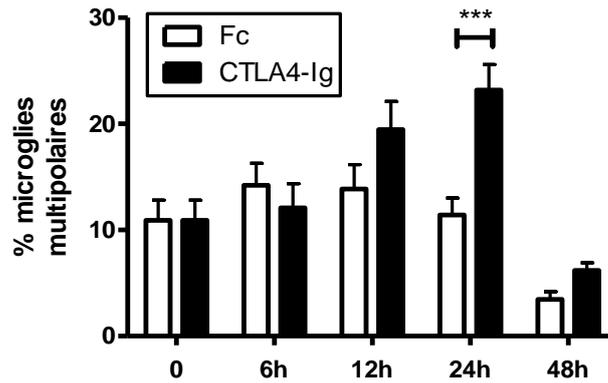


Figure 8 : Cinétique d'action de CTLA4-Ig. Quantification de la proportion de microglies multipolaires en fonction du temps de traitement avec le contrôle Fc et CTLA4-Ig. Les données sont représentées en moyennes \pm SEM ($n=30$ à partir de 3 expériences indépendantes ; *** $p<0.001$; ANOVA 2 voies avec post-test de Bonferroni).

B-3 Effet du CTLA4-Ig sur le profil inflammatoire de la microglie

Plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'une corrélation entre la morphologie de la microglie et son état d'activation (Jonas et al., 2012). De plus, des études récentes suggèrent que la microglie, de manière analogue à ce qui a été décrit pour les macrophages, pourrait adopter un profil pro-inflammatoire (M1) ou anti-inflammatoire (M2) suivant les stimuli qu'elle reçoit (Kigerl et al., 2009; Michelucci et al., 2009; Mosser and Edwards, 2008). Afin d'étudier l'action du CTLA4-Ig sur le profil inflammatoire de la microglie, des analyses par qPCR de l'expression de molécules pro-inflammatoires ou associées avec un profil M1 (CD16/CD32/IL-1 β /iNOS et TNF α) et de molécules anti-inflammatoires ou associées avec un profil M2 (arginase 1/CD14/CD23 et TGF β) ont été réalisées. Après 24h de traitement de cultures mixtes astrocytes/microglies avec 5 μ g/ml du fragment Fc ou du CTLA4-Ig, les microglies ont été isolées par décollement et l'expression relative de la quantité d'ARNm des molécules citées ci-dessus a été quantifiée par qPCR. Dans nos conditions, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'expression par la microglie d'iNOS ou du CD23. En comparaison avec le traitement contrôle Fc, le CTLA4-Ig ne semble pas induire de modification d'expression de l'ARNm pour les molécules CD16, CD32, IL-1 β , TNF α , CD14 et TGF β (Figure 9). Par contre, le traitement CTLA4-Ig induit une augmentation significative de l'ARNm pour l'arginase 1 en comparaison avec le contrôle Fc (Figure 9 ; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de l'arginase 1 : Fc=0.02004 \pm 0.02004 ; CTLA4-

Ig=0.7032±0.1287 ; n=4 ; *p<0.05 ; test de Kruskal-Wallis). Nos résultats semblent indiquer que CTLA4-Ig induit l'expression de l'ARNm de la molécule anti-inflammatoire arginase 1.

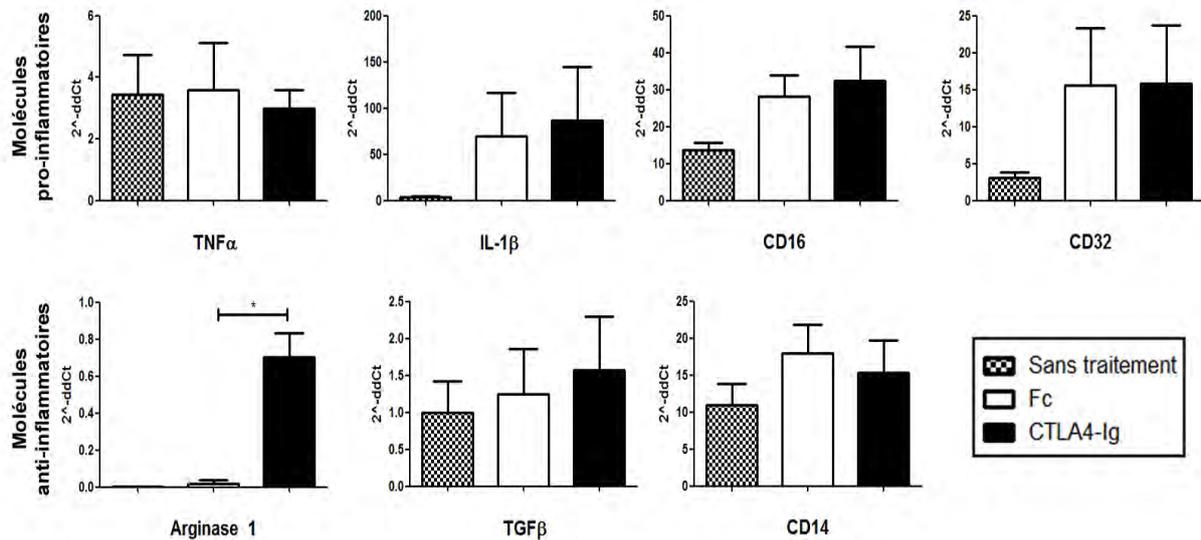


Figure 9 : Analyse qPCR de l'effet du CTLA4-Ig sur l'expression de molécules pro et anti-inflammatoires. Quantification de l'expression relative des ARNm codant pour les molécules pro-inflammatoires TNF α , IL-1 β , CD16 et CD32 et pour les molécules anti-inflammatoires arginase 1, TGF β et CD14 en fonction du traitement avec le fragment Fc ou CTLA4-Ig. Les données sont représentées en moyennes \pm SEM (n=4-5 ; *p<0.05 ; Test de Kruskal Wallis).

B-4 Effet du CTLA4-Ig sur l'expression de facteurs neurotrophiques par la microglie

En plus de ses capacités de sécrétion de molécules liées à l'inflammation, la microglie peut également sécréter des facteurs neurotrophiques (Bessis et al., 2007; Trang et al., 2011; Wang et al., 2013). Par des analyses de qPCR sur des microglies isolées à partir de cultures mixtes astrocytes/microglies après 24h de traitement avec le fragment Fc ou CTLA4-Ig, nous avons étudié l'impact de CTLA4-Ig sur l'expression des facteurs neurotrophiques NGF, GDNF et BDNF. Dans nos conditions de culture, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression de GDNF par la microglie isolée. L'analyse de l'expression de l'ARNm du NGF montre que CTLA4-Ig n'induit pas de modification de son expression (Figure 10 ; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pour le NGF : Fc=0.5459±0.3360 ; CTLA4-Ig=0.7693±0.5564 ; p>0.05). En revanche, nous observons une augmentation significative de l'expression de l'ARNm du BDNF suite au traitement CTLA4-Ig en comparaison avec le fragment Fc (Figure 10 ;

2- $\Delta\Delta$ Ct pour le BDNF : Fc=0.0039 \pm 0.0039 ; CTLA4-Ig=0.0471 \pm 0.0177 ; *p<0.05 ; Test de Kruskal-Wallis). Nos résultats indiquent que CTLA4-Ig induit l'expression de l'ARNm du facteur neurotrophique BDNF dans la microglie.

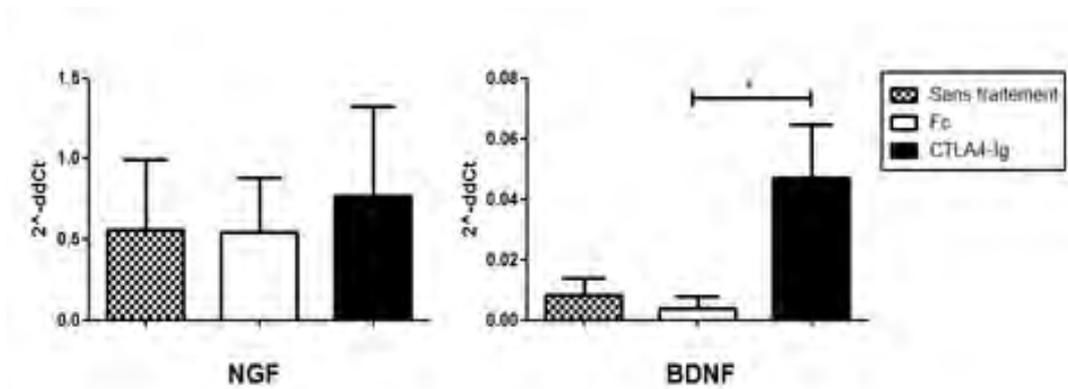


Figure 10 : Analyse qPCR de l'effet du CTLA4-Ig sur l'expression de facteurs neurotrophiques. Quantification de l'expression relative de l'ARNm codant pour les facteurs neurotrophiques NGF et BDNF en fonction du traitement avec le contrôle Fc ou CTLA4-Ig. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM (n=4-5 ; *p<0.05 ; Test de Kruskal-Wallis).

DISCUSSION

Nous avons montré *in vivo* dans un modèle de greffe intracérébrale que les neurones greffés exprimant CTLA4-Ig induisaient une modification de la morphologie microgliale vers un profil ramifié et que cet effet était corrélé avec une augmentation de la longueur des axones des neurones greffés. Sur des cultures mixtes d'astrocytes et de microglies, nous avons confirmé l'effet du CTLA4-Ig sur la morphologie microgliale médié par le récepteur de co-stimulation CD86, et montré l'induction de l'expression de BDNF et de l'arginase 1 par la microglie traitée directement avec du CTLA4-Ig. Nos résultats suggèrent que CTLA4-Ig, en agissant sur les récepteurs CD86 microgliaux, favorise la survie et/ou le développement des neurones via la sécrétion par la microglie de facteurs neurotrophiques et anti-inflammatoires (figure 41).

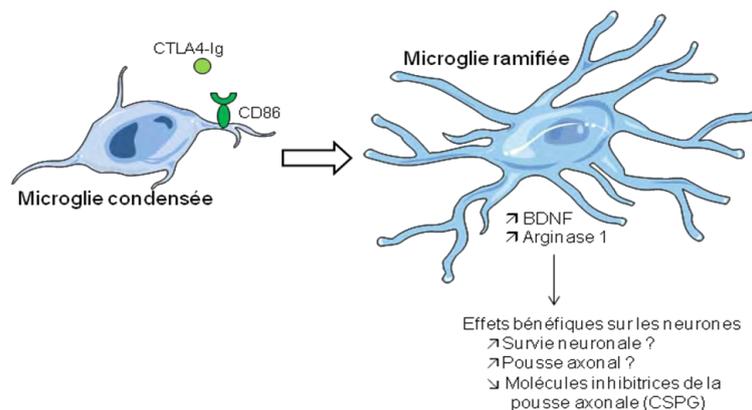


Figure 41 : Schéma bilan de l'action du CTLA4-Ig sur la microglie. L'activation des récepteurs CD86 microgliaux par le CTLA4-Ig induit une augmentation de la ramification des microglies. Ces modifications morphologiques de la microglie sont associées à une augmentation de l'expression de BDNF et d'arginase 1. Ces molécules pourraient être à l'origine de l'augmentation de la longueur des axones observées *in vivo* en agissant directement sur le développement de l'axone mais aussi en modulant la survie des neurones greffés. Une troisième hypothèse est que les modifications microgliales induites par CTLA4-Ig pourraient influencer sur l'expression gliale de molécules inhibitrices de la poussée axonale, telles que les protéoglycanes sulfatés (CSPG).

Expression et localisation de CD80-CD86

In vivo, nous avons montré une expression microgliale de CD86, restreinte au site de greffe, sans détecter d'expression de CD80. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études qui ont

montré une expression microgliale de CD86, sans expression de CD80, dans un modèle de lésion du cortex enthorinal (Bechmann et al., 2001) mais aussi dans des modèles de lésion du nerf facial et du nerf lombaire L5 (Bohatschek et al., 2004; Rutkowski et al., 2004). Cependant, dans des modèles sans lésion aiguë, tels que les modèles tumoraux de glioblastomes ou autoimmuns de sclérose en plaques, une expression astrocytaire et microgliale des deux récepteurs CD80 et CD86 a été rapportée (Duncan and Miller, 2011; Zeinstra et al., 2003). Il semble donc que l'expression de CD80-CD86 par l'astrocyte et/ou la microglie soit différente suivant le modèle utilisé, et notamment selon qu'il y ait des lésions aiguës ou non. Dans notre modèle, la greffe, quoique réalisée chez des animaux sains, entraîne des lésions des prolongements des neurones striataux. On peut émettre l'hypothèse que les lésions au niveau des systèmes nerveux central et périphérique induiraient préférentiellement une expression microgliale de CD86 et pas de CD80.

Nos résultats montrent que l'expression de CD86 est restreinte au site de greffe et est absente au niveau contralatéral. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui montrent l'absence d'expression de CD86 dans le cerveau sain, mais uniquement au niveau de lésion (Bohatschek et al., 2004; Cross and Ku, 2000). Cela suggère que l'expression de CD86 par la microglie serait induite par une inflammation locale.

Ligands endogènes des récepteurs CD86

Nos résultats montrent une expression préférentielle de CD86 par la microglie *in vivo* et *in vitro*. De plus, nous avons montré que CTLA4-Ig n'induisait pas de ramification de la microglie en présence d'anticorps bloquants le récepteur CD86. Ces résultats suggèrent que les récepteurs CD86 microgliaux sont fonctionnels. Cette expression fonctionnelle de CD86 par la microglie nous interroge sur la présence d'un ligand endogène de CD86 dans le SNC. Dans le SI, les principaux ligands de CD86 sont les molécules CTLA4 et CD28 (Chen and Flies, 2013). Des analyses d'immunomarquage et de PCR quantitative sur des extraits de cerveaux de rats et de microglies en culture ne nous ont pas permis de mettre en évidence l'expression ni de CTLA4 ni de CD28 par la microglie ou l'astrocyte. De plus, il n'est pas fait mention dans la littérature de l'expression de CTLA4 ou de CD28 par les

cellules du cerveau. CTLA4 et CD28 n'apparaissent donc pas comme de bons candidats comme ligands endogènes de CD86 dans le cerveau. B7-H1 (ou PD-L1 (programmed cell-death ligand 1)) est une molécule appartenant à une autre voie de co-stimulation du lymphocyte T qui a été décrite comme étant exprimée par la microglie et les neurones. Elle semble importante, en conditions physiologiques, pour l'élimination des cellules ganglionnaires de la rétine pendant le développement mais aussi pour inhiber l'activation des lymphocytes T en conditions pathologiques (Magnus et al., 2005; Sham et al., 2012). Cependant, il a été montré, dans le SI, que PD-L1 interagissait avec CD80 mais pas avec CD86 (Butte et al., 2007, 2008). Ainsi, bien qu'exprimé au sein du SNC, PD-L1 ne semble pas être un ligand endogène de CD86. Aucun des ligands connus de CD86 ne semble être exprimé dans le SNC. La recherche de ce potentiel ligand endogène permettrait d'apporter de nouvelles hypothèses quant au rôle de CD86 dans le SNC, mais permettrait aussi de mettre en évidence un nouvel interactant potentiel de CD86 dans le SI.

Dans des conditions pathologiques particulières induisant une infiltration de lymphocytes T, les ligands de CD86, CTLA4 et CD28 sont alors « importés » dans le SNC par les lymphocytes T infiltrants. Une hypothèse est que l'expression de CD86 par la microglie lui confère des capacités de modulation de l'activation des lymphocytes T. En effet, l'activation des lymphocytes T nécessite, en plus de la reconnaissance d'un complexe CMH/peptide, un signal de co-stimulation délivré par la CPA (Chen and Flies, 2013). L'expression de CD86 par la microglie lui permet ainsi de délivrer un signal de co-stimulation aux lymphocytes T infiltrants en interagissant avec les molécules CD28 et CTLA4 exprimées par les lymphocytes T. La microglie a été décrite comme étant la CPA majeure du cerveau lui conférant un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire dans les modèles rongeurs de sclérose en plaques mais aussi dans un modèle de lésion du nerf facial (Almolda et al., 2011; Byram et al., 2004). On peut émettre l'hypothèse que l'expression de CD86 par la microglie en conditions inflammatoires pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire locale par son interaction avec les molécules CD28 et CTLA4 lymphocytaires.

Fonctions cérébrales médiées par l'activation de CD86

In vivo, nos résultats montrent que l'expression locale de CTLA4-Ig induit une modification de la morphologie microgliale corrélée à une augmentation de la longueur des prolongements axonaux. Ces résultats suggèrent un rôle fonctionnel de la molécule CTLA4-Ig sur la morphologie des cellules du cerveau. Cependant, les effets observés *in vivo* pourraient être dus à la partie Ig de la molécule. La greffe de neurones exprimant le fragment Ig de la molécule CTLA4-Ig permettrait de mettre en évidence les effets spécifiques de la partie CTLA4. Cependant, nous avons montré *in vitro* que la partie CTLA4 induisait spécifiquement une transition morphologique de la microglie d'un profil amiboïde vers un profil multipolaire, suggérant un effet spécifique de la partie CTLA4 sur les modifications morphologiques de la microglie *in vivo*.

In vitro, nos résultats indiquent que CTLA4-Ig engendre l'expression microgliale de l'arginase 1 ainsi que des modifications de la morphologie microgliale vers un profil multipolaire. Ces caractéristiques correspondent à un profil microglial de type M2. En effet, comme il a été décrit pour les macrophages périphériques, la microglie est capable d'adopter un profil différent, défini par M1 ou M2, suivant le stimulus d'activation qu'elle reçoit (Chhor et al., 2013; Kigerl et al., 2009; Mosser and Edwards, 2008). Le profil M1, obtenu *in vitro* par stimulation au LPS, est caractérisé par l'expression de molécules cytotoxiques et pro-inflammatoires (TNF α , iNOS, IL-1 β , IL-6, IFN γ) et par une morphologie amiboïde (Boche et al., 2013; Colton, 2009; Klintworth et al., 2009). Le profil M2, obtenu *in vitro* par stimulation avec l'IL-4, est caractérisé par l'expression de molécules anti-inflammatoires, immunorégulatrices et neuroprotectrices (TGF β , IL-10, CD206, IL-4, arginase 1) (Chhor et al., 2013). Ces microglies de type M2 présentent une morphologie ramifiée (Zhou et al., 2012). L'expression d'arginase 1 et la transition vers un profil ramifié de la microglie induites par CTLA4-Ig suggèrent qu'il pourrait favoriser le profil anti-inflammatoire M2 de la microglie. Il serait intéressant d'examiner l'expression de CD206 et de l'IL-10 après traitement des microglies avec CTLA4-Ig afin de confirmer l'hypothèse d'induction d'un profil M2 par CTLA4-Ig.

Nos résultats *in vivo* montrent que les axones des neurones greffés restent confinés au niveau du site de la greffe avec une pénétration très limitée dans le parenchyme. Cependant, dans le cas des neurones exprimant CTLA4-Ig, les projections axonales dans le parenchyme cérébral en dehors du site de greffe sont plus importantes que pour les neurones WT. Une hypothèse est que le microenvironnement entourant la greffe soit plus permissif à la pousse axonale en présence de CTLA4-Ig. En effet, des molécules inhibitrices de la pousse axonale, telles que les protéoglycanes sulfatés (CSPG), peuvent être fortement exprimées par les astrocytes dans un contexte de lésion cérébrale (Giger et al., 2010; Sharma et al., 2012). Une possibilité est que CTLA4-Ig, via la microglie, régule la production de CSPG par l'astrocyte.

In vivo, nous avons montré que la sécrétion locale de CTLA4-Ig induit une augmentation de la longueur des prolongements axonaux corrélée à une augmentation de l'index de morphologie microgliale vers un profil ramifié. *In vitro*, nous avons montré que la transition de la microglie vers une morphologie ramifiée induite par le CTLA4-Ig était associée à une expression d'arginase 1. Ces résultats suggèrent que la sécrétion d'arginase 1 par la microglie, induite par le CTLA4-Ig, pourrait favoriser l'élongation des prolongements neuronaux. Quelques études ont montré un rôle neuroprotecteur de l'arginase 1 *in vitro*, mais l'impact de l'arginase 1 sur le développement neuronal reste encore peu connu. En effet, l'arginase 1 permet de favoriser la survie des neurones dans des modèles *in vitro* de mort cellulaire induite par l'absence de facteurs trophiques ou par stress oxydatif (Esch et al., 1998; Estévez et al., 2006). De plus, l'augmentation de la concentration en polyamines (corrélée à une augmentation de l'arginase 1) dans le microenvironnement favorise la régénération du nerf optique *in vivo* (Deng et al., 2009). Il serait donc intéressant de savoir si l'effet sur l'élongation des prolongements neuronaux, induit par la sécrétion locale de CTLA4-Ig, fait intervenir l'activité neurotrophique de l'arginase 1.

Nos résultats montrent également que CTLA4-Ig induit l'expression de BDNF par la microglie. Ces résultats sont en adéquation avec d'autres études qui ont montré que la microglie était capable de sécréter des facteurs neurotrophiques dont le BDNF (Gomes et al., 2013; Soontornniyomkij et al., 1998). Cependant, certaines études montrent que la microglie est capable de sécréter du BDNF

sous activation par du LPS (Gomes et al., 2013). Il apparaît donc que l'expression du BDNF ne soit pas corrélée avec le profil M1 ou M2 de la microglie. Le BDNF est un des facteurs neurotrophiques majeurs du cerveau et a été impliqué dans le développement et le fonctionnement du SNC (Park and Poo, 2013). Il est à la fois neuroprotecteur et promoteur de la pousse neuronale. Ainsi, il a été montré que le BDNF augmentait le nombre d'embranchements des axones des neurones de la rétine mais aussi favorisait la pousse des dendrites dans la couche IV du cortex (Cohen-Cory and Fraser, 1995; Horch and Katz, 2002; McAllister et al., 1997). On peut émettre l'hypothèse que la sécrétion de BDNF induite par le CTLA4-Ig pourrait augmenter la pousse des axones des neurones greffés et ainsi conduire à l'augmentation de la longueur des axones observée *in vivo*.

Nos résultats, *in vitro*, montrent que le CTLA4-Ig induit à la fois l'expression de BDNF et d'arginase 1. Les mécanismes moléculaires mis en jeu sont encore inconnus mais une hypothèse serait que les voies de signalisation recrutées suite à l'activation de CD86 par le CTLA4-Ig induisent l'expression de BDNF et de l'arginase 1. La voie p38MAPK semble être un bon candidat. En effet, il a été montré dans le SI que l'activation de CD80-CD86 par le CTLA4-Ig induisait l'expression d'IFN γ via la voie p38MAPK dans les cellules dendritiques (Grohmann et al., 2002). De plus, l'activation de la voie p38MAPK semble induire à la fois la synthèse de BDNF et de l'arginase 1 (Chang et al., 2000; Trang et al., 2009). Ainsi, l'activation de CD86 par CTLA4-Ig pourrait induire la voie p38MAPK dans les microglies, conduisant à une augmentation d'expression de BDNF et de l'arginase 1.

PERSPECTIVES

Les résultats sur l'expression induite de BDNF et d'arginase 1 par la microglie stimulée avec CTLA4-Ig ont été obtenus, *in vitro*, par PCR quantitative. Il conviendra de confirmer ces observations au niveau protéique mais aussi *in vivo*. De plus, un élément très intéressant que nous avons observé *in vivo* est l'effet de la sécrétion locale de CTLA4-Ig sur la pousse des prolongements axonaux. Des études *in vitro* sur des co-cultures de neurones et de microglies seront donc réalisées afin d'étudier l'action du CTLA4-Ig sur la survie et l'élongation des prolongements neuronaux.

Expression de BDNF et d'arginase 1.

Afin de caractériser l'effet du CTLA4-Ig sur l'expression protéique de BDNF et d'arginase 1 *in vitro*, des expériences de Western blot seront réalisées sur des lysats protéiques de microglies isolées à partir de cultures mixtes astrocytes/microglies traitées avec 5µg/ml de CTLA4-Ig ou de fragment Fc pendant 24h. De plus, le surnageant des microglies traitées avec le CTLA4-Ig ou le fragment Fc sera collecté afin de doser la quantité de BDNF et des polyamines issues de la catalyse de l'arginine par l'arginase (putrescine, spermidine, spermine) sécrétés dans le milieu.

Afin d'étudier, *in vivo*, l'effet du CTLA4-Ig sur l'expression de BDNF et d'arginase 1, un modèle d'injection intracérébral de CTLA4-Ig ou de son contrôle, le fragment Fc sera mis en place. Vingt-quatre heures après l'injection, l'expression de BDNF et d'arginase 1 sera analysée par qPCR sur des ADNc issus de prélèvements de cerveau au niveau du site d'injection, et par des analyses immunohistochimiques. Des double marquages avec le marqueur microglial Iba1 et le marqueur astrocytaire GFAP permettront d'identifier le type cellulaire exprimant ces molécules.

Effet du CTLA4-Ig sur l'élongation des prolongements neuronaux.

Des expériences préliminaires réalisées sur des co-cultures de neurones et d'astrocytes/microglies *in vitro* n'ont pas montré d'effet bénéfique du CTLA4-Ig sur le développement des prolongements neuronaux. Ces résultats suggèrent que les conditions de culture ne permettent pas de reproduire les effets bénéfiques du CTLA4-Ig, observés *in vivo*, sur la pousse axonale.

Afin d'étudier l'effet spécifique du CTLA4-Ig sur la pousse des prolongements neuronaux, des injections dans le cerveau de rats de fragment Fc ou de CTLA4-Ig associés avec un virus exprimant la mGFP seront réalisées, et la longueur des prolongements des neurones infectés par la mGFP sera mesurée.

Comme mentionné précédemment, le BDNF et l'arginase 1 peuvent avoir des effets bénéfiques sur la survie des neurones. Ainsi l'effet neuroprotecteur de la microglie traitée avec du CTLA4-Ig sera étudié. Des cultures tripartites (astrocytes/microglies et neurones) seront traitées

pendant 24h avec 5µg/ml de CTLA4-Ig ou de fragment Fc, puis soumises à des inducteurs de mort cellulaire par stress oxydatif (H₂O₂ et staurosporine) ou par stress du réticulum endoplasmique (tunicamicine). Les neurones seront fixés 6h et 24h après l'induction de la mort neuronale. La quantification du nombre de neurones en apoptose sera réalisée par des marquages immunohistochimiques avec un anticorps dirigé contre la forme clivée de la caspase 3. Dans l'hypothèse d'un effet bénéfique de la microglie traitée avec du CTLA4-Ig sur la survie des neurones, les expériences précédentes seront réitérées en ajoutant des anticorps bloquants le BDNF et/ou un inhibiteur de l'arginase 1 (nor-NOHA) afin de déterminer si les effets sont effectivement médiés par le BDNF et l'arginase 1.

L'effet bénéfique du CTLA4-Ig pourrait provenir de l'inhibition de la production de CSPG par l'astrocyte, molécules inhibitrices de la pousse axonale. Afin de tester cette hypothèse, des cultures mixtes astrocytes/microglies seront traitées avec 5µg/ml de CTLA4-Ig ou de fragment Fc pendant 24h. Après élimination des microglies par agitation, les astrocytes seront récupérés afin de faire des analyses par qPCR et Western Blot sur l'expression des principaux CSPG : neurocan, versican, aggrecan, brevican, phosphocan et NG2. Le milieu conditionné par les cultures mixtes astrocytes/microglies traitées avec CTLA4-Ig ou le fragment Fc, sera collecté afin de réaliser des dosages par ELISA des principaux CSPG. Enfin, des analyses qPCR et des marquages immunohistochimiques seront réalisés sur les cerveaux de rats injectés avec CTLA4-Ig ou le fragment Fc afin de confirmer *in vivo* la régulation, par CTLA4-Ig, de l'expression des CSPG par l'astrocyte.

L'ensemble de ces résultats nous permettra d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes moléculaires permettant au CTLA4-Ig d'avoir un effet neurotrophique en activant le CD86 microglial.

DISCUSSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La discussion des résultats obtenus au cours de ma thèse sera divisée en trois parties. Dans une première partie, je discuterai du rôle de CD3 ζ dans le SNC. Dans une seconde partie je discuterai de la fonction de la voie du CD86 microglial dans le SNC. Enfin dans une dernière partie, je m'intéresserai aux analogies fonctionnelles des molécules dites immunes entre le SI et le SNC

CD3 ζ dans le SNC

Localisation de CD3 ζ

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de la molécule immune CD3 ζ dans le SNC. Durant les stades précoces du développement neuronal, nous avons mis en évidence l'expression de CD3 ζ par le neurone avant même sa polarisation. En effet, lorsque le neurone est encore sous forme sphérique, nous avons observé une accumulation de CD3 ζ en des microdomaines distribués autour du corps cellulaire. Nos résultats montrent une étroite corrélation entre l'agrégation de CD3 ζ et l'émergence des premiers neurites. Lors du développement des neurites, nous avons observé une expression de CD3 ζ au niveau des cônes de croissance et des filopodes des neurites mineurs mais aussi au niveau du cône de croissance axonal. A des stades matures du développement neuronal, nous avons observé une expression de CD3 ζ au niveau des synapses glutamatergiques. CD3 ζ semble donc être exprimé par les neurones tout au long de son développement. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés qui montrent une expression de CD3 ζ tout au long du développement neuronal *in vitro*, du stade de cellule souche neurale au neurone mature (Baudouin et al., 2008), mais aussi *in vivo* dans le système visuel en développement et mature et dans l'hippocampe (Corriveau et al., 1998; Huh et al., 2000; Xu et al., 2010).

Un point commun des domaines cellulaires enrichis en CD3 ζ tout au long du développement neuronal est qu'ils correspondent tous à des structures cellulaires riches en actine. En effet, les filopodes, cônes de croissance et épines dendritiques sont des domaines très dynamiques et enrichis en

actine (Dent et al., 2007; Hotulainen and Hoogenraad, 2010; Ishikawa and Kohama, 2007). Même au stade où le neurone présente une morphologie sphérique, alors que les filopodes et cônes de croissance ne sont pas encore formés, on observe une accumulation de CD3 ζ au niveau de microdomaines de la membrane cellulaire correspondant à des sites enrichis en actine. Ces données suggèrent un lien fort entre CD3 ζ et l'actine, et par conséquent, suggèrent une fonction de CD3 ζ dans des processus cellulaires dynamiques d'élongation et de plasticité. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, CD3 ζ est capable d'interagir directement avec l'actine via sa partie C-terminale. Cette interaction est importante pour la localisation de CD3 ζ puisque l'inhibition de la polymérisation de l'actine, par la cytochalasine D, entraîne une redistribution de la protéine CD3 ζ le long des dendrites (Baudouin et al., 2008). Ainsi, la polymérisation de l'actine est un facteur important pour la localisation de la protéine CD3 ζ au sein des domaines riches en actine durant le développement des dendrites. Cependant, cette interaction suggère que CD3 ζ pourrait agir lui aussi sur la polymérisation de l'actine. Nos résultats sur les étapes précoces du développement neuronal montrent l'implication de la Rho GEF Vav2 dans la formation des filopodes induite par CD3 ζ , suggérant ainsi que CD3 ζ peut agir sur l'actine via son interaction avec des protéines régulatrices des Rho GTPases. Les synapses subissent notamment des modifications morphologiques durant leur développement et au cours de la plasticité synaptique (Bosch and Hayashi, 2012; Yoshihara et al., 2009). Il serait intéressant d'étudier le rôle de CD3 ζ sur les réorganisations du cytosquelette d'actine durant la synaptogénèse et la plasticité synaptique.

Récepteurs associés à CD3 ζ dans le SNC

Dans l'introduction, nous avons vu que CD3 ζ est une protéine adaptatrice permettant la transmission d'un signal lors de l'activation du récepteur dont il est partenaire. Dans le SI, CD3 ζ est décrit comme interagissant avec plusieurs récepteurs. Dans le SNC, les récepteurs associés à CD3 ζ restaient encore inconnus.

Dans le SI, le récepteur principal associé à CD3 ζ est le récepteur des lymphocytes T, le TCR (Samelson et al., 1985). L'interaction du complexe CMH/peptide avec le TCR induit l'activation de CD3 ζ , qui, par l'intermédiaire de ses domaines ITAM, recrute les protéines kinases ZAP-70/Syk,

déclenchant ainsi une cascade signalétique aboutissant à l'activation des lymphocytes T. Les études visant à chercher l'expression d'un TCR dans le cerveau ont montré la présence seule de l'ARNm immature de la chaîne β du TCR alors que la chaîne α n'a jamais été détectée, suggérant ainsi que le TCR mature et fonctionnel n'est pas exprimé par les cellules du cerveau (Nishiyori et al., 2004; Syken and Shatz, 2003). De plus, nos propres résultats n'ont jamais mis en évidence l'expression du TCR au niveau protéique. Ces données suggèrent que le TCR ne serait pas le récepteur associé à CD3 ζ dans le SNC.

Un autre récepteur associé à CD3 ζ dans les lymphocytes T est le récepteur CXCR4 (Kumar et al., 2006; Patrussi et al., 2007). Dans le SI, la fonction chimiotactique de la voie SDF-1/CXCR4 est médiée par l'activation de CD3 ζ , conduisant à la phosphorylation de ZAP-70 et à l'activation de voies de signalisation importantes pour la migration, la prolifération et la survie des lymphocytes T. CXCR4 est largement exprimé au sein du SNC, dans les astrocytes, les microglies et les neurones (Bezzi et al., 2001; Pujol et al., 2005; Tanabe et al., 1997). La comparaison des études publiées sur la distribution cellulaire de CXCR4 au cours du développement neuronal avec nos études sur la localisation de CD3 ζ montre que CD3 ζ et CXCR4 sont tous deux exprimés dans les cônes de croissance des neurites et de l'axone durant les étapes précoces de formation des premiers prolongements. L'association de CD3 ζ avec CXCR4 durant les étapes précoces du développement serait donc possible. Cependant, l'activation de CXCR4 par SDF-1 induit une augmentation du nombre de neurites sur des neurones à 2 DIV (day in vitro), suggérant un rôle favorable de CXCR4 dans la pousse neuritique (Pujol et al., 2005), alors que nous avons montré que CD3 ζ inhibait la pousse des neurites. Les effets antagonistes de CXCR4 et de CD3 ζ sur la pousse neuritique fragilisent l'hypothèse d'une interaction entre ces deux molécules dans les étapes précoces de développement des prolongements neuronaux. Durant la différenciation dendritique, CXCR4 est préférentiellement localisé au niveau axonal alors que CD3 ζ devient, au contraire, restreint au domaine somatodendritique (Baudouin et al., 2006, 2008). L'expression de CD3 ζ et de CXCR4 dans des compartiments cellulaires différents durant le développement neuronal plus tardif suggère que CXCR4 ne soit pas un récepteur de CD3 ζ dans le SNC.

Dans le SI, CD3 ζ n'est pas uniquement exprimé dans les lymphocytes T mais aussi dans les cellules NK où il est associé avec les récepteurs NKp30 et NKp46 (Lanier, 2003). Des études préliminaires réalisées par l'équipe semblent indiquer la présence de l'ARNm des récepteurs NKp30 et NKp46 dans le cerveau de rat, mais leur expression protéique n'a jamais pu être mise en évidence jusqu'à présent. Ces données suggèrent que CD3 ζ ne serait pas associé aux récepteurs NKp30 et NKp46 dans le SNC.

Au cours de ma thèse, nous avons décrit deux récepteurs interagissant avec CD3 ζ . Durant les étapes précoces du développement axonal, nous avons mis en évidence une association de CD3 ζ avec le récepteur EphA4. En effet, des expériences de co-immunoprécipitation ont mis en évidence une interaction de CD3 ζ avec le récepteur EphA4. De plus, dans des neurones en culture, l'activation des récepteurs EphA4 par l'éphrine A1 induit une co-agrégation de CD3 ζ avec les récepteurs EphA4, mais aussi avec les molécules de signalisation connues pour être associées à CD3 ζ dans le lymphocyte T, les protéines kinases ZAP-70/Syk, suggérant une interaction fonctionnelle entre CD3 ζ et EphA4 dans les étapes précoces du développement neuronal. Chez l'adulte, nous avons montré, par des expériences de co-immunoprécipitation sur des cerveaux de souris, une interaction de CD3 ζ avec la sous-unité GluN2A des récepteurs NMDA. Nos résultats montrent que la localisation de GluN2A et la signalisation médiée par l'activation des récepteurs NMDA dans un contexte de LTP sont altérées en absence de CD3 ζ . Ces études mettent en évidence pour la première fois des récepteurs associés à CD3 ζ dans le SNC. De plus, ces résultats semblent indiquer que CD3 ζ interagirait avec des partenaires différents au cours des étapes précoces du développement neuronal et dans le neurone mature.

Concernant les récepteurs EphA4, non seulement importants pour le développement axonal, ils sont aussi exprimés au niveau synaptique et participent à la fonction et à la plasticité des synapses (Klein, 2009). Nous avons donc examiné si CD3 ζ interagissait avec EphA4 dans les neurones matures et participait à des voies signalétiques faisant intervenir EphA4. Nos résultats montrent que l'absence de CD3 ζ ne modifie pas le clivage d'EphA4 médié par l'activité synaptique suggérant que CD3 ζ ne

participe pas à la signalisation associée au clivage d'EphA4. De plus, nos résultats préliminaires de co-immunoprécipitation n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre CD3 ζ et EphA4 dans le cerveau de souris. Cependant, notre étude réalisée *in vitro* montre une co-agrégation de CD3 ζ et d'EphA4 induite par le traitement des neurones avec l'éphrine A1, suggérant que l'association d'EphA4 avec CD3 ζ serait renforcée après activation des récepteurs EphA4. Il serait intéressant de réaliser des expériences de co-immunoprécipitations sur des coupes de cerveaux adultes traitées avec l'éphrine A1 afin de déterminer si l'interaction entre CD3 ζ et EphA4 est dépendante de l'activation des récepteurs EphA4 par l'éphrine A1.

De la même manière, une hypothèse serait que CD3 ζ interagisse aussi avec la sous-unité GluN2A dans le neurone en développement. En effet, la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA a été montrée comme exprimée au niveau du cône de croissance de l'axone des neurones à 3 DIV et l'activation de ces récepteurs avec du NMDA engendre une augmentation de la concentration en calcium au niveau du cône de croissance (Wang et al., 2011). Cependant, la présence de la sous-unité GluN2A, au niveau du cône de croissance, n'a pas été montrée et plusieurs études ont montré que la sous-unité GluN2B est prédominante dans le neurone en développement (Liu et al., 2004b). Ces résultats suggèrent que CD3 ζ ne serait pas associé à GluN2A dans le neurone en développement. Concernant GluN2B, la combinaison d'anticorps disponibles pour les expériences de coimmunoprécipitation ne nous ont pas permis de statuer quant à une interaction possible avec CD3 ζ . Dans les neurones adultes, notre étude a mis en évidence que l'absence de CD3 ζ ne modifiait ni l'expression ni la localisation de GluN2B, suggérant que CD3 ζ n'interagirait pas avec GluN2B. Il serait cependant intéressant de poursuivre les expériences de coimmunoprécipitation en se focalisant notamment sur les neurones en développement afin de déterminer si CD3 ζ interagit avec la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA.

Fonctions cérébrales de CD3 ζ

Nos études à propos du rôle de CD3 ζ dans le développement et la plasticité neuronale ont mis en évidence un rôle de CD3 ζ dans les étapes précoces d'élongation des neurites mais aussi dans la

composition synaptique et la plasticité chez le neurone mature. En effet, l'absence de CD3 ζ engendre une augmentation du nombre de dendrites chez le neurone en développement, induit une diminution de la localisation synaptique de GluN2A et abroge la translocation synaptique de GluA1 et CaMKII durant la LTP chez le neurone mature. Il semble donc que CD3 ζ soit requis à différentes étapes du développement neuronal, pour jouer des rôles spécifiques. D'autres molécules, notamment des récepteurs, ont aussi des spécificités de fonction suivant le niveau de développement du neurone. Ainsi, les éphrines et leurs récepteurs sont impliqués dans le guidage axonale durant le développement de l'axone mais interviennent aussi dans les fonctions de plasticité synaptique chez le neurone mature (Egea and Klein, 2007; Paixão and Klein, 2010). Le CMHI, de même, joue un rôle dans la ségrégation des projections dans le système visuel en développement et participe au trafic des récepteurs AMPA au niveau synaptique (Datwani et al., 2009; Fourgeaud et al., 2010). Certaines molécules de signalisation ont aussi des fonctions distinctes au cours du développement. Ainsi, la CaMKII et la PP1, connues pour leurs rôles dans la plasticité synaptique, jouent aussi un rôle dans le guidage du cône de croissance de l'axone en développement (Morishita et al., 2001; Otmakhova et al., 2000; Wen et al., 2004). CD3 ζ , comme d'autres molécules de signalisation, présente ainsi des fonctions distinctes dans le neurone en développement et le neurone mature.

Avec nos études sur la fonction cérébrale de CD3 ζ , nous avons mis en évidence deux voies signalétiques dépendantes de CD3 ζ . L'une est la voie éphrine A1/EphA4/ZAP-70/Syk et l'autre fait intervenir la CaMKII. Au niveau du cône de croissance, nous avons montré que CD3 ζ était nécessaire pour permettre l'agrégation des récepteurs EphA4 avec les molécules de signalisation ZAP-70/Syk. En effet, la stimulation des récepteurs EphA4 par l'éphrine A1 entraîne une augmentation de la colocalisation entre EphA4 et la forme phosphorylée, donc activée, de ZAP-70/Syk sur des neurones WT mais pas sur des neurones déficients en CD3 ζ . Au niveau synaptique, nos résultats montrent que CD3 ζ permet le recrutement de la CaMKII au niveau des récepteurs NMDA synaptiques. En effet, l'absence de CD3 ζ abroge la translocation synaptique de CaMKII lors de l'activation des récepteurs NMDA par un protocole d'induction chimique de la LTP. De plus, nous avons montré que l'absence de CD3 ζ entraînait une diminution de l'interaction de la CaMKII avec la sous-unité GluN2A dans le

cerveau de souris adulte. Il apparaît ainsi que CD3 ζ joue un rôle clé dans la formation de complexes protéiques lors de l'activation du récepteur auquel il est associé. Ainsi, la fonction générale de CD3 ζ dans le SNC serait de permettre la formation de complexes moléculaires entre des protéines kinases et le récepteur associé à CD3 ζ , pour permettre la mise en place de voies signalétiques importantes pour le développement et le fonctionnement du neurone.

Fonction cérébrale CD86

Concernant la voie de co-stimulation CTLA4/CD80-CD86, nos résultats montrent une expression microgliale des récepteurs CD86 localisée au niveau du site de la greffe. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études qui ont montré une expression des récepteurs CD86 en conditions pathologiques et inflammatoires. (Bechmann et al., 2001; Bohatschek et al., 2004). De plus, nous avons montré que l'activation des récepteurs CD86 par le CTLA4-Ig entraîne la génération d'un phénotype microglial bénéfique pour les neurones, caractérisé par une transition de la microglie vers un profil ramifié et par l'expression de molécules neuroprotectrices, l'arginase 1 et le BDNF. L'activation microgliale en conditions pathologiques, notamment au cours de maladies neurodégénératives, a été bien décrite et l'induction, par CTLA4-Ig, d'un profil neuroprotecteur pourrait être intéressante dans ce type de pathologies, notamment la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Hirsch et al., 2012; Lee et al., 2010b). En effet, il a été montré qu'inhiber l'activation de la microglie par la minocycline avait des effets neuroprotecteurs dans plusieurs modèles animaux de la maladie de Parkinson (Thomas and Le, 2004), suggérant que la microglie pouvait être une cible thérapeutique pour la maladie de Parkinson. De plus, le BDNF a montré des effets bénéfiques sur la perte de neurones dopaminergiques mais aussi sur les capacités motrices des modèles animaux murins et simiens de la maladie de Parkinson (Nagahara and Tuszynski, 2011). Il serait intéressant d'étudier les effets de l'injection locale de CTLA4-Ig dans le cerveau de rats traités au MPTP ou à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (modèles de la maladie de Parkinson) sur la perte neuronale et les capacités motrices.

Cependant, nous avons vu dans l'introduction que la microglie participait aussi au développement physiologique du neurone. Notamment, la microglie joue un rôle important dans l'apoptose développementale et dans la synaptogénèse (Tremblay et al., 2011). Durant l'apoptose développementale, les microglies responsables de l'élimination des neurones excédentaires dans le cervelet présentent une morphologie amiboïde et exprime la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase, enzyme associée à l'activation de la microglie (Marín-Teva et al., 2004), suggérant un état activé de la microglie durant cette étape du développement. A ce stade, la microglie est neurotoxique puisqu'elle contribue à l'élimination des neurones. Après cela, la microglie adopte un profil de surveillance du parenchyme cérébrale via l'émission de prolongements hautement mobiles et adopte un profil neuroprotecteur (Vinet et al., 2012). Il semble donc que, pendant le développement, il existe une transition entre un état d'activation (plutôt neurotoxique) et de désactivation (plutôt neuroprotecteur) de la microglie. Il serait intéressant d'étudier l'expression et le rôle du CD86 microglial durant l'apoptose développementale. Une hypothèse serait que CD86, exprimé par la microglie activée, participerait à la transition morphologique de la microglie d'un profil amiboïde, lié à une intense phagocytose des neurones, vers un profil ramifié plus neuroprotecteur.

Analogies entre les fonctions immunes et cérébrales des molécules communes aux deux systèmes

Dans l'introduction, nous avons mis en évidence les relations et les similarités qui existent entre le SNC et le SI. En plus de communications croisées en conditions physiologiques et pathologiques, les deux systèmes partagent un répertoire moléculaire commun. Nos études se sont focalisées sur deux molécules importantes pour le fonctionnement du lymphocyte T que sont CD3 ζ et le récepteur de co-stimulation CD86. Ces molécules s'ajoutent à la liste toujours grandissante de molécules dites immunes présentant un rôle dans le SNC. Il est intéressant de constater que, au moins pour certaines de ces molécules, leur fonction est similaire entre le SI et le SNC. Par exemple, les molécules du complément et le CMHI semblent avoir un rôle assez similaire dans les deux systèmes.

Dans le SI, les molécules du complément permettent de cibler des cellules infectées ou endommagées et de les éliminer. Les travaux récents de Beth Stevens et Ben Barres suggèrent que, dans le SNC, les molécules du complément permettraient également un ciblage sélectif des synapses à éliminer au cours de l'étape d'élagage synaptique dans le système visuel en période postnatale (Schafer et al., 2012). Concernant le CMHI, son action dans le système immunitaire sous-tend la reconnaissance du soi et du non soi. Dans le SNC, le maintien de connexions appropriées entre les axones des cellules ganglionnaires de la rétine et les cibles postsynaptiques du thalamus est dépendant du CMHI. Ainsi, à l'instar du SI, le CMHI pourrait contribuer à la distinction des connexions à maintenir de celles à éliminer (Glynn et al., 2011; Huh et al., 2000).

La molécule CD3 ζ semble aussi partager une partie de ses fonctions immunes avec ses fonctions cérébrales. Dans les lymphocytes T, CD3 ζ a deux rôles principaux. Au cours du développement des lymphocytes T, CD3 ζ permet l'expression membranaire stable du TCR (D'Oro et al., 2002). Le second rôle de CD3 ζ dans le lymphocyte T est de permettre, au niveau de la synapse immunologique, la formation d'un complexe moléculaire signalétique incluant notamment la famille ZAP-70/Syk, SLP76 et LAT (Baniyash, 2004). Dans le SNC, notre étude s'intéressant au rôle de CD3 ζ au niveau de la synapse neuronale montre des fonctions similaires dans la stabilisation membranaire de récepteurs et dans la formation de complexes signalétiques. En effet, nos résultats indiquent que l'absence de CD3 ζ entraîne une diminution de la localisation synaptique de GluN2A, suggérant donc que, comme dans le SI, CD3 ζ est important pour l'expression membranaire de récepteurs en des sites spécifiques. De plus, nous avons montré que le recrutement synaptique et le niveau d'activation de la CaMKII, induits par l'activation des récepteurs NMDA lors de la LTP, étaient dépendants de CD3 ζ . Il semble donc, que dans les neurones comme dans les lymphocytes T, CD3 ζ permet la formation de complexes moléculaires nécessaires pour la mise en place des voies de signalisation dépendantes de l'activation des récepteurs NMDA (figure 42).

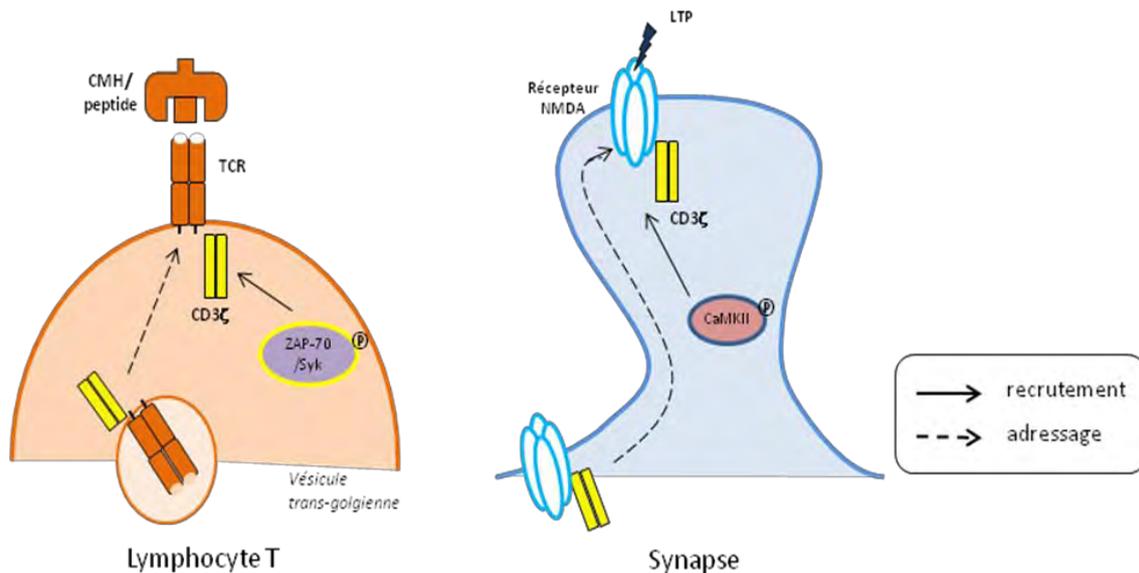


Figure 42 : Similarités de fonction de CD3 ζ entre le SI et le SNC. A la fois dans le SI et le SNC, CD3 ζ semble avoir une fonction d'adressage. Dans le SI, il permet l'expression et la stabilisation du TCR à la membrane du lymphocyte T. Dans le SNC, l'absence de CD3 ζ induit une diminution de la localisation synaptique de la sous-unité GluN2A des récepteurs NMDA. De plus CD3 ζ permet la mise en place de complexes moléculaires. Dans le SI, CD3 ζ participe au recrutement, au niveau du TCR, des kinases, notamment de la famille ZAP-70/Syk, permettant l'induction des voies de signalisation dépendantes du TCR. Dans le SNC, il semble que CD3 ζ permette la translocation synaptique et de la CaMKII au niveau des récepteurs NMDA lors de l'activation de ces derniers par un protocole d'induction de LTP.

De même, notre étude concernant la voie de co-stimulation CTLA4/CD80-CD86 dans le SNC semble aussi indiquer des fonctions similaires dans le SI et le SNC. L'activation des récepteurs CD80-CD86 des CPA par le CTLA4-Ig augmente l'expression de la molécule IDO (Sucher et al., 2012), dont l'activité induit un appauvrissement de l'environnement en tryptophane et un enrichissement en kynurénine qui vont, de concert, inhiber la réponse lymphocytaire T (Bauer et al., 2005). De plus, une étude récente a montré que CTLA4-Ig induisait l'expression de l'arginase 1 dans les macrophages (Fujii et al., 2013). Dans le SI, l'arginase 1 est une molécule immunosuppressive qui va bloquer l'activation et la prolifération des LT notamment en déplaçant le microenvironnement en arginine (Rodriguez et al., 2004). Ainsi, la stimulation des récepteurs CD80-CD86 conduit à des modifications du microenvironnement autour des cellules présentatrices d'antigènes, ce qui va influencer sur l'activation des lymphocytes T. Dans notre étude, nous avons montré que l'activation des récepteurs CD86 microgliaux par le CTLA4-Ig induisait des changements morphologiques de la microglie associés à l'expression du BDNF et de l'arginase 1. Les analyses *in vivo* semblent corrélés avec les modifications

morphologiques de la microglie avec une augmentation de la pousse axonale. On peut alors émettre l'hypothèse que l'expression du BDNF et l'augmentation d'arginase 1 par la microglie va influencer sur la pousse des neurones environnants. Il semble donc que la microglie stimulée par le CTLA4-Ig modifierait le microenvironnement, en sécrétant du BDNF et en synthétisant de la spermidine et de la putrescine, et influencerait sur le développement des cellules du cerveau, notamment les neurones. Il apparaît ainsi que l'activation des récepteurs CD86 par le CTLA4-Ig, dans le SI et le SNC, engendre des modifications du microenvironnement qui vont alors influencer sur l'activation et le développement des cellules environnantes (figure 43).

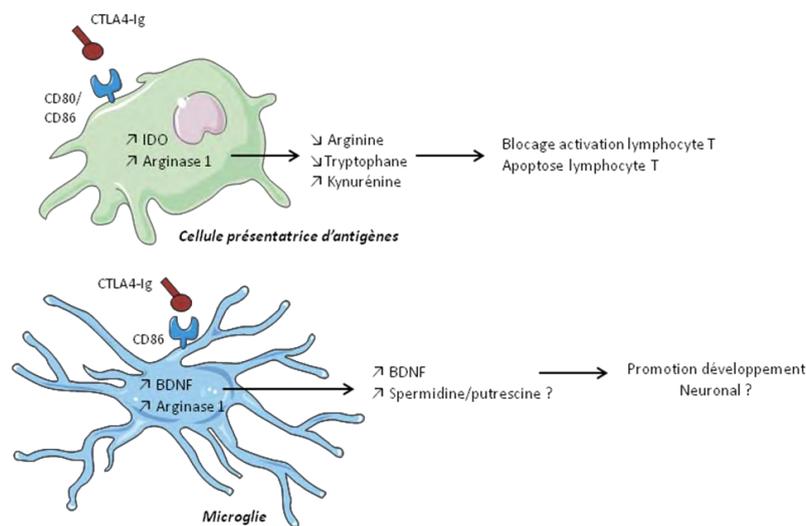


Figure 43 : Analogie de fonction de CD86 entre le SI et le SNC. Dans le SI, l'activation des récepteurs CD80-CD86 par CTLA4-Ig induit la production d'IDO et d'arginase 1 dans la CPA, ce qui résulte en un appauvrissement du microenvironnement en arginine et tryptophane ainsi qu'à l'augmentation de la concentration locale de kynurénine. Ces modifications du microenvironnement ont pour effet de bloquer l'activation des lymphocytes T. Dans le SNC, il semble que l'activation des récepteurs CD86 microgliaux induit une augmentation d'expression de BDNF et d'arginase 1 par la microglie. Une hypothèse est que l'enrichissement du microenvironnement en BDNF et spermidine/putrescine serait bénéfique pour la promotion du développement neuronal.

De manière intéressante, il existe dans le SI une interaction fonctionnelle entre la voie de co-stimulation CTLA4/CD80-CD86 et CD3 ζ conduisant au blocage des lymphocytes T. Comme mentionné précédemment, CTLA4-Ig a été montré comme induisant une augmentation d'expression de l'arginase 1 par les macrophages (Fujii et al., 2013), résultant en un appauvrissement de l'environnement en arginine (Rodriguez et al., 2004). Cette déplétion du microenvironnement

provoque le clivage de CD3 ζ , empêchant ainsi la signalisation induite par l'activation du TCR et donc conduisant à l'inhibition des lymphocytes T. Sur la base de ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme similaire dans le système nerveux central conduisant à l'augmentation de la pousse des axones sous l'action de CTLA4-Ig. En effet, nous avons montré que CTLA4-Ig induisait l'expression de l'arginase 1 par la microglie. Parallèlement, nous avons montré que CD3 ζ était un inhibiteur de la pousse des neurites. Une hypothèse serait que l'expression de l'arginase 1 par la microglie traitée au CTLA4-Ig induise le clivage de CD3 ζ au niveau neuronal (par analogie avec son action dans le SI), ce qui leverait l'inhibition de la pousse neuritique médiée par CD3 ζ et conduirait ainsi à une augmentation de la pousse axonale. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'arginase 1 sur la molécule CD3 ζ exprimée au niveau du cône de croissance des neurones en développement (figure 44).

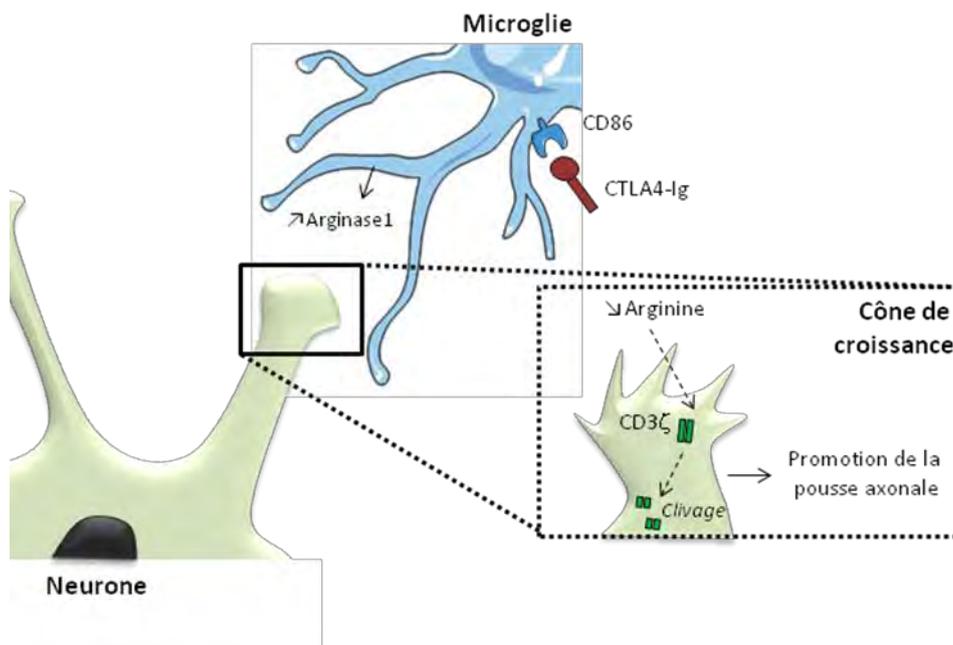


Figure 44 : Hypothèse d'un lien fonctionnel entre le CD86 microglial et le CD3 ζ neuronal. Par analogie avec l'effet de l'augmentation d'expression de l'arginase 1 sur le clivage du CD3 ζ des lymphocytes T, il est possible que l'expression d'arginase 1, induite par activation des récepteurs CD86 microgliaux par CTLA4-Ig, induise une déplétion du microenvironnement en arginine. Cette déplétion induirait le clivage de CD3 ζ au niveau du cône de croissance des prolongements neuronaux et leverait ainsi l'inhibition de la pousse neuritique médiée par CD3 ζ .

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence des éléments nouveaux quant au rôle de la molécule immune CD3 ζ et de la voie de co-stimulation CTLA4/CD80-CD86 dans le développement neuronal et la plasticité synaptique, et renforce encore les liens fonctionnels entre le système immunitaire et le système nerveux central.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, W.C., Logan, B., Greenwood, J.M., and Dragunow, M. (2002). Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 9626–9634.
- Acevedo, G., Padala, N.K., Ni, L., and Jonakait, G.M. (2013). Astrocytes inhibit microglial surface expression of dendritic cell-related co-stimulatory molecules through a contact-mediated process. *J. Neurochem.* *125*, 575–587.
- Adesnik, H., and Nicoll, R.A. (2007). Conservation of glutamate receptor 2-containing AMPA receptors during long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 4598–4602.
- Aguzzi, A., Barres, B.A., and Bennett, M.L. (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* *339*, 156–161.
- Albensi, B.C., Oliver, D.R., Toupin, J., and Odero, G. (2007). Electrical stimulation protocols for hippocampal synaptic plasticity and neuronal hyper-excitability: are they effective or relevant? *Exp. Neurol.* *204*, 1–13.
- Alegre, M.-L., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* *1*, 220–228.
- Almolda, B., Gonzalez, B., and Castellano, B. (2011). Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *16*, 1157–1171.
- Anda, F.C. de, Gärtner, A., Tsai, L.-H., and Dotti, C.G. (2008). Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *J. Cell Sci.* *121*, 178–185.
- De Anda, F.C., Pollarolo, G., Da Silva, J.S., Camoletto, P.G., Feiguin, F., and Dotti, C.G. (2005). Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* *436*, 704–708.
- Anggono, V., and Huganir, R.L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* *22*, 461–469.
- Aniksztejn, L., and Ben-Ari, Y. (1995). Expression of LTP by AMPA and/or NMDA receptors is determined by the extent of NMDA receptors activation during the tetanus. *J. Neurophysiol.* *74*, 2349–2357.
- Annenkov, A. (2009). The insulin-like growth factor (IGF) receptor type 1 (IGF1R) as an essential component of the signalling network regulating neurogenesis. *Mol. Neurobiol.* *40*, 195–215.
- Appleby, V.J., Corrêa, S.A.L., Duckworth, J.K., Nash, J.E., Noël, J., Fitzjohn, S.M., Collingridge, G.L., and Molnár, E. (2011). LTP in hippocampal neurons is associated with a CaMKII-mediated increase in GluA1 surface expression. *J. Neurochem.* *116*, 530–543.

- Arakawa, Y., Bito, H., Furuyashiki, T., Tsuji, T., Takemoto-Kimura, S., Kimura, K., Nozaki, K., Hashimoto, N., and Narumiya, S. (2003). Control of axon elongation via an SDF-1 α /Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J. Cell Biol.* *161*, 381–391.
- Aratyn, Y.S., Schaus, T.E., Taylor, E.W., and Borisy, G.G. (2007). Intrinsic dynamic behavior of fascin in filopodia. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3928–3940.
- Arimura, N., and Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 194–205.
- Badie, B., Bartley, B., and Schartner, J. (2002). Differential expression of MHC class II and B7 costimulatory molecules by microglia in rodent gliomas. *J. Neuroimmunol.* *133*, 39–45.
- Balschun, D., Wetzell, W., Del Rey, A., Pitossi, F., Schneider, H., Zuschratter, W., and Besedovsky, H.O. (2004). Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 1788–1790.
- Baniyash, M. (2004). TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 675–687.
- Banke, T.G., Bowie, D., Lee, H., Huganir, R.L., Schousboe, A., and Traynelis, S.F. (2000). Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 89–102.
- Barco, A., Patterson, S.L., Patterson, S., Alarcon, J.M., Gromova, P., Mata-Roig, M., Morozov, A., and Kandel, E.R. (2005). Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron* *48*, 123–137.
- Barker, R.A., Ratcliffe, E., McLaughlin, M., Richards, A., and Dunnett, S.B. (2000). A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 3415–3424.
- Barnard, C.J., Collins, S.A., Daisley, J.N., and Behnke, J.M. (2009). Immunodepression reduces learning performance in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Physiol. Behav.* *96*, 362–369.
- Barnes, P., and Thomas, K.L. (2008). Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *PloS One* *3*, e3248.
- Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L.C., and Soderling, T.R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* *276*, 2042–2045.
- Bashir, Z.I., Bortolotto, Z.A., Davies, C.H., Berretta, N., Irving, A.J., Seal, A.J., Henley, J.M., Jane, D.E., Watkins, J.C., and Collingridge, G.L. (1993). Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* *363*, 347–350.
- Bassani, S., Valnegri, P., Beretta, F., and Passafaro, M. (2009). The GLUR2 subunit of AMPA receptors: synaptic role. *Neuroscience* *158*, 55–61.
- Bats, C., Groc, L., and Choquet, D. (2007). The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* *53*, 719–734.

- Battista, D., Ferrari, C.C., Gage, F.H., and Pitossi, F.J. (2006). Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor β increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 83–93.
- Baudouin, S.J., Pujol, F., Nicot, A., Kitabgi, P., and Boudin, H. (2006). Dendrite-selective redistribution of the chemokine receptor CXCR4 following agonist stimulation. *Mol. Cell. Neurosci.* *33*, 160–169.
- Baudouin, S.J., Angibaud, J., Loussouarn, G., Bonnamain, V., Matsuura, A., Kinebuchi, M., Naveilhan, P., and Boudin, H. (2008). The signaling adaptor protein CD3zeta is a negative regulator of dendrite development in young neurons. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2444–2456.
- Bauer, T.M., Jiga, L.P., Chuang, J.-J., Randazzo, M., Opelz, G., and Terness, P. (2005). Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *18*, 95–100.
- Bayer, K.U., LeBel, E., McDonald, G.L., O’Leary, H., Schulman, H., and De Koninck, P. (2006). Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 1164–1174.
- Bear, J.E., and Gertler, F.B. (2009). Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J. Cell Sci.* *122*, 1947–1953.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., et al. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* *109*, 509–521.
- Bechmann, I., Peter, S., Beyer, M., Gimsa, U., and Nitsch, R. (2001). Presence of B7--2 (CD86) and lack of B7--1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 1086–1088.
- Beebe, S.J. (1994). The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. *Semin. Cancer Biol.* *5*, 285–294.
- Bellinger, F.P., Madamba, S., and Siggins, G.R. (1993). Interleukin 1 beta inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. *Brain Res.* *628*, 227–234.
- Bellone, C., Lüscher, C., and Mamei, M. (2008). Mechanisms of synaptic depression triggered by metabotropic glutamate receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 2913–2923.
- Belmadani, A., Tran, P.B., Ren, D., Assimacopoulos, S., Grove, E.A., and Miller, R.J. (2005). The Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-1 Regulates the Migration of Sensory Neuron Progenitors. *J. Neurosci.* *25*, 3995–4003.
- Benke, T.A., Lüthi, A., Isaac, J.T., and Collingridge, G.L. (1998). Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* *393*, 793–797.
- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., and Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* *55*, 233–238.
- Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A., Bagetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., et al. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neurosci.* *4*, 702–710.

- Bilousova, T., Dang, H., Xu, W., Gustafson, S., Jin, Y., Wickramasinghe, L., Won, T., Bobarnac, G., Middleton, B., Tian, J., et al. (2012). Major histocompatibility complex class I molecules modulate embryonic neurogenesis and neuronal polarization. *J. Neuroimmunol.* *247*, 1–8.
- Bjugstad, K.B., Flitter, W.D., Garland, W.A., Su, G.C., and Arendash, G.W. (1998). Preventive actions of a synthetic antioxidant in a novel animal model of AIDS dementia. *Brain Res.* *795*, 349–357.
- Bliss, T.V., and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* *361*, 31–39.
- Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* *232*, 331–356.
- Bliss, T.V.P., and Collingridge, G.L. (2013). Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide. *Mol. Brain* *6*, 5.
- Blitzer, R.D., Connor, J.H., Brown, G.P., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R., and Landau, E.M. (1998). Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* *280*, 1940–1942.
- Boche, D., Perry, V.H., and Nicoll, J.A.R. (2013). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *39*, 3–18.
- Boehm, J., Kang, M.-G., Johnson, R.C., Esteban, J., Huganir, R.L., and Malinow, R. (2006). Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* *51*, 213–225.
- Bohatschek, M., Kloss, C.U.A., Pfeffer, K., Bluethmann, H., and Raivich, G. (2004). B7.2 on activated and phagocytic microglia in the facial axotomy model: regulation by interleukin-1 receptor type 1, tumor necrosis factor receptors 1 and 2 and endotoxin. *J. Neuroimmunol.* *156*, 132–145.
- Bolliger, M.F., Martinelli, D.C., and Südhof, T.C. (2011). The cell-adhesion G protein-coupled receptor BAI3 is a high-affinity receptor for C1q-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 2534–2539.
- Bonifacino, J.S., Suzuki, C.K., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A.M., and Klausner, R.D. (1989). Pre-Golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly. *J. Cell Biol.* *109*, 73–83.
- Boomer, J.S., and Green, J.M. (2010). An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a002436.
- Bosch, M., and Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* *22*, 383–388.
- Boulanger, L.M., and Shatz, C.J. (2004). Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 521–531.
- Bour-Jordan, H., Esensten, J.H., Martinez-Llordella, M., Penaranda, C., Stumpf, M., and Bluestone, J.A. (2011). Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunol. Rev.* *241*, 180–205.

- Braida, D., Sacerdote, P., Panerai, A.E., Bianchi, M., Aloisi, A.M., Iosùè, S., and Sala, M. (2004). Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice. *Behav. Brain Res.* *153*, 423–429.
- Bramham, C.R., and Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog. Neurobiol.* *76*, 99–125.
- Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., et al. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* *206*, 1495–1503.
- Bryceson, Y.T., Foster, J.A., Kuppusamy, S.P., Herkenham, M., and Long, E.O. (2005). Expression of a killer cell receptor-like gene in plastic regions of the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* *161*, 177–182.
- Brynskikh, A., Warren, T., Zhu, J., and Kipnis, J. (2008). Adaptive immunity affects learning behavior in mice. *Brain. Behav. Immun.* *22*, 861–869.
- Buchs, P.A., and Muller, D. (1996). Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 8040–8045.
- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* *27*, 111–122.
- Butte, M.J., Peña-Cruz, V., Kim, M.-J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol. Immunol.* *45*, 3567–3572.
- Byram, S.C., Carson, M.J., DeBoy, C.A., Serpe, C.J., Sanders, V.M., and Jones, K.J. (2004). CD4-positive T cell-mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 4333–4339.
- Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., and Wucherpfennig, K.W. (2002). The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* *111*, 967–979.
- Cameron, J.S., Alexopoulou, L., Sloane, J.A., DiBernardo, A.B., Ma, Y., Kosaras, B., Flavell, R., Strittmatter, S.M., Volpe, J., Sidman, R., et al. (2007). Toll-Like Receptor 3 Is a Potent Negative Regulator of Axonal Growth in Mammals. *J. Neurosci.* *27*, 13033–13041.
- Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D.S., Liu, Y., Fong, D.M., Young, D., and During, M.J. (2004). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat. Genet.* *36*, 827–835.
- Caplan, S., Zeliger, S., Wang, L., and Baniyash, M. (1995). Cell-surface-expressed T-cell antigen-receptor zeta chain is associated with the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4768–4772.
- Chabot, S., Williams, G., Hamilton, M., Sutherland, G., and Yong, V.W. (1999). Mechanisms of IL-10 production in human microglia-T cell interaction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 6819–6828.
- Chae, Y.C., Lee, S., Heo, K., Ha, S.H., Jung, Y., Kim, J.H., Ihara, Y., Suh, P.-G., and Ryu, S.H. (2009). Collapsin response mediator protein-2 regulates neurite formation by modulating tubulin GTPase activity. *Cell. Signal.* *21*, 1818–1826.

- Chamak, B., Morandi, V., and Mallat, M. (1994). Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J. Neurosci. Res.* *38*, 221–233.
- Chan, A.C., Desai, D.M., and Weiss, A. (1994). The Role of Protein Tyrosine Kinases and Protein Tyrosine Phosphatases in T Cell Antigen Receptor Signal Transduction. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 555–592.
- Chang, C.-I., Zoghi, B., Liao, J.C., and Kuo, L. (2000). The Involvement of Tyrosine Kinases, Cyclic AMP/Protein Kinase A, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in IL-13-Mediated Arginase I Induction in Macrophages: Its Implications in IL-13-Inhibited Nitric Oxide Production. *J. Immunol.* *165*, 2134–2141.
- Chen, L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 336–347.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 227–242.
- Chen, L.Y., Rex, C.S., Casale, M.S., Gall, C.M., and Lynch, G. (2007). Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 5363–5372.
- Chen, N., Luo, T., and Raymond, L.A. (1999). Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 6844–6854.
- Chen, S.-K., Tvrdik, P., Peden, E., Cho, S., Wu, S., Spangrude, G., and Capecchi, M.R. (2010). Hematopoietic Origin of Pathological Grooming in Hoxb8 Mutant Mice. *Cell* *141*, 775–785.
- Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M.-V., Celador, I.L., Josserand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., Sävman, K., et al. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain. Behav. Immun.* *32*, 70–85.
- Chowdhury, S., Shepherd, J.D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R.S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R.L., and Worley, P.F. (2006). Arc/Arg3.1 Interacts with the Endocytic Machinery to Regulate AMPA Receptor Trafficking. *Neuron* *52*, 445–459.
- Chu, Y., Jin, X., Parada, I., Pesic, A., Stevens, B., Barres, B., and Prince, D.A. (2010). Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 7975–7980.
- Citri, A., Bhattacharyya, S., Ma, C., Morishita, W., Fang, S., Rizo, J., and Malenka, R.C. (2010). Calcium binding to PICK1 is essential for the intracellular retention of AMPA receptors underlying long-term depression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 16437–16452.
- Cohen, H., Ziv, Y., Cardon, M., Kaplan, Z., Matar, M.A., Gidron, Y., Schwartz, M., and Kipnis, J. (2006). Maladaptation to mental stress mitigated by the adaptive immune system via depletion of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ cells. *J. Neurobiol.* *66*, 552–563.
- Cohen-Cory, S., and Fraser, S.E. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature* *378*, 192–196.
- Colledge, M., Snyder, E.M., Crozier, R.A., Soderling, J.A., Jin, Y., Langeberg, L.K., Lu, H., Bear, M.F., and Scott, J.D. (2003). Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* *40*, 595–607.

- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., and McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* *334*, 33–46.
- Collingridge, G.L., Isaac, J.T.R., and Wang, Y.T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 952–962.
- Collins, M.O., Husi, H., Yu, L., Brandon, J.M., Anderson, C.N.G., Blackstock, W.P., Choudhary, J.S., and Grant, S.G.N. (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J. Neurochem.* *97*, 16–23.
- Colton, C.A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* *4*, 399–418.
- Conde, C., Arias, C., Robin, M., Li, A., Saito, M., Chuang, J.-Z., Nairn, A.C., Sung, C.-H., and Cáceres, A. (2010). Evidence for the Involvement of Lfc and Tctex-1 in Axon Formation. *J. Neurosci.* *30*, 6793–6800.
- Conner, J.M., Franks, K.M., Titterness, A.K., Russell, K., Merrill, D.A., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., and Tuszynski, M.H. (2009). NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 10883–10889.
- Corriveau, R.A., Huh, G.S., and Shatz, C.J. (1998). Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* *21*, 505–520.
- Coull, J.A.M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* *438*, 1017–1021.
- Coultrap, S.J., and Bayer, K.U. (2012). CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci.* *35*, 607–618.
- Coultrap, S.J., Buard, I., Kulbe, J.R., Dell'Acqua, M.L., and Bayer, K.U. (2010). CaMKII Autonomy Is Substrate-dependent and Further Stimulated by Ca²⁺/Calmodulin. *J. Biol. Chem.* *285*, 17930–17937.
- Craig, A.M., Blackstone, C.D., Haganir, R.L., and Banker, G. (1993). The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: Postsynaptic clustering of AMPA selective subunits. *Neuron* *10*, 1055–1068.
- Cross, A.H., and Ku, G. (2000). Astrocytes and central nervous system endothelial cells do not express B7-1 (CD80) or B7-2 (CD86) immunoreactivity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* *110*, 76–82.
- Croxford, J.L., O'Neill, J.K., Ali, R.R., Browne, K., Byrnes, A.P., Dallman, M.J., Wood, M.J.A., Feldmann, M., and Baker, D. (1998). Local gene therapy with CTLA4-immunoglobulin fusion protein in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* *28*, 3904–3916.
- Cunningham, C.L., Martínez-Cerdeño, V., and Noctor, S.C. (2013). Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 4216–4233.
- D'Oro, U., Munitic, I., Chacko, G., Karpova, T., McNally, J., and Ashwell, J.D. (2002). Regulation of Constitutive TCR Internalization by the ζ -Chain. *J. Immunol.* *169*, 6269–6278.

- Dakoji, S., Tomita, S., Karimzadegan, S., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. (2003). Interaction of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins with multiple membrane associated guanylate kinases. *Neuropharmacology* 45, 849–856.
- Dalmau, I., Finsen, B., Tønder, N., Zimmer, J., González, B., and Castellano, B. (1997). Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 377, 70–84.
- Dalmau, I., Finsen, B., Zimmer, J., González, B., and Castellano, B. (1998). Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 8, 458–474.
- Dangond, F., Windhagen, A., Groves, C.J., and Hafler, D.A. (1997). Constitutive expression of costimulatory molecules by human microglia and its relevance to CNS autoimmunity. *J. Neuroimmunol.* 76, 132–138.
- Datwani, A., McConnell, M.J., Kanold, P.O., Micheva, K.D., Busse, B., Shamloo, M., Smith, S.J., and Shatz, C.J. (2009). Classical MHC I molecules regulate retinogeniculate refinement and limit ocular dominance plasticity. *Neuron* 64, 463–470.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758.
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2004). Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J. Neurobiol.* 58, 18–33.
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6, 204.
- Dehmelt, L., Smart, F.M., Ozer, R.S., and Halpain, S. (2003). The Role of Microtubule-Associated Protein 2c in the Reorganization of Microtubules and Lamellipodia during Neurite Initiation. *J. Neurosci.* 23, 9479–9490.
- Delint-Ramirez, I., Fernández, E., Bayés, A., Kicsi, E., Komiyama, N.H., and Grant, S.G.N. (2010). In Vivo Composition of NMDA Receptor Signaling Complexes Differs between Membrane Subdomains and Is Modulated by PSD-95 And PSD-93. *J. Neurosci.* 30, 8162–8170.
- Deng, K., He, H., Qiu, J., Lorber, B., Bryson, J.B., and Filbin, M.T. (2009). Increased synthesis of spermidine as a result of upregulation of arginase I promotes axonal regeneration in culture and in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 9545–9552.
- Dent, E.W., and Gertler, F.B. (2003). Cytoskeletal Dynamics and Transport in Growth Cone Motility and Axon Guidance. *Neuron* 40, 209–227.
- Dent, E.W., Kwiatkowski, A.V., Mebane, L.M., Philippar, U., Barzik, M., Rubinson, D.A., Gupton, S., Van Veen, J.E., Furman, C., Zhang, J., et al. (2007). Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat. Cell Biol.* 9, 1347–1359.
- Dent, E.W., Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2011). The Growth Cone Cytoskeleton in Axon Outgrowth and Guidance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Derecki, N.C., Cardani, A.N., Yang, C.H., Quinlivan, K.M., Crihfield, A., Lynch, K.R., and Kipnis, J. (2010). Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J. Exp. Med.* 207, 1067–1080.

- Derecki, N.C., Quinlivan, K.M., and Kipnis, J. (2011). Alternatively activated myeloid (M2) cells enhance cognitive function in immune compromised mice. *Brain. Behav. Immun.* 25, 379–385.
- Derecki, N.C., Cronk, J.C., Lu, Z., Xu, E., Abbott, S.B.G., Guyenet, P.G., and Kipnis, J. (2012a). Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature* 484, 105–109.
- Derecki, N.C., Cronk, J.C., and Kipnis, J. (2012b). The role of microglia in brain maintenance: implications for Rett syndrome. *Trends Immunol.*
- Derkach, V., Barria, A., and Soderling, T.R. (1999). Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3269–3274.
- Derkach, V.A., Oh, M.C., Guire, E.S., and Soderling, T.R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 101–113.
- Deuel, T.A.S., Liu, J.S., Corbo, J.C., Yoo, S.-Y., Rorke-Adams, L.B., and Walsh, C.A. (2006). Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron* 49, 41–53.
- Dietrich, J., Kastrup, J., Lauritsen, J.P., Menné, C., von Bülow, F., and Geisler, C. (1999). TCRzeta is transported to and retained in the Golgi apparatus independently of other TCR chains: implications for TCR assembly. *Eur. J. Immunol.* 29, 1719–1728.
- Dodson, L.F., Boomer, J.S., Deppong, C.M., Shah, D.D., Sim, J., Bricker, T.L., Russell, J.H., and Green, J.M. (2009). Targeted knock-in mice expressing mutations of CD28 reveal an essential pathway for costimulation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3710–3721.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8, 1454–1468.
- Dudek, S.M., and Bear, M.F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4363–4367.
- Duncan, D.S., and Miller, S.D. (2011). CNS expression of B7-H1 regulates pro-inflammatory cytokine production and alters severity of Theiler's virus-induced demyelinating disease. *PLoS One* 6, e18548.
- Egea, J., and Klein, R. (2007). Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol.* 17, 230–238.
- Ehlers, M.D., Tingley, W.G., and Huganir, R.L. (1995). Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science* 269, 1734–1737.
- Elgersma, Y., Fedorov, N.B., Ikonen, S., Choi, E.S., Elgersma, M., Carvalho, O.M., Giese, K.P., and Silva, A.J. (2002). Inhibitory autophosphorylation of CaMKII controls PSD association, plasticity, and learning. *Neuron* 36, 493–505.
- Elias, G.M., and Nicoll, R.A. (2007). Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends Cell Biol.* 17, 343–352.
- Von Engelhardt, J., Doganci, B., Jensen, V., Hvalby, Ø., Göngrich, C., Taylor, A., Barkus, C., Sanderson, D.J., Rawlins, J.N.P., Seeburg, P.H., et al. (2008). Contribution of Hippocampal and Extra-Hippocampal NR2B-Containing NMDA Receptors to Performance on Spatial Learning Tasks. *Neuron* 60, 846–860.

- Erondu, N.E., and Kennedy, M.B. (1985). Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *5*, 3270–3277.
- Erreger, K., Dravid, S.M., Banke, T.G., Wyllie, D.J.A., and Traynelis, S.F. (2005). Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J. Physiol.* *563*, 345–358.
- Errington, M.L., Galley, P.T., and Bliss, T.V.P. (2003). Long-term potentiation in the dentate gyrus of the anaesthetized rat is accompanied by an increase in extracellular glutamate: real-time measurements using a novel dialysis electrode. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *358*, 675–687.
- Esch, F., Lin, K.I., Hills, A., Zaman, K., Baraban, J.M., Chatterjee, S., Rubin, L., Ash, D.E., and Ratan, R.R. (1998). Purification of a multipotent antideath activity from bovine liver and its identification as arginase: nitric oxide-independent inhibition of neuronal apoptosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 4083–4095.
- Estévez, A.G., Sahawneh, M.A., Lange, P.S., Bae, N., Egea, M., and Ratan, R.R. (2006). Arginase 1 regulation of nitric oxide production is key to survival of trophic factor-deprived motor neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 8512–8516.
- Faas, G.C., Raghavachari, S., Lisman, J.E., and Mody, I. (2011). Calmodulin as a direct detector of Ca²⁺ signals. *Nat. Neurosci.* *14*, 301–304.
- Fagni, L., Chavis, P., Ango, F., and Bockaert, J. (2000). Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci.* *23*, 80–88.
- Fang, W.-Q., Chen, W.-W., Fu, A.K.Y., and Ip, N.Y. (2013). Axin Directs the Amplification and Differentiation of Intermediate Progenitors in the Developing Cerebral Cortex. *Neuron* *79*, 665–679.
- Fass, J.N., and Odde, D.J. (2003). Tensile Force-Dependent Neurite Elicitation via Anti-β1 Integrin Antibody-Coated Magnetic Beads. *Biophys. J.* *85*, 623–636.
- Feldmeyer, D., Kask, K., Brusa, R., Kornau, H., Kolhekar, R., Rozov, A., Burnashev, N., Jensen, V., Hvalby, Ø., Sprengel, R., et al. (1999). Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site–unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat. Neurosci.* *2*, 57–64.
- Feng, B., Raghavachari, S., and Lisman, J. (2011). Quantitative estimates of the cytoplasmic, PSD, and NMDAR-bound pools of CaMKII in dendritic spines. *Brain Res.* *1419*, 46–52.
- Finger, E.B., and Bluestone, J.A. (2002). When ligand becomes receptor--tolerance via B7 signaling on DCs. *Nat. Immunol.* *3*, 1056–1057.
- Finnie, P.S.B., and Nader, K. (2012). The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *36*, 1667–1707.
- Fiore, M., Probert, L., Kollias, G., Akassoglou, K., Alleva, E., and Aloe, L. (1996). Neurobehavioral alterations in developing transgenic mice expressing TNF-alpha in the brain. *Brain. Behav. Immun.* *10*, 126–138.
- Flynn, K.C., Hellal, F., Neukirchen, D., Jacob, S., Tahirovic, S., Dupraz, S., Stern, S., Garvalov, B.K., Gurniak, C., Shaw, A.E., et al. (2012). ADF/Cofilin-Mediated Actin Retrograde Flow Directs Neurite Formation in the Developing Brain. *Neuron* *76*, 1091–1107.

- Fontainhas, A.M., Wang, M., Liang, K.J., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., Fariss, R.N., Li, W., and Wong, W.T. (2011). Microglial Morphology and Dynamic Behavior Is Regulated by Ionotropic Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission. *PLoS ONE* 6, e15973.
- Foster, K.A., McLaughlin, N., Edbauer, D., Phillips, M., Bolton, A., Constantine-Paton, M., and Sheng, M. (2010). Distinct Roles of NR2A and NR2B Cytoplasmic Tails in Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 30, 2676–2685.
- Fourgeaud, L., and Boulanger, L.M. (2007). Synapse remodeling, compliments of the complement system. *Cell* 131, 1034–1036.
- Fourgeaud, L., Davenport, C.M., Tyler, C.M., Cheng, T.T., Spencer, M.B., and Boulanger, L.M. (2010). MHC class I modulates NMDA receptor function and AMPA receptor trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22278–22283.
- Franco, R., Peter, M.E., Choi, M.S., Malissen, B., Sancho, J., and Terhorst, C. (1994). Characterization of the GTP/GDP binding site in the murine CD3-zeta polypeptide chain. *Immunol. Lett.* 43, 167–175.
- Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Ng, J.W., Restivo, V.A., Jr, Lombard, L.A., Gray, G.S., and Nadler, L.M. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262, 909–911.
- Frey, U., Krug, M., Reymann, K.G., and Matthies, H. (1988). Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.* 452, 57–65.
- Fujii, M., Inoguchi, T., Batchuluun, B., Sugiyama, N., Kobayashi, K., Sonoda, N., and Takayanagi, R. (2013). CTLA-4Ig immunotherapy of obesity-induced insulin resistance by manipulation of macrophage polarization in adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., and Inokuchi, K. (2003). Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38, 447–460.
- Gadani, S.P., Cronk, J.C., Norris, G.T., and Kipnis, J. (2012). IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 4213–4219.
- Galjart, N. (2005). CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 487–498.
- Galpern, W.R., Burns, L.H., Deacon, T.W., Dinsmore, J., and Isacson, O. (1996). Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. *Exp. Neurol.* 140, 1–13.
- Galván, E.J., Cosgrove, K.E., and Barrionuevo, G. (2011). Multiple forms of long-term synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses on interneurons. *Neuropharmacology* 60, 740–747.
- Gardoni, F., Schrama, L.H., van Dalen, J.J.W., Gispen, W.H., Cattabeni, F., and Di Luca, M. (1999). α CaMKII binding to the C-terminal tail of NMDA receptor subunit NR2A and its modulation by autophosphorylation. *FEBS Lett.* 456, 394–398.
- Gardoni, F., Mauceri, D., Malinverno, M., Polli, F., Costa, C., Tozzi, A., Siliquini, S., Picconi, B., Cattabeni, F., Calabresi, P., et al. (2009). Decreased NR2B Subunit Synaptic Levels Cause Impaired Long-Term Potentiation But Not Long-Term Depression. *J. Neurosci.* 29, 669–677.

- Gärtner, A., Fornasiero, E.F., Munck, S., Vennekens, K., Seuntjens, E., Huttner, W.B., Valtorta, F., and Dotti, C.G. (2012a). N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. *EMBO J.* *31*, 1893–1903.
- Gärtner, A., Fornasiero, E.F., and Dotti, C.G. (2012b). N-cadherin: a new player in neuronal polarity. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 2223–2224.
- Ge, X., Frank, C.L., Calderon de Anda, F., and Tsai, L.-H. (2010). Hook3 Interacts with PCM1 to Regulate Pericentriolar Material Assembly and the Timing of Neurogenesis. *Neuron* *65*, 191–203.
- Geinisman, Y., deToledo-Morrell, L., and Morrell, F. (1991). Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. *Brain Res.* *566*, 77–88.
- Geraldo, S., and Gordon-Weeks, P.R. (2009). Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J. Cell Sci.* *122*, 3595–3604.
- Gerges, N.Z., Backos, D.S., Rupasinghe, C.N., Spaller, M.R., and Esteban, J.A. (2006). Dual role of the exocyst in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane. *EMBO J.* *25*, 1623–1634.
- Giger, R.J., Hollis, E.R., 2nd, and Tuszynski, M.H. (2010). Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001867.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* *330*, 841–845.
- Glynn, M.W., Elmer, B.M., Garay, P.A., Liu, X.-B., Needleman, L.A., El-Sabeawy, F., and McAllister, A.K. (2011). MHC1 negatively regulates synapse density during the establishment of cortical connections. *Nat. Neurosci.* *14*, 442–451.
- Goddard, C.A., Butts, D.A., and Shatz, C.J. (2007). Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 6828–6833.
- Gomes, C., Ferreira, R., George, J., Sanches, R., Rodrigues, D.I., Gonçalves, N., and Cunha, R.A. (2013). Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *J. Neuroinflammation* *10*, 16.
- Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalzstein, Y., Ben-Hur, T., Levy-Lahad, E., and Yirmiya, R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology* *32*, 1106–1115.
- Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Licht, T., Segal, M., and Yirmiya, R. (2009). Environmental enrichment restores memory functioning in mice with impaired IL-1 signaling via reinstatement of long-term potentiation and spine size enlargement. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 3395–3403.
- Grabham, P.W., Seale, G.E., Bennecib, M., Goldberg, D.J., and Vallee, R.B. (2007). Cytoplasmic dynein and LIS1 are required for microtubule advance during growth cone remodeling and fast axonal outgrowth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 5823–5834.

- Gray, E.E., Fink, A.E., Sariñana, J., Vissel, B., and O'Dell, T.J. (2007). Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region does not require insertion and activation of GluR2-lacking AMPA receptors. *J. Neurophysiol.* *98*, 2488–2492.
- Greenstein, Y.J., Pavlides, C., and Winson, J. (1988). Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity. *Brain Res.* *438*, 331–334.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 Family Revisited. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 515–548.
- Groc, L., Heine, M., Cognet, L., Brickley, K., Stephenson, F.A., Lounis, B., and Choquet, D. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* *7*, 695–696.
- Groc, L., Heine, M., Cousins, S.L., Stephenson, F.A., Lounis, B., Cognet, L., and Choquet, D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 18769–18774.
- Groc, L., Choquet, D., Stephenson, F.A., Verrier, D., Manzoni, O.J., and Chavis, P. (2007). NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 10165–10175.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* *3*, 1097–1101.
- Gross, J.A., Callas, E., and Allison, J.P. (1992). Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *149*, 380–388.
- Guillot, C., Ménoret, S., Guillonneau, C., Braudeau, C., Castro, M.G., Lowenstein, P., and Anegón, I. (2003). Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* *101*, 3325–3333.
- Al-Hallaq, R.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., and Wenthold, R.J. (2007). NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 8334–8343.
- Halt, A.R., Dallapiazza, R.F., Zhou, Y., Stein, I.S., Qian, H., Juntti, S., Wojcik, S., Brose, N., Silva, A.J., and Hell, J.W. (2012). CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. *EMBO J.* *31*, 1203–1216.
- Hammond, T., Lee, S., Watson, M.W., Flexman, J.P., Cheng, W., Fernandez, S., and Price, P. (2010). Toll-like receptor (TLR) expression on CD4+ and CD8+ T-cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Cell. Immunol.* *264*, 150–155.
- Han, Y., He, T., Huang, D.R., Pardo, C.A., and Ransohoff, R.M. (2001). TNF-alpha mediates SDF-1 alpha-induced NF-kappa B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes. *J. Clin. Invest.* *108*, 425–435.
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J.I.-T., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., et al. (2005). Phosphorylation of Neurogenin2 Specifies the Migration Properties and the Dendritic Morphology of Pyramidal Neurons in the Neocortex. *Neuron* *48*, 45–62.

- Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* *10*, 1387–1394.
- Hanke, M.L., and Kielian, T. (2011). Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin. Sci.* *121*, 367–387.
- Hanley, J.G. (2008). PICK1: a multi-talented modulator of AMPA receptor trafficking. *Pharmacol. Ther.* *118*, 152–160.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* *5*, 405–414.
- Harris, E.W., and Cotman, C.W. (1986). Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci. Lett.* *70*, 132–137.
- Harris, K.M., Fiala, J.C., and Ostroff, L. (2003). Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *358*, 745–748.
- Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K., Streit, W.J., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Thompson, D.A., et al. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 10896–10901.
- Hatanaka, Y., and Murakami, F. (2002). In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.* *454*, 1–14.
- Hathcock, K.S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., and Hodes, R.J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* *180*, 631–640.
- Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., and Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* *287*, 2262–2267.
- Hein, A.M., Stutzman, D.L., Bland, S.T., Barrientos, R.M., Watkins, L.R., Rudy, J.W., and Maier, S.F. (2007). Prostaglandins are necessary and sufficient to induce contextual fear learning impairments after interleukin-1 beta injections into the dorsal hippocampus. *Neuroscience* *150*, 754–763.
- Hein, A.M., Stasko, M.R., Matousek, S.B., Scott-McKean, J.J., Maier, S.F., Olschowka, J.A., Costa, A.C.S., and O'Banion, M.K. (2010). Sustained hippocampal IL-1beta overexpression impairs contextual and spatial memory in transgenic mice. *Brain. Behav. Immun.* *24*, 243–253.
- Heldt, S.A., Stanek, L., Chhatwal, J.P., and Ressler, K.J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol. Psychiatry* *12*, 656–670.
- Heyser, C.J., Masliah, E., Samimi, A., Campbell, I.L., and Gold, L.H. (1997). Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1500–1505.
- Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010). Molecular Motors in Neurons: Transport Mechanisms and Roles in Brain Function, Development, and Disease. *Neuron* *68*, 610–638.

- Hirsch, E.C., Vyas, S., and Hunot, S. (2012). Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* *18 Suppl 1*, S210–212.
- Hoe, H.-S., Lee, K.J., Carney, R.S.E., Lee, J., Markova, A., Lee, J.-Y., Howell, B.W., Hyman, B.T., Pak, D.T.S., Bu, G., et al. (2009). Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 7459–7473.
- Horch, H.W., and Katz, L.C. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat. Neurosci.* *5*, 1177–1184.
- Hotulainen, P., and Hoogenraad, C.C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* *189*, 619–629.
- Howard, M.A., Elias, G.M., Elias, L.A.B., Swat, W., and Nicoll, R.A. (2010). The role of SAP97 in synaptic glutamate receptor dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3805–3810.
- Hsia, A.Y., Salin, P.A., Castillo, P.E., Aiba, A., Abeliovich, A., Tonegawa, S., and Nicoll, R.A. (1995). Evidence against a role for metabotropic glutamate receptors in mossy fiber LTP: the use of mutant mice and pharmacological antagonists. *Neuropharmacology* *34*, 1567–1572.
- Hua, J.Y., and Smith, S.J. (2004). Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat. Neurosci.* *7*, 327–332.
- Huang, Y.Y., Li, X.C., and Kandel, E.R. (1994). cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* *79*, 69–79.
- Hudmon, A., and Schulman, H. (2002). NEURONAL CA²⁺/CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE II: The Role of Structure and Autoregulation in Cellular Function. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 473–510.
- Huettner, J.E. (2003). Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* *70*, 387–407.
- Huffaker, T.K., Boss, B.D., Morgan, A.S., Neff, N.T., Strecker, R.E., Spence, M.S., and Miao, R. (1989). Xenografting of fetal pig ventral mesencephalon corrects motor asymmetry in the rat model of Parkinson's disease. *Exp. Brain Res. Exp. Hirnforsch. Expérimentation Cérébrale* *77*, 329–336.
- Huh, G.S., Boulanger, L.M., Du, H., Riquelme, P.A., Brotz, T.M., and Shatz, C.J. (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* *290*, 2155–2159.
- Hunt, D.L., and Castillo, P.E. (2012). Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Curr. Opin. Neurobiol.* *22*, 496–508.
- Iglesias, B.M., Cerase, J., Ceracchini, C., Levi, G., and Aloisi, F. (1997). Analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands in cultured mouse microglia: upregulation by interferon- γ and lipopolysaccharide and downregulation by interleukin-10, prostaglandin E2 and cyclic AMP-elevating agents. *J. Neuroimmunol.* *72*, 83–93.
- Iijima, T., Miura, E., Watanabe, M., and Yuzaki, M. (2010). Distinct expression of C1q-like family mRNAs in mouse brain and biochemical characterization of their encoded proteins. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 1606–1615.

- Imitola, J., Comabella, M., Chandraker, A.K., Dangond, F., Sayegh, M.H., Snyder, E.Y., and Khoury, S.J. (2004). Neural stem/progenitor cells express costimulatory molecules that are differentially regulated by inflammatory and apoptotic stimuli. *Am. J. Pathol.* *164*, 1615–1625.
- Impey, S., Mark, M., Villacres, E.C., Poser, S., Chavkin, C., and Storm, D.R. (1996). Induction of CRE-Mediated Gene Expression by Stimuli That Generate Long-Lasting LTP in Area CA1 of the Hippocampus. *Neuron* *16*, 973–982.
- Isaac, J.T.R. (2003). Postsynaptic silent synapses: evidence and mechanisms. *Neuropharmacology* *45*, 450–460.
- Isaac, J.T., Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1995). Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* *15*, 427–434.
- Ishikawa, R., and Kohama, K. (2007). Actin-Binding Proteins in Nerve Cell Growth Cones. *J. Pharmacol. Sci.* *105*, 6–11.
- Ismailov, I., Kalikulov, D., Inoue, T., and Friedlander, M.J. (2004). The kinetic profile of intracellular calcium predicts long-term potentiation and long-term depression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 9847–9861.
- Iwashima, M., Irving, B.A., van Oers, N.S., Chan, A.C., and Weiss, A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* *263*, 1136–1139.
- Jama, A.M., Fenton, J., Robertson, S.D., and Török, K. (2009). Time-dependent autoinactivation of phospho-Thr286-alphaCa²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* *284*, 28146–28155.
- Janardhan, S.V., Praveen, K., Marks, R., and Gajewski, T.F. (2011). Evidence implicating the Ras pathway in multiple CD28 costimulatory functions in CD4⁺ T cells. *PLoS One* *6*, e24931.
- Jia, Z., Agopyan, N., Miu, P., Xiong, Z., Henderson, J., Gerlai, R., Taverna, F.A., Velumian, A., MacDonald, J., Carlen, P., et al. (1996). Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* *17*, 945–956.
- Jonas, P., Major, G., and Sakmann, B. (1993). Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J. Physiol.* *472*, 615–663.
- Jonas, R.A., Yuan, T.-F., Liang, Y.-X., Jonas, J.B., Tay, D.K.C., and Ellis-Behnke, R.G. (2012). The spider effect: morphological and orienting classification of microglia in response to stimuli in vivo. *PLoS One* *7*, e30763.
- Kaneko, M., Stellwagen, D., Malenka, R.C., and Stryker, M.P. (2008). Tumor necrosis factor- α mediates one component of competitive, experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Neuron* *58*, 673–680.
- Kano, M., Hashimoto, K., and Tabata, T. (2008). Type-1 metabotropic glutamate receptor in cerebellar Purkinje cells: a key molecule responsible for long-term depression, endocannabinoid signalling and synapse elimination. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *363*, 2173–2186.
- Kato, A.S., Siuda, E.R., Nisenbaum, E.S., and Bredt, D.S. (2008). AMPA receptor subunit-specific regulation by a distinct family of type II TARPs. *Neuron* *59*, 986–996.

- Kaul, D., Habel, P., Derkow, K., Krüger, C., Franzoni, E., Wulczyn, F.G., Bereswill, S., Nitsch, R., Schott, E., Veh, R., et al. (2012). Expression of Toll-Like Receptors in the Developing Brain. *PLoS ONE* 7, e37767.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin. Immunol.* 19, 24–32.
- Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T.A., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249, 556–560.
- Kelleher, R.J., 3rd, Govindarajan, A., and Tonegawa, S. (2004). Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44, 59–73.
- Kelly, A., Conroy, S., and Lynch, M.A. (1998). Evidence that nerve growth factor plays a role in long-term potentiation in the rat dentate gyrus. *Neuropharmacology* 37, 561–570.
- Kemp, A., and Manahan-Vaughan, D. (2007). Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends Neurosci.* 30, 111–118.
- Kessels, H.W., and Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61, 340–350.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- Kidd, F.L., and Isaac, J.T.R. (1999). Developmental and activity- dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. *Nature* 400, 569–573.
- Kigerl, K.A., Gensel, J.C., Ankeny, D.P., Alexander, J.K., Donnelly, D.J., and Popovich, P.G. (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 13435–13444.
- Kiialainen, A., Hovanes, K., Paloneva, J., Kopra, O., and Peltonen, L. (2005). Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS. *Neurobiol. Dis.* 18, 314–322.
- Kim, C.H., and Lisman, J.E. (1999). A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 4314–4324.
- Kim, H.G., and Oh, M.S. (2013). Memory-enhancing effect of Mori Fructus via induction of nerve growth factor. *Br. J. Nutr.* 110, 86–94.
- Kim, J.H., Liao, D., Lau, L.-F., and Huganir, R.L. (1998). SynGAP: a Synaptic RasGAP that Associates with the PSD-95/SAP90 Protein Family. *Neuron* 20, 683–691.
- Kipnis, J., Cohen, H., Cardon, M., Ziv, Y., and Schwartz, M. (2004). T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8180–8185.
- Kipnis, J., Gadani, S., and Derecki, N.C. (2012). Pro-cognitive properties of T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 663–669.
- Klein, R. (2009). Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nat. Neurosci.* 12, 15–20.

- Klintworth, H., Garden, G., and Xia, Z. (2009). Rotenone and paraquat do not directly activate microglia or induce inflammatory cytokine release. *Neurosci. Lett.* *462*, 1–5.
- Kochi, S., Takanaga, H., Matsuo, H., Naito, M., Tsuruo, T., and Sawada, Y. (1999). Effect of cyclosporin A or tacrolimus on the function of blood–brain barrier cells. *Eur. J. Pharmacol.* *372*, 287–295.
- Koester, M.P., Müller, O., and Pollerberg, G.E. (2007). Adenomatous polyposis coli is differentially distributed in growth cones and modulates their steering. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 12590–12600.
- Kohman, R.A., DeYoung, E.K., Bhattacharya, T.K., Peterson, L.N., and Rhodes, J.S. (2012). Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain. Behav. Immun.* *26*, 803–810.
- Köhr, G. (2007). NMDA receptor mobility: cultures versus acute brain slices or neonatal versus mature synapses? *J. Physiol.* *584*, 367.
- Köhr, G., Jensen, V., Koester, H.J., Mihaljevic, A.L.A., Utvik, J.K., Kvello, A., Ottersen, O.P., Seeburg, P.H., Sprengel, R., and Hvalby, Ø. (2003). Intracellular Domains of NMDA Receptor Subtypes Are Determinants for Long-Term Potentiation Induction. *J. Neurosci.* *23*, 10791–10799.
- Korobova, F., and Svitkina, T. (2008). Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1561–1574.
- Kotilinek, L.A., Westerman, M.A., Wang, Q., Panizzon, K., Lim, G.P., Simonyi, A., Lesne, S., Falinska, A., Younkin, L.H., Younkin, S.G., et al. (2008). Cyclooxygenase-2 inhibition improves amyloid-beta-mediated suppression of memory and synaptic plasticity. *Brain J. Neurol.* *131*, 651–664.
- Krangel, M.S., Orr, H.T., and Strominger, J.L. (1979). Assembly and maturation of HLA-A and HLA-B antigens in vivo. *Cell* *18*, 979–991.
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Manasian, Y., Ivanov, A., Tyzio, R., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Clapham, D.E., and Medina, I. (2003). The NMDA Receptor Is Coupled to the ERK Pathway by a Direct Interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* *40*, 775–784.
- Kremer, K.N., Humphreys, T.D., Kumar, A., Qian, N.-X., and Hedin, K.E. (2003). Distinct Role of ZAP-70 and Src Homology 2 Domain-Containing Leukocyte Protein of 76 kDa in the Prolonged Activation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase by the Stromal Cell-Derived Factor-1 α /CXCL12 Chemokine. *J. Immunol.* *171*, 360–367.
- Kristensen, A.S., Jenkins, M.A., Banke, T.G., Schousboe, A., Makino, Y., Johnson, R.C., Huganir, R., and Traynelis, S.F. (2011). Mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. *Nat. Neurosci.* *14*, 727–735.
- Krucker, T., Siggins, G.R., and Halpain, S. (2000). Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 6856–6861.
- Kumar, A., Humphreys, T.D., Kremer, K.N., Bramati, P.S., Bradfield, L., Edgar, C.E., and Hedin, K.E. (2006). CXCR4 Physically Associates with the T Cell Receptor to Signal in T Cells. *Immunity* *25*, 213–224.
- Kwiatkowski, A.V., Gertler, F.B., and Loureiro, J.J. (2003). Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Trends Cell Biol.* *13*, 386–392.

Kwiatkowski, A.V., Rubinson, D.A., Dent, E.W., Edward van Veen, J., Leslie, J.D., Zhang, J., Mebane, L.M., Philippar, U., Pinheiro, E.M., Burds, A.A., et al. (2007). Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex. *Neuron* 56, 441–455.

Labelle, C., and Leclerc, N. (2000). Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Dev. Brain Res.* 123, 1–11.

Lanier, L.L. (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 308–314.

Lanier, L.L., Yu, G., and Phillips, J.H. (1989). Co-association of CD3 ζ with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342, 803–805.

Lanzavecchia, A., Lezzi, G., and Viola, A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 96, 1–4.

Lathia, J.D., Okun, E., Tang, S.-C., Griffioen, K., Cheng, A., Mughal, M.R., Laryea, G., Selvaraj, P.K., French-Constant, C., Magnus, T., et al. (2008). Toll-like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 13978–13984.

Lee, H.-K. (2006). Synaptic plasticity and phosphorylation. *Pharmacol. Ther.* 112, 810–832.

Lee, H., Engel, U., Rusch, J., Scherrer, S., Sheard, K., and Van Vactor, D. (2004). The microtubule plus end tracking protein Orbit/MAST/CLASP acts downstream of the tyrosine kinase Abl in mediating axon guidance. *Neuron* 42, 913–926.

Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., and Huganir, R.L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405, 955–959.

Lee, H.-K., Takamiya, K., Han, J.-S., Man, H., Kim, C.-H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R.S., et al. (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112, 631–643.

Lee, H.-K., Takamiya, K., He, K., Song, L., and Huganir, R.L. (2010a). Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus. *J. Neurophysiol.* 103, 479–489.

Lee, S.H., Liu, L., Wang, Y.T., and Sheng, M. (2002). Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* 36, 661–674.

Lee, Y.-J., Han, S.B., Nam, S.-Y., Oh, K.-W., and Hong, J.T. (2010b). Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1539–1556.

Leonard, A.S., Lim, I.A., Hemsworth, D.E., Horne, M.C., and Hell, J.W. (1999). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3239–3244.

Letellier, M., Willson, M.L., Gautheron, V., Mariani, J., and Lohof, A.M. (2008). Normal adult climbing fiber monoinnervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking MHC class I molecules. *Dev. Neurobiol.* 68, 997–1006.

Li, R., and Gundersen, G.G. (2008). Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 860–873.

- Li, A.J., Katafuchi, T., Oda, S., Hori, T., and Oomura, Y. (1997). Interleukin-6 inhibits long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 748, 30–38.
- Li, B., Otsu, Y., Murphy, T.H., and Raymond, L.A. (2003). Developmental Decrease in NMDA Receptor Desensitization Associated with Shift to Synapse and Interaction with Postsynaptic Density-95. *J. Neurosci.* 23, 11244–11254.
- Li, L.-Y., Li, J.-L., Zhang, H.-M., Yang, W.-M., Wang, K., Fang, Y., and Wang, Y. (2013). TGF β 1 treatment reduces hippocampal damage, spontaneous recurrent seizures, and learning memory deficits in pilocarpine-treated rats. *J. Mol. Neurosci.* MN 50, 109–123.
- Li, Y., Luikart, B.W., Birnbaum, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Kernie, S.G., Bassel-Duby, R., and Parada, L.F. (2008). TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* 59, 399–412.
- Liao, D., Hessler, N.A., and Malinow, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375, 400–404.
- Licht, T., Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Zubedat, S., Eavri, R., Segal, M., Yirmiya, R., and Keshet, E. (2011). Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5081–5086.
- 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, 879–887.
- Ling, D.S.F., Benardo, L.S., Serrano, P.A., Blace, N., Kelly, M.T., Crary, J.F., and Sacktor, T.C. (2002). Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat. Neurosci.* 5, 295–296.
- Linsley, P.S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K.L., and Mittler, R.S. (1996). Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 4, 535–543.
- Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175–190.
- Lisman, J., Yasuda, R., and Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 169–182.
- Liu, B.P., Cafferty, W.B.J., Budel, S.O., and Strittmatter, S.M. (2006a). Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1593–1610.
- Liu, C.P., Ueda, R., She, J., Sancho, J., Wang, B., Weddell, G., Loring, J., Kurahara, C., Dudley, E.C., and Hayday, A. (1993). Abnormal T cell development in CD3-zeta-/- mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine. *EMBO J.* 12, 4863–4875.
- Liu, C.P., Lin, W.J., Huang, M., Kappler, J.W., and Marrack, P. (1997). Development and function of T cells in T cell antigen receptor/CD3 zeta knockout mice reconstituted with Fc epsilon RI gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 616–621.
- Liu, D., Yang, Q., and Li, S. (2013). Activation of extrasynaptic NMDA receptors induces LTD in rat hippocampal CA1 neurons. *Brain Res. Bull.* 93, 10–16.

- Liu, J., Zhang, Z., Li, J.-T., Zhu, Y.-H., Zhou, H.-L., Liu, S., and Wang, T.-H. (2009). Effects of NT-4 gene modified fibroblasts transplanted into AD rats. *Neurosci. Lett.* *466*, 1–5.
- Liu, L., Wong, T.P., Pozza, M.F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y.P., and Wang, Y.T. (2004a). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* *304*, 1021–1024.
- Liu, X.-B., Murray, K.D., and Jones, E.G. (2004b). Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 8885–8895.
- Liu, Y., Teige, I., Birnir, B., and Issazadeh-Navikas, S. (2006b). Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat. Med.* *12*, 518–525.
- Love, P.E., Shores, E.W., Johnson, M.D., Tremblay, M.L., Lee, E.J., Grinberg, A., Huang, S.P., Singer, A., and Westphal, H. (1993). T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* *261*, 918–921.
- Lowery, L.A., and Vactor, D.V. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 332–343.
- Lu, Y., Allen, M., Halt, A.R., Weisenhaus, M., Dallapiazza, R.F., Hall, D.D., Usachev, Y.M., McKnight, G.S., and Hell, J.W. (2007). Age-dependent requirement of AKAP150-anchored PKA and GluR2-lacking AMPA receptors in LTP. *EMBO J.* *26*, 4879–4890.
- Lu, Y., Christian, K., and Lu, B. (2008). BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol. Learn. Mem.* *89*, 312–323.
- Lujan, R., Nusser, Z., Roberts, J.D., Shigemoto, R., and Somogyi, P. (1996). Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* *8*, 1488–1500.
- Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 173–180.
- Lüscher, C., and Huber, K.M. (2010). Group 1 mGluR-Dependent Synaptic Long-Term Depression: Mechanisms and Implications for Circuitry and Disease. *Neuron* *65*, 445–459.
- Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* *84*, 87–136.
- Ma, Y., Li, J., Chiu, I., Wang, Y., Sloane, J.A., Lü, J., Kosaras, B., Sidman, R.L., Volpe, J.J., and Vartanian, T. (2006). Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *J. Cell Biol.* *175*, 209–215.
- Ma, Y., Haynes, R.L., Sidman, R.L., and Vartanian, T. (2007). TLR8: an innate immune receptor in brain, neurons and axons. *Cell Cycle Georget. Tex* *6*, 2859–2868.
- Mack, T.G., Koester, M.P., and Pollerberg, G.E. (2000). The microtubule-associated protein MAP1B is involved in local stabilization of turning growth cones. *Mol. Cell. Neurosci.* *15*, 51–65.
- Madroñal, N., Gruart, A., Sacktor, T.C., and Delgado-García, J.M. (2010). PKMzeta inhibition reverses learning-induced increases in hippocampal synaptic strength and memory during trace eyeblink conditioning. *PLoS One* *5*, e10400.

- Magnus, T., Schreiner, B., Korn, T., Jack, C., Guo, H., Antel, J., Ifergan, I., Chen, L., Bischof, F., Bar-Or, A., et al. (2005). Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 2537–2546.
- Maher, F.O., Clarke, R.M., Kelly, A., Nally, R.E., and Lynch, M.A. (2006). Interaction between interferon γ and insulin-like growth factor-1 in hippocampus impacts on the ability of rats to sustain long-term potentiation. *J. Neurochem.* *96*, 1560–1571.
- Makino, H., and Malinow, R. (2009). AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* *64*, 381–390.
- Malissen, M., Gillet, A., Rocha, B., Trucy, J., Vivier, E., Boyer, C., Köntgen, F., Brun, N., Mazza, G., and Spanopoulou, E. (1993). T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *EMBO J.* *12*, 4347–4355.
- Marín-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., and Mallat, M. (2004). Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron* *41*, 535–547.
- Mars, L.T., Saikali, P., Liblau, R.S., and Arbour, N. (2011). Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochim. Biophys. Acta* *1812*, 151–161.
- Martin, C., Plat, M., Nerrière-Daguin, V., Coulon, F., Uzbekova, S., Venturi, E., Condé, F., Hermel, J.-M., Hantraye, P., Tesson, L., et al. (2005). Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation. *Transgenic Res.* *14*, 373–384.
- Martínez-Sanchis, S., Bernal, M.C., Montagud, J.V., Candela, G., Crespo, J., Sancho, A., and Pallardó, L.M. (2011). Effects of immunosuppressive drugs on the cognitive functioning of renal transplant recipients: a pilot study. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* *33*, 1016–1024.
- Mathieu, P., Piantanida, A.P., and Pitossi, F. (2010). Chronic expression of transforming growth factor-beta enhances adult neurogenesis. *Neuroimmunomodulation* *17*, 200–201.
- Matsuda, K., and Yuzaki, M. (2011). Cbln family proteins promote synapse formation by regulating distinct neurexin signaling pathways in various brain regions. *Eur. J. Neurosci.* *33*, 1447–1461.
- Mauceri, D., Cattabeni, F., Di Luca, M., and Gardoni, F. (2004). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation drives synapse-associated protein 97 into spines. *J. Biol. Chem.* *279*, 23813–23821.
- McAllister, A.K., Katz, L.C., and Lo, D.C. (1997). Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron* *18*, 767–778.
- McConnell, M.J., Huang, Y.H., Datwani, A., and Shatz, C.J. (2009). H2-Kb and H2-Db regulate cerebellar long-term depression and limit motor learning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 6784–6789.
- Mei, F., Nagappan, G., Ke, Y., Sacktor, T.C., and Lu, B. (2011). BDNF facilitates L-LTP maintenance in the absence of protein synthesis through PKM ζ . *PLoS One* *6*, e21568.
- Melchior, B., Rémy, S., Nerrière-Daguin, V., Heslan, J.-M., Soullillou, J.-P., and Brachet, P. (2002). Temporal analysis of cytokine gene expression during infiltration of porcine neuronal grafts implanted into the rat brain. *J. Neurosci. Res.* *68*, 284–292.

- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 762–774.
- Menchón, S.A., Gärtner, A., Román, P., and Dotti, C.G. (2011). Neuronal (bi)polarity as a self-organized process enhanced by growing membrane. *PLoS One* *6*, e24190.
- Van der Merwe, P.A., Davis, S.J., Shaw, A.S., and Dustin, M.L. (2000). Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin. Immunol.* *12*, 5–21.
- Messaoudi, E., Kanhema, T., Soulé, J., Tiron, A., Dageyte, G., da Silva, B., and Bramham, C.R. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 10445–10455.
- Meyer, T., Hanson, P.I., Stryer, L., and Schulman, H. (1992). Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* *256*, 1199–1202.
- Michel, D.C., Nerrière-Daguin, V., Josien, R., Brachet, P., Naveilhan, P., and Neveu, I. (2006). Dendritic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain. *Exp. Neurol.* *202*, 76–84.
- Michel-Monigadon, D., Nerrière-Daguin, V., Lévêque, X., Plat, M., Venturi, E., Brachet, P., Naveilhan, P., and Neveu, I. (2010). Minocycline promotes long-term survival of neuronal transplant in the brain by inhibiting late microglial activation and T-cell recruitment. *Transplantation* *89*, 816–823.
- Michelucci, A., Heurtaux, T., Grandbarbe, L., Morga, E., and Heuschling, P. (2009). Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J. Neuroimmunol.* *210*, 3–12.
- Migues, P.V., Hardt, O., Wu, D.C., Gamache, K., Sacktor, T.C., Wang, Y.T., and Nader, K. (2010). PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat. Neurosci.* *13*, 630–634.
- Miller, J., Baker, C., Cook, K., Graf, B., Sanchez-Lockhart, M., Sharp, K., Wang, X., Yang, B., and Yoshida, T. (2009). Two pathways of costimulation through CD28. *Immunol. Res.* *45*, 159–172.
- Mills, C. (2012). M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit. Rev. Immunol.* *32*, 463–488.
- Minami, Y., Weissman, A.M., Samelson, L.E., and Klausner, R.D. (1987). Building a multichain receptor: synthesis, degradation, and assembly of the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *84*, 2688–2692.
- Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 850–860.
- Miyamoto, E. (2006). Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.* *100*, 433–442.
- Molnár, E. (2011). Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 506–513.
- Monahan, A.J., Warren, M., and Carvey, P.M. (2008). Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis. *Cell Transplant.* *17*, 363–372.

- Monje, M.L., Toda, H., and Palmer, T.D. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* *302*, 1760–1765.
- Montenegro-Venegas, C., Tortosa, E., Rosso, S., Peretti, D., Bollati, F., Bisbal, M., Jausoro, I., Avila, J., Cáceres, A., and Gonzalez-Billault, C. (2010). MAP1B Regulates Axonal Development by Modulating Rho-GTPase Rac1 Activity. *Mol. Biol. Cell* *21*, 3518–3528.
- Montminy, M.R., Gonzalez, G.A., and Yamamoto, K.K. (1990). Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci.* *13*, 184–188.
- Morgan, B.P., and Gasque, P. (1996). Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol. Today* *17*, 461–466.
- Morgan, S.C., Taylor, D.L., and Pocock, J.M. (2004). Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. *J. Neurochem.* *90*, 89–101.
- Moriguchi, S., Shioda, N., Han, F., Yeh, J.Z., Narahashi, T., and Fukunaga, K. (2009). Galantamine enhancement of long-term potentiation is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C activation. *Hippocampus* *19*, 844–854.
- Morishita, W., Connor, J.H., Xia, H., Quinlan, E.M., Shenolikar, S., and Malenka, R.C. (2001). Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. *Neuron* *32*, 1133–1148.
- Moriyama, M., Fukuhara, T., Britschgi, M., He, Y., Narasimhan, R., Villeda, S., Molina, H., Huber, B.T., Holers, M., and Wyss-Coray, T. (2011). Complement Receptor 2 Is Expressed in Neural Progenitor Cells and Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis. *J. Neurosci.* *31*, 3981–3989.
- Morris, R.G. (1999). D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Res. Bull.* *50*, 437.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* *319*, 774–776.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.
- Moult, P.R., Gladding, C.M., Sanderson, T.M., Fitzjohn, S.M., Bashir, Z.I., Molnar, E., and Collingridge, G.L. (2006). Tyrosine phosphatases regulate AMPA receptor trafficking during metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 2544–2554.
- Mulkey, R.M., and Malenka, R.C. (1992). Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* *9*, 967–975.
- Muller, D., and Lynch, G. (1988). Long-term potentiation differentially affects two components of synaptic responses in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 9346–9350.
- Muller, D., Nikonenko, I., Jourdain, P., and Alberi, S. (2002). LTP, memory and structural plasticity. *Curr. Mol. Med.* *2*, 605–611.
- Nadar, V.C., Ketschek, A., Myers, K.A., Gallo, G., and Baas, P.W. (2008). Kinesin-5 is essential for growth-cone turning. *Curr. Biol. CB* *18*, 1972–1977.

- Nagahara, A.H., and Tuszynski, M.H. (2011). Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 209–219.
- Nakamura, K., Hirai, H., Torashima, T., Miyazaki, T., Tsurui, H., Xiu, Y., Ohtsuji, M., Lin, Q.S., Tsukamoto, K., Nishimura, H., et al. (2007). CD3 and immunoglobulin G Fc receptor regulate cerebellar functions. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 5128–5134.
- Needleman, L.A., Liu, X.-B., El-Sabeawy, F., Jones, E.G., and McAllister, A.K. (2010). MHC class I molecules are present both pre- and postsynaptically in the visual cortex during postnatal development and in adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 16999–17004.
- Ng, J., and Luo, L. (2004). Rho GTPases Regulate Axon Growth through Convergent and Divergent Signaling Pathways. *Neuron* *44*, 779–793.
- Nguyen, P.V., and Woo, N.H. (2003). Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog. Neurobiol.* *71*, 401–437.
- Nguyen, P.V., Abel, T., and Kandel, E.R. (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* *265*, 1104–1107.
- Nicoll, R.A., and Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 863–876.
- Nikcevic, K.M., Gordon, K.B., Tan, L., Hurst, S.D., Kroepfl, J.F., Gardinier, M., Barrett, T.A., and Miller, S.D. (1997). IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *158*, 614–621.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* *308*, 1314–1318.
- Nishiyori, A., Hanno, Y., Saito, M., and Yoshihara, Y. (2004). Aberrant transcription of unrearranged T-cell receptor beta gene in mouse brain. *J. Comp. Neurol.* *469*, 214–226.
- Noiges, R., Eichinger, R., Kutschera, W., Fischer, I., Németh, Z., Wiche, G., and Propst, F. (2002). Microtubule-Associated Protein 1A (MAP1A) and MAP1B: Light Chains Determine Distinct Functional Properties. *J. Neurosci.* *22*, 2106–2114.
- Notarangelo, L.D., and Ochs, H.D. (2003). Wiskott—Aldrich Syndrome: a model for defective actin reorganization, cell trafficking and synapse formation. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 585–591.
- Oh, M.C., Derkach, V.A., Guire, E.S., and Soderling, T.R. (2006). Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. *J. Biol. Chem.* *281*, 752–758.
- Ohno, H., Aoe, T., Taki, S., Kitamura, D., Ishida, Y., Rajewsky, K., and Saito, T. (1993). Developmental and functional impairment of T cells in mice lacking CD3 zeta chains. *EMBO J.* *12*, 4357–4366.
- Okun, E., Griffioen, K.J., Gen Son, T., Lee, J.-H., Roberts, N.J., Mughal, M.R., Hutchison, E., Cheng, A., Arumugam, T.V., Lathia, J.D., et al. (2010a). TLR2 activation inhibits embryonic neural progenitor cell proliferation. *J. Neurochem.* *114*, 462–474.

- Okun, E., Griffioen, K., Barak, B., Roberts, N.J., Castro, K., Pita, M.A., Cheng, A., Mughal, M.R., Wan, R., Ashery, U., et al. (2010b). Toll-like receptor 3 inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 15625–15630.
- Okun, E., Barak, B., Saada-Madar, R., Rothman, S.M., Griffioen, K.J., Roberts, N., Castro, K., Mughal, M.R., Pita, M.A., Stranahan, A.M., et al. (2012). Evidence for a Developmental Role for TLR4 in Learning and Memory. *PLoS ONE* *7*, e47522.
- Olsson, C., Riesbeck, K., Dohlsten, M., Michaëlsson, E., and Riebeck, K. (1999). CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF-kappaB and AP-1 activity in mouse T cell blasts. *J. Biol. Chem.* *274*, 14400–14405.
- Olthoff, K.M., Da Chen, X., Gelman, A., Turka, L., and Shaked, A. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4Ig to liver allografts results in prolonged survival and local T-cell anergy. *Transplant. Proc.* *29*, 1030–1031.
- Opazo, P., and Choquet, D. (2011). A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* *46*, 1–8.
- Opazo, P., Labrecque, S., Tigaret, C.M., Frouin, A., Wiseman, P.W., De Koninck, P., and Choquet, D. (2010). CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* *67*, 239–252.
- Opazo, P., Sainlos, M., and Choquet, D. (2012). Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Curr. Opin. Neurobiol.* *22*, 453–460.
- Orabona, C., Grohmann, U., Belladonna, M.L., Fallarino, F., Vacca, C., Bianchi, R., Bozza, S., Volpi, C., Salomon, B.L., Fioretti, M.C., et al. (2004). CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat. Immunol.* *5*, 1134–1142.
- Orabona, C., Belladonna, M.L., Vacca, C., Bianchi, R., Fallarino, F., Volpi, C., Gizzi, S., Fioretti, M.C., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2005). Cutting Edge: Silencing Suppressor of Cytokine Signaling 3 Expression in Dendritic Cells Turns CD28-Ig from Immune Adjuvant to Suppressant. *J. Immunol.* *174*, 6582–6586.
- Orabona, C., Pallotta, M.T., Volpi, C., Fallarino, F., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2008). SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 20828–20833.
- Otani, Y., Yamaguchi, Y., Sato, Y., Furuichi, T., Ikenaka, K., Kitani, H., and Baba, H. (2011). PLD δ is involved in phagocytosis of microglia: expression and localization changes of PLD4 are correlated with activation state of microglia. *PloS One* *6*, e27544.
- Otmakhov, N., Griffith, L.C., and Lisman, J.E. (1997). Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 5357–5365.
- Otmakhov, N., Tao-Cheng, J.-H., Carpenter, S., Asrican, B., Dosemeci, A., Reese, T.S., and Lisman, J. (2004a). Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 9324–9331.

- Otmakhov, N., Khibnik, L., Otmakhova, N., Carpenter, S., Riahi, S., Asrican, B., and Lisman, J. (2004b). Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J. Neurophysiol.* *91*, 1955–1962.
- Otmakhova, N.A., Otmakhov, N., Mortenson, L.H., and Lisman, J.E. (2000). Inhibition of the cAMP pathway decreases early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 4446–4451.
- Paixão, S., and Klein, R. (2010). Neuron–astrocyte communication and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* *20*, 466–473.
- Pak, C.W., Flynn, K.C., and Bamburg, J.R. (2008). Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 136–147.
- Paloneva, J., Manninen, T., Christman, G., Hovanes, K., Mandelin, J., Adolfsson, R., Bianchin, M., Bird, T., Miranda, R., Salmaggi, A., et al. (2002). Mutations in Two Genes Encoding Different Subunits of a Receptor Signaling Complex Result in an Identical Disease Phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* *71*, 656–662.
- Pang, P.T., and Lu, B. (2004). Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res. Rev.* *3*, 407–430.
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* *306*, 487–491.
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur. J. Neurosci.* *33*, 1351–1365.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 383–400.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* *333*, 1456–1458.
- Park, H., and Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 7–23.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A.A., and Sacktor, T.C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* *313*, 1141–1144.
- Patrussi, L., Ulivieri, C., Lucherini, O.M., Paccani, S.R., Gamberucci, A., Lanfrancone, L., Pelicci, P.G., and Baldari, C.T. (2007). p52Shc is required for CXCR4-dependent signaling and chemotaxis in T cells. *Blood* *110*, 1730–1738.
- Patterson, M.A., Szatmari, E.M., and Yasuda, R. (2010). AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15951–15956.
- Peng, Y., Zhao, J., Gu, Q.-H., Chen, R.-Q., Xu, Z., Yan, J.-Z., Wang, S.-H., Liu, S.-Y., Chen, Z., and Lu, W. (2010). Distinct trafficking and expression mechanisms underlie LTP and LTD of NMDA receptor-mediated synaptic responses. *Hippocampus* *20*, 646–658.

- Perkins, D., Wang, Z., Donovan, C., He, H., Mark, D., Guan, G., Wang, Y., Walunas, T., Bluestone, J., Listman, J., et al. (1996). Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 156, 4154–4159.
- Pertz, O. (2010). Spatio-temporal Rho GTPase signaling – where are we now? *J. Cell Sci.* 123, 1841–1850.
- Petralia, R.S., Sans, N., Wang, Y.-X., and Wenthold, R.J. (2005). Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 436–452.
- Pi, H.J., Otmakhov, N., Lemelin, D., De Koninck, P., and Lisman, J. (2010). Autonomous CaMKII can promote either long-term potentiation or long-term depression, depending on the state of T305/T306 phosphorylation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 8704–8709.
- Pickering, M., and O'Connor, J.J. (2007). Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 163, 339–354.
- Plant, K., Pelkey, K.A., Bortolotto, Z.A., Morita, D., Terashima, A., McBain, C.J., Collingridge, G.L., and Isaac, J.T.R. (2006). Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* 9, 602–604.
- Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., et al. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52, 437–444.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Böll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., et al. (2007). Human Leukocyte Antigen-B-Associated Transcript 3 Is Released from Tumor Cells and Engages the NKp30 Receptor on Natural Killer Cells. *Immunity* 27, 965–974.
- Poirier, N., Blanco, G., and Vanhove, B. (2011). A more selective costimulatory blockade of the CD28-B7 pathway. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 24, 2–11.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326, 1208–1212.
- Pollarolo, G., Schulz, J.G., Munck, S., and Dotti, C.G. (2011). Cytokines remnants define first neuronal asymmetry in vivo. *Nat. Neurosci.* 14, 1525–1533.
- Polleux, F., and Snider, W. (2010). Initiating and Growing an Axon. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
- Prast, H., and Philippu, A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64, 51–68.
- Puccetti, P., and Fallarino, F. (2008). Generation of T cell regulatory activity by plasmacytoid dendritic cells and tryptophan catabolism. *Blood Cells. Mol. Dis.* 40, 101–105.
- Pujol, F., Kitabgi, P., and Boudin, H. (2005). The chemokine SDF-1 differentially regulates axonal elongation and branching in hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 118, 1071–1080.
- Rahpeymai, Y., Hietala, M.A., Wilhelmsson, U., Fotheringham, A., Davies, I., Nilsson, A.-K., Zwirner, J., Wetsel, R.A., Gerard, C., Pekny, M., et al. (2006). Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis. *EMBO J.* 25, 1364–1374.

- Ransohoff, R.M., Liu, L., and Cardona, A.E. (2007). Chemokines and Chemokine Receptors: Multipurpose Players in Neuroinflammation. In *International Review of Neurobiology*, M.T.C. and S.A.L. Giacinto Bagetta, ed. (Academic Press), pp. 187–204.
- Rao, A., and Craig, A.M. (1997). Activity Regulates the Synaptic Localization of the NMDA Receptor in Hippocampal Neurons. *Neuron* *19*, 801–812.
- Rauner, C., and Köhr, G. (2011). Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *J. Biol. Chem.* *286*, 7558–7566.
- Rellos, P., Pike, A.C.W., Niesen, F.H., Salah, E., Lee, W.H., von Delft, F., and Knapp, S. (2010). Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biol.* *8*, e1000426.
- Rex, C.S., Lin, C.-Y., Kramár, E.A., Chen, L.Y., Gall, C.M., and Lynch, G. (2007). Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 3017–3029.
- Rezai-Zadeh, K., Gate, D., and Town, T. (2009). CNS infiltration of peripheral immune cells: D-Day for neurodegenerative disease? *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* *4*, 462–475.
- Ribic, A., Zhang, M., Schlumbohm, C., Mätz-Rensing, K., Uchanska-Ziegler, B., Flügge, G., Zhang, W., Walter, L., and Fuchs, E. (2010). Neuronal MHC Class I Molecules are Involved in Excitatory Synaptic Transmission at the Hippocampal Mossy Fiber Synapses of Marmoset Monkeys. *Cell. Mol. Neurobiol.* *30*, 827–839.
- Rieux-Laucat, F., Hivroz, C., Lim, A., Mateo, V., Pellier, I., Selz, F., Fischer, A., and Le Deist, F. (2006). Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency. *N. Engl. J. Med.* *354*, 1913–1921.
- Roberts, J.L., Lauritsen, J.P.H., Cooney, M., Parrott, R.E., Sajaroff, E.O., Win, C.M., Keller, M.D., Carpenter, J.H., Carabana, J., Krangel, M.S., et al. (2007). T-B+NK⁺ severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood* *109*, 3198–3206.
- Roche, K.W., O'Brien, R.J., Mammen, A.L., Bernhardt, J., and Huganir, R.L. (1996). Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* *16*, 1179–1188.
- Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A.H., Piazuelo, M.B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J., Sotomayor, E.M., et al. (2004). Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.* *64*, 5839–5849.
- Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B.A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., and Gemma, C. (2011). CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 16241–16250.
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., and Schwartz, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1081–1088.

- De la Rosa, E.J., and de Pablo, F. (2000). Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci.* *23*, 454–458.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., and Stevens, C.F. (1998). The Tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel. *Science* *280*, 1596–1599.
- Rosso, S., Bollati, F., Bisbal, M., Peretti, D., Sumi, T., Nakamura, T., Quiroga, S., Ferreira, A., and Cáceres, A. (2004). LIMK1 Regulates Golgi Dynamics, Traffic of Golgi-derived Vesicles, and Process Extension in Primary Cultured Neurons. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3433–3449.
- Rouach, N., Byrd, K., Petralia, R.S., Elias, G.M., Adesnik, H., Tomita, S., Karimzadegan, S., Kealey, C., Brecht, D.S., and Nicoll, R.A. (2005). TARP gamma-8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* *8*, 1525–1533.
- Roumier, A., Béchade, C., Poncer, J.-C., Smalla, K.-H., Tomasello, E., Vivier, E., Gundelfinger, E.D., Triller, A., and Bessis, A. (2004). Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 11421–11428.
- Rozdzial, M.M., Malissen, B., and Finkel, T.H. (1995). Tyrosine-phosphorylated T cell receptor zeta chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity* *3*, 623–633.
- Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* *229*, 12–26.
- Rulifson, I.C., Sperling, A.I., Fields, P.E., Fitch, F.W., and Bluestone, J.A. (1997). CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md* *158*, 658–665.
- Rutkowski, M.D., Lambert, F., Raghavendra, V., and DeLeo, J.A. (2004). Presence of spinal B7.2 (CD86) but not B7.1 (CD80) co-stimulatory molecules following peripheral nerve injury: role of nondestructive immunity in neuropathic pain. *J. Neuroimmunol.* *146*, 94–98.
- Sacktor, T.C. (2012). Memory maintenance by PKM ζ --an evolutionary perspective. *Mol. Brain* *5*, 31.
- Sajikumar, S., and Frey, J.U. (2003). Anisomycin inhibits the late maintenance of long-term depression in rat hippocampal slices in vitro. *Neurosci. Lett.* *338*, 147–150.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H., et al. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 subunit. *Nature* *373*, 151–155.
- Samelson, L.E., Harford, J.B., and Klausner, R.D. (1985). Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* *43*, 223–231.
- Sanchez-Soriano, N., Travis, M., Dajas-Bailador, F., Gonçalves-Pimentel, C., Whitmarsh, A.J., and Prokop, A. (2009). Mouse ACF7 and Drosophila Short stop modulate filopodia formation and microtubule organisation during neuronal growth. *J. Cell Sci.* *122*, 2534–2542.
- Sanhueza, M., and Lisman, J. (2013). The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory. *Mol. Brain* *6*, 10.

- Sanhueza, M., Fernandez-Villalobos, G., Stein, I.S., Kasumova, G., Zhang, P., Bayer, K.U., Otmakhov, N., Hell, J.W., and Lisman, J. (2011). Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic strength. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 9170–9178.
- Sans, N., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Blahos, J., 2nd, Hell, J.W., and Wenthold, R.J. (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 1260–1271.
- Santos, A.M., Calvente, R., Tassi, M., Carrasco, M.-C., Martín-Oliva, D., Marín-Teva, J.L., Navascués, J., and Cuadros, M.A. (2008). Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* *506*, 224–239.
- Schaefer, A.W., Schoonderwoert, V.T.G., Ji, L., Mederios, N., Danuser, G., and Forscher, P. (2008). Coordination of Actin Filament and Microtubule Dynamics during Neurite Outgrowth. *Dev. Cell* *15*, 146–162.
- Schafer, D.P., and Stevens, B. (2010). Synapse elimination during development and disease: immune molecules take centre stage. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 476.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* *74*, 691–705.
- Scharf, M.T., Woo, N.H., Lattal, K.M., Young, J.Z., Nguyen, P.V., and Abel, T. (2002). Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced training. *J. Neurophysiol.* *87*, 2770–2777.
- Schmitz, D., Mellor, J., Breustedt, J., and Nicoll, R.A. (2003). Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* *6*, 1058–1063.
- Schneider, H., Valk, E., Leung, R., and Rudd, C.E. (2008). CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B (PKB/AKT) sustains T-cell anergy without cell death. *PloS One* *3*, e3842.
- Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Brecht, D.S., and Nicoll, R.A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 13902–13907.
- Seeburg, P.H., and Hartner, J. (2003). Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 279–283.
- Selig, D.K., Hjelmstad, G.O., Herron, C., Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1995). Independent mechanisms for long-term depression of AMPA and NMDA responses. *Neuron* *15*, 417–426.
- Serrador, J.M., Nieto, M., and Francisco (1999). Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol.* *9*, 228–233.
- Serrano, P., Yao, Y., and Sacktor, T.C. (2005). Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phase long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 1979–1984.
- Sham, C.W., Chan, A.M., Kwong, J.M.K., Caprioli, J., Nusinowitz, S., Chen, B., Lee, J.G., Gandhi, N.M., Francisco, L.M., Sharpe, A.H., et al. (2012). Neuronal programmed cell death-1 ligand expression

- regulates retinal ganglion cell number in neonatal and adult mice. *J. Neuro-Ophthalmol. Off. J. North Am. Neuro-Ophthalmol. Soc.* 32, 227–237.
- Shapira-Lichter, I., Beilin, B., Ofek, K., Bessler, H., Gruberger, M., Shavit, Y., Seror, D., Grinevich, G., Posner, E., Reichenberg, A., et al. (2008). Cytokines and cholinergic signals co-modulate surgical stress-induced changes in mood and memory. *Brain. Behav. Immun.* 22, 388–398.
- Sharifzadeh, M., Naghdi, N., Khosrovani, S., Ostad, S.N., Sharifzadeh, K., and Roghani, A. (2005). Post-training intrahippocampal infusion of the COX-2 inhibitor celecoxib impaired spatial memory retention in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 511, 159–166.
- Sharma, K., Selzer, M.E., and Li, S. (2012). Scar-mediated inhibition and CSPG receptors in the CNS. *Exp. Neurol.* 237, 370–378.
- Shaw, K.N., Commins, S., and O'Mara, S.M. (2003). Deficits in spatial learning and synaptic plasticity induced by the rapid and competitive broad-spectrum cyclooxygenase inhibitor ibuprofen are reversed by increasing endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2438–2446.
- Shechter, R., Ronen, A., Rolls, A., London, A., Bakalash, S., Young, M.J., and Schwartz, M. (2008). Toll-like receptor 4 restricts retinal progenitor cell proliferation. *J. Cell Biol.* 183, 393–400.
- Shen, K., and Meyer, T. (1999). Dynamic Control of CaMKII Translocation and Localization in Hippocampal Neurons by NMDA Receptor Stimulation. *Science* 284, 162–167.
- Shen, L., Liang, F., Walensky, L.D., and Huganir, R.L. (2000). Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4. 1N-linked actin cytoskeletal association. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 7932–7940.
- Shen, Y., Inoue, N., and Heese, K. (2010). Neurotrophin-4 (ntf4) mediates neurogenesis in mouse embryonic neural stem cells through the inhibition of the signal transducer and activator of transcription-3 (stat3) and the modulation of the activity of protein kinase B. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 909–916.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823–847.
- Sheng, M., and Kim, E. (2011). The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Shepherd, J.D., and Bear, M.F. (2011). New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 14, 279–284.
- Shepherd, J.D., and Huganir, R.L. (2007). The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 613–643.
- Shi, S., Hayashi, Y., Esteban, J.A., and Malinow, R. (2001). Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105, 331–343.
- Shimazu, K., Zhao, M., Sakata, K., Akbarian, S., Bates, B., Jaenisch, R., and Lu, B. (2006). NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 13, 307–315.

- Shimono, C., Manabe, R., Yamada, T., Fukuda, S., Kawai, J., Furutani, Y., Tsutsui, K., Ikenaka, K., Hayashizaki, Y., and Sekiguchi, K. (2010). Identification and characterization of nCLP2, a novel C1q family protein expressed in the central nervous system. *J. Biochem. (Tokyo)* *147*, 565–579.
- Shinjyo, N., Ståhlberg, A., Dragunow, M., Pekny, M., and Pekna, M. (2009). Complement-Derived Anaphylatoxin C3a Regulates In Vitro Differentiation and Migration of Neural Progenitor Cells. *STEM CELLS* *27*, 2824–2832.
- Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J.P., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell* *7*, 483–495.
- Silva, A.J., Wang, Y., Paylor, R., Wehner, J.M., Stevens, C.F., and Tonegawa, S. (1992). Alpha calcium/calmodulin kinase II mutant mice: deficient long-term potentiation and impaired spatial learning. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *57*, 527–539.
- Silva, J.S.D., Medina, M., Zuliani, C., Nardo, A.D., Witke, W., and Dotti, C.G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol.* *162*, 1267–1279.
- Da Silva, J.S., and Dotti, C.G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 694–704.
- Da Silva, J.S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., and Dotti, C.G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol.* *162*, 1267–1279.
- Skeberdis, V.A., Chevaleyre, V., Lau, C.G., Goldberg, J.H., Pettit, D.L., Suadicani, S.O., Lin, Y., Bennett, M.V.L., Yuste, R., Castillo, P.E., et al. (2006). Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* *9*, 501–510.
- Van der Sluijs, P., and Hoogenraad, C.C. (2011). New insights in endosomal dynamics and AMPA receptor trafficking. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 499–505.
- Sobczyk, A., Scheuss, V., and Svoboda, K. (2005). NMDA Receptor Subunit-Dependent [Ca²⁺] Signaling in Individual Hippocampal Dendritic Spines. *J. Neurosci.* *25*, 6037–6046.
- Song, C., and Horrobin, D. (2004). Omega-3 fatty acid ethyl-eicosapentaenoate, but not soybean oil, attenuates memory impairment induced by central IL-1beta administration. *J. Lipid Res.* *45*, 1112–1121.
- Sonntag, W.E., Ramsey, M., and Carter, C.S. (2005). Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging. *Ageing Res. Rev.* *4*, 195–212.
- Soontornniyomkij, Wang, Pittman, Wiley, and Achim (1998). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in activated microglia of human immunodeficiency virus type 1 encephalitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *24*, 453–460.
- Sourial-Bassillious, N., Eklöf, A.-C., Scott, L., Aperia, A., and Zelenin, S. (2006). Effect of TNF-alpha on CD3-zeta and MHC-I in postnatal rat hippocampus. *Pediatr. Res.* *60*, 377–381.

- Sperling, A.I., Auger, J.A., Ehst, B.D., Rulifson, I.C., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *157*, 3909–3917.
- Sprengel, R., Suchanek, B., Amico, C., Brusa, R., Burnashev, N., Rozov, A., Hvalby, Ø., Jensen, V., Paulsen, O., Andersen, P., et al. (1998). Importance of the Intracellular Domain of NR2 Subunits for NMDA Receptor Function In Vivo. *Cell* *92*, 279–289.
- Spulber, S., Mateos, L., Oprica, M., Cedazo-Minguez, A., Bartfai, T., Winblad, B., and Schultzberg, M. (2009). Impaired long term memory consolidation in transgenic mice overexpressing the human soluble form of IL-1ra in the brain. *J. Neuroimmunol.* *208*, 46–53.
- Steinberg, J.P., Huganir, R.L., and Linden, D.J. (2004a). N-ethylmaleimide-sensitive factor is required for the synaptic incorporation and removal of AMPA receptors during cerebellar long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 18212–18216.
- Steinberg, M., Adjali, O., Swainson, L., Merida, P., Bartolo, V.D., Pelletier, L., Taylor, N., and Noraz, N. (2004b). T-cell receptor-induced phosphorylation of the ζ chain is efficiently promoted by ZAP-70 but not Syk. *Blood* *104*, 760–767.
- Stellwagen, D., and Malenka, R.C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* *440*, 1054–1059.
- Stephan, A.H., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). The Complement System: An Unexpected Role in Synaptic Pruning During Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* *35*, 369–389.
- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., et al. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* *131*, 1164–1178.
- Steward, O., Wallace, C.S., Lyford, G.L., and Worley, P.F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* *21*, 741–751.
- Stiess, M., and Bradke, F. (2011). Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way. *Dev. Neurobiol.* *71*, 430–444.
- Stiess, M., Maghelli, N., Kapitein, L.C., Gomis-Rüth, S., Wilsch-Bräuninger, M., Hoogenraad, C.C., Tolić-Nørrelykke, I.M., and Bradke, F. (2010). Axon Extension Occurs Independently of Centrosomal Microtubule Nucleation. *Science* *327*, 704–707.
- Strack, S., and Colbran, R.J. (1998). Autophosphorylation-dependent Targeting of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II by the NR2B Subunit of the N-Methyl-d-aspartate Receptor. *J. Biol. Chem.* *273*, 20689–20692.
- Strack, S., McNeill, R.B., and Colbran, R.J. (2000). Mechanism and Regulation of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Targeting to the NR2B Subunit of the N-Methyl-d-aspartate Receptor. *J. Biol. Chem.* *275*, 23798–23806.
- Straub, C., and Tomita, S. (2012). The regulation of glutamate receptor trafficking and function by TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Curr. Opin. Neurobiol.* *22*, 488–495.

- Sucher, R., Fischler, K., Oberhuber, R., Kronberger, I., Margreiter, C., Ollinger, R., Schneeberger, S., Fuchs, D., Werner, E.R., Watschinger, K., et al. (2012). IDO and regulatory T cell support are critical for cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4 Ig-mediated long-term solid organ allograft survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 37–46.
- Swaminathan, P.D., and Anderson, M.E. CaMKII Inhibition.
- Syken, J., and Shatz, C.J. (2003). Expression of T cell receptor beta locus in central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13048–13053.
- Syken, J., Grandpre, T., Kanold, P.O., and Shatz, C.J. (2006). PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science* *313*, 1795–1800.
- Szabo, M., and Gulya, K. (2013). Development of the microglial phenotype in culture. *Neuroscience* *241*, 280–295.
- Tahirovic, S., and Bradke, F. (2009). Neuronal Polarity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*.
- Takahashi, K., Rochford, C.D.P., and Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* *201*, 647–657.
- Takenawa, T., and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J. Cell Sci.* *114*, 1801–1809.
- Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 37–48.
- Tanabe, S., Heesen, M., Yoshizawa, I., Berman, M.A., Luo, Y., Bleul, C.C., Springer, T.A., Okuda, K., Gerard, N., and Dorf, M.E. (1997). Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 905–911.
- Tang, S.-C., Arumugam, T.V., Xu, X., Cheng, A., Mughal, M.R., Jo, D.G., Lathia, J.D., Siler, D.A., Chigurupati, S., Ouyang, X., et al. (2007). Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 13798–13803.
- Tao-Cheng, J.-H., Vinade, L., Winters, C.A., Reese, T.S., and Dosemeci, A. (2005). Inhibition of phosphatase activity facilitates the formation and maintenance of NMDA-induced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II clusters in hippocampal neurons. *Neuroscience* *130*, 651–656.
- Tararuk, T., Ostman, N., Li, W., Björkblom, B., Padzik, A., Zdrojewska, J., Hongisto, V., Herdegen, T., Konopka, W., Courtney, M.J., et al. (2006). JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J. Cell Biol.* *173*, 265–277.
- Terashima, A., Pelkey, K.A., Rah, J.-C., Suh, Y.H., Roche, K.W., Collingridge, G.L., McBain, C.J., and Isaac, J.T.R. (2008). An essential role for PICK1 in NMDA receptor-dependent bidirectional synaptic plasticity. *Neuron* *57*, 872–882.
- Thiels, E., Kanterewicz, B.I., Knapp, L.T., Barrionuevo, G., and Klann, E. (2000). Protein Phosphatase-Mediated Regulation of Protein Kinase C during Long-Term Depression in the Adult Hippocampus In Vivo. *J. Neurosci.* *20*, 7199–7207.

- Thomas, M., and Le, W.D. (2004). Minocycline: neuroprotective mechanisms in Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Des.* *10*, 679–686.
- Thomas, C.G., Miller, A.J., and Westbrook, G.L. (2006). Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptor NR2 Subunits in Cultured Hippocampal Neurons. *J. Neurophysiol.* *95*, 1727–1734.
- Thompson, C.B., Lindsten, T., Ledbetter, J.A., Kunkel, S.L., Young, H.A., Emerson, S.G., Leiden, J.M., and June, C.H. (1989). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 1333–1337.
- Tomita, S., Chen, L., Kawasaki, Y., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. (2003). Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J. Cell Biol.* *161*, 805–816.
- Tovar, K.R., McGinley, M.J., and Westbrook, G.L. (2013). Triheteromeric NMDA Receptors at Hippocampal Synapses. *J. Neurosci.* *33*, 9150–9160.
- Tran, P.B., Ren, D., and Miller, R.J. (2005). The HIV-1 coat protein gp120 regulates cxcr4-mediated signaling in neural progenitor cells. *J. Neuroimmunol.* *160*, 68–76.
- Trang, T., Beggs, S., Wan, X., and Salter, M.W. (2009). P2X4-Receptor-Mediated Synthesis and Release of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Microglia Is Dependent on Calcium and p38-Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *J. Neurosci.* *29*, 3518–3528.
- Trang, T., Beggs, S., and Salter, M.W. (2011). Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol.* *7*, 99–108.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol. Rev.* *62*, 405–496.
- Trejo, J., Piriz, J., Llorens-Martin, M.V., Fernandez, A.M., Bolós, M., LeRoith, D., Nuñez, A., and Torres-Aleman, I. (2007). Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol. Psychiatry* *12*, 1118–1128.
- Tremblay, M.-È., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., and Nimmerjahn, A. (2011). The Role of Microglia in the Healthy Brain. *J. Neurosci.* *31*, 16064–16069.
- Tybulewicz, V.L.J. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr. Opin. Immunol.* *17*, 267–274.
- Upreti, C., Zhang, X., Alford, S., and Stanton, P.K. (2013). Role of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the induction of long-term synaptic plasticity of vesicular release. *Neuropharmacology* *66*, 31–39.
- Vallières, L., Campbell, I.L., Gage, F.H., and Sawchenko, P.E. (2002). Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 486–492.
- Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* *346 Pt 3*, 561–576.

- Vinet, J., Weering, H.R.J. van, Heinrich, A., Kälin, R.E., Wegner, A., Brouwer, N., Heppner, F.L., Rooijen, N. van, Boddeke, H.W.G.M., and Biber, K. (2012). Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *J. Neuroinflammation* 9, 27.
- Viola, A., and Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273, 104–106.
- Vitriol, E.A., and Zheng, J.Q. (2012). Growth Cone Travel in Space and Time: the Cellular Ensemble of Cytoskeleton, Adhesion, and Membrane. *Neuron* 73, 1068–1081.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M.M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Luca, M.D., Galli, C.L., et al. (2003). Interleukin-1 β Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases. *J. Neurosci.* 23, 8692–8700.
- Vivier, E., Nunès, J.A., and Vély, F. (2004). Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science* 306, 1517–1519.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9, 503–510.
- Volk, L., Kim, C.-H., Takamiya, K., Yu, Y., and Huganir, R.L. (2010). Developmental regulation of protein interacting with C kinase 1 (PICK1) function in hippocampal synaptic plasticity and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21784–21789.
- Volk, L.J., Bachman, J.L., Johnson, R., Yu, Y., and Huganir, R.L. (2013). PKM- ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature* 493, 420–423.
- Wachs, F.-P., Winner, B., Couillard-Despres, S., Schiller, T., Aigner, R., Winkler, J., Bogdahn, U., and Aigner, L. (2006). Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 358–370.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *J. Neurosci.* 29, 3974–3980.
- Wakselman, S., Béchade, C., Roumier, A., Bernard, D., Triller, A., and Bessis, A. (2008). Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 8138–8143.
- Wang, D., Cui, Z., Zeng, Q., Kuang, H., Wang, L.P., Tsien, J.Z., and Cao, X. (2009). Genetic Enhancement of Memory and Long-Term Potentiation but Not CA1 Long-Term Depression in NR2B Transgenic Rats. *PLoS ONE* 4, e7486.
- Wang, J., Yang, Z., Liu, C., Zhao, Y., and Chen, Y. (2013). Activated microglia provide a neuroprotective role by balancing glial cell-line derived neurotrophic factor and tumor necrosis factor- α secretion after subacute cerebral ischemia. *Int. J. Mol. Med.* 31, 172–178.
- Wang, P.Y., Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Wenthold, R.J., and Brenowitz, S.D. (2011). Functional NMDA Receptors at Axonal Growth Cones of Young Hippocampal Neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 9289–9297.

- Washburn, L.R., Zekzer, D., Eitan, S., Lu, Y., Dang, H., Middleton, B., Evans, C.J., Tian, J., and Kaufman, D.L. (2011). A Potential Role for Shed Soluble Major Histocompatibility Class I Molecules as Modulators of Neurite Outgrowth. *PLoS ONE* 6, e18439.
- Watanabe, M., Fukaya, M., Sakimura, K., Manabe, T., Mishina, M., and Inoue, Y. (1998). Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fibre-recipient layer) of the mouse hippocampal CA3 subfield. *Eur. J. Neurosci.* 10, 478–487.
- Watkins, J.C. (2000). l-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 297–309.
- Watt, A.J., Sjöström, P.J., Häusser, M., Nelson, S.B., and Turrigiano, G.G. (2004). A proportional but slower NMDA potentiation follows AMPA potentiation in LTP. *Nat. Neurosci.* 7, 518–524.
- Weissman, A.M., Samelson, L.E., and Klausner, R.D. (1986). A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex. *Nature* 324, 480–482.
- Weissman, A.M., Baniyash, M., Hou, D., Samelson, L.E., Burgess, W.H., and Klausner, R.D. (1988). Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239, 1018–1021.
- Weitlauf, C., Honse, Y., Auberson, Y.P., Mishina, M., Lovinger, D.M., and Winder, D.G. (2005). Activation of NR2A-Containing NMDA Receptors Is Not Obligatory for NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 25, 8386–8390.
- Wen, Z., Guirland, C., Ming, G., and Zheng, J.Q. (2004). A CaMKII/Calcineurin Switch Controls the Direction of Ca²⁺-Dependent Growth Cone Guidance. *Neuron* 43, 835–846.
- Wenthold, R.J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N., and Petralia, R.S. (2003). Trafficking of Nmda Receptors1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 335–358.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., and Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093–1097.
- Wibrand, K., Messaoudi, E., Håvik, B., Steenslid, V., Løvlie, R., Steen, V.M., and Bramham, C.R. (2006). Identification of genes co-upregulated with Arc during BDNF-induced long-term potentiation in adult rat dentate gyrus in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1501–1511.
- Widera, D., Mikenberg, I., Elvers, M., Kaltschmidt, C., and Kaltschmidt, B. (2006). Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling. *BMC Neurosci.* 7, 64.
- Williamson, L.L., Sholar, P.W., Mistry, R.S., Smith, S.H., and Bilbo, S.D. (2011). Microglia and Memory: Modulation by Early-Life Infection. *J. Neurosci.* 31, 15511–15521.
- Wolf, S.A., Gimsa, U., Bechmann, I., and Nitsch, R. (2001). Differential expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on microglial cells induced by Th1 and Th2 cells in organotypic brain tissue. *Glia* 36, 414–420.
- Wolf, S.A., Steiner, B., Wengner, A., Lipp, M., Kammertoens, T., and Kempermann, G. (2009a). Adaptive peripheral immune response increases proliferation of neural precursor cells in the adult hippocampus. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 3121–3128.

- Wolf, S.A., Steiner, B., Akpinarli, A., Kammertoens, T., Nassenstein, C., Braun, A., Blankenstein, T., and Kempermann, G. (2009b). CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 3979–3984.
- Woolf, N.J., Milov, A.M., Schweitzer, E.S., and Roghani, A. (2001). Elevation of nerve growth factor and antisense knockdown of TrkA receptor during contextual memory consolidation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 1047–1055.
- Xu, H., Chen, H., Ding, Q., Xie, Z.-H., Chen, L., Diao, L., Wang, P., Gan, L., Crair, M.C., and Tian, N. (2010). *Neuron* *65*, 503–515.
- Yang, Y. (2011). Targeting co-stimulatory pathways in gene therapy. *Front. Microb. Immunol.* *2*, 202.
- Yano, H., Ninan, I., Zhang, H., Milner, T.A., Arancio, O., and Chao, M.V. (2006). BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex. *Nat. Neurosci.* *9*, 1009–1018.
- Yasuda, H., Barth, A.L., Stellwagen, D., and Malenka, R.C. (2003). A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nat. Neurosci.* *6*, 15–16.
- Yoshihara, Y., De Roo, M., and Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Curr. Opin. Neurobiol.* *19*, 146–153.
- Yu, W., Qiang, L., Solowska, J.M., Karabay, A., Korulu, S., and Baas, P.W. (2008). The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1485–1498.
- Yudowski, G.A., Puthenveedu, M.A., Leonoudakis, D., Panicker, S., Thorn, K.S., Beattie, E.C., and von Zastrow, M. (2007). Real-time imaging of discrete exocytic events mediating surface delivery of AMPA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 11112–11121.
- Yuzaki, M. (2010). Synapse formation and maintenance by C1q family proteins: a new class of secreted synapse organizers. *Eur. J. Neurosci.* *32*, 191–197.
- Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rozov, A., Kaiser, K.M., Köster, H.J., Borchardt, T., Worley, P., et al. (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* *284*, 1805–1811.
- Zeinstra, E., Wilczak, N., and De Keyser, J. (2003). Reactive astrocytes in chronic active lesions of multiple sclerosis express co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J. Neuroimmunol.* *135*, 166–171.
- Zeinstra, E.M., Wilczak, N., Wilschut, J.C., Glazenburg, L., Chesik, D., Kroese, F.G.M., and De Keyser, J. (2006). 5HT₄ agonists inhibit interferon-gamma-induced MHC class II and B7 costimulatory molecules expression on cultured astrocytes. *J. Neuroimmunol.* *179*, 191–195.
- Zhang, S.C., and Fedoroff, S. (1996). Neuron-microglia interactions in vitro. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *91*, 385–395.
- Zhao, J.-P., and Constantine-Paton, M. (2007). NR2A^{-/-} Mice Lack Long-Term Potentiation But Retain NMDA Receptor and L-Type Ca²⁺ Channel-Dependent Long-Term Depression in the Juvenile Superior Colliculus. *J. Neurosci.* *27*, 13649–13654.
- Zhou, X., Spittau, B., and Kriegelstein, K. (2012). TGF β signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia. *J. Neuroinflammation* *9*, 210.

- Zhou, X., Ding, Q., Chen, Z., Yun, H., and Wang, H. (2013). Involvement of GluN2A and GluN2B in synaptic and extrasynaptic NMDA receptor function and neuronal excitotoxicity. *J. Biol. Chem.*
- Zhu, J.J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., and Malinow, R. (2002). Ras and Rap Control AMPA Receptor Trafficking during Synaptic Plasticity. *Cell* *110*, 443–455.
- Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J., and Schwartz, M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat. Neurosci.* *9*, 268–275.
- Zohar, O., Reiter, Y., Bennink, J.R., Lev, A., Cavallaro, S., Paratore, S., Pick, C.G., Brooker, G., and Yewdell, J.W. (2008). Cutting Edge: MHC Class I–Ly49 Interaction Regulates Neuronal Function. *J. Immunol.* *180*, 6447–6451.
- Van Zundert, B., Yoshii, A., and Constantine-Paton, M. (2004). Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci.* *27*, 428–437.

ANNEXES

ANNEXE

Journal of Molecular Neuroscience, 46: 431-441

Article III: Ectopic expression of the immune adaptor protein CD3zeta in neural stem/progenitor cells disrupts cell-fate specification.

Julie Angibaud ¹²³, Stéphane J. Baudouin ¹²³, **Antoine Louveau** ¹²³, Véronique Nerrière-Daguin ¹²³,
Virginie Bonnamain ¹²³, Zsolt Csaba ⁴, Pascal Dourmaud ⁴, Philippe Naveilhan ¹²³, Nelly Noraz ⁵,
Véronique Pellier-Monnin ⁵, and Hélène Boudin ¹²³

¹INSERM, UMR 643, Nantes, F44000 France

²CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITUN, Nantes, F44000
France

³Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France

⁴INSERM, UMR 676, Paris, France

⁵INSERM, U842, Lyon F-69372 France ; Université Lyon 1, UMR-S892 Lyon, F-69003 France

Ectopic Expression of the Immune Adaptor Protein CD3zeta in Neural Stem/Progenitor Cells Disrupts Cell-Fate Specification

Julie Angibaud · Stéphane J. Baudouin · Antoine Louveau ·
 Véronique Nerrière-Daguin · Virginie Bonnamain · Zsolt Csaba · Pascal Dournaud ·
 Philippe Naveilhan · Nelly Noraz · Véronique Pellier-Monnin · Hélène Boudin

Received: 26 May 2011 / Accepted: 20 July 2011 / Published online: 2 August 2011
 © Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Immune signaling and neuroinflammatory mediators have recently emerged as influential variables that regulate neural precursor/stem cell (NPC) behavior and function. In this study, we investigated whether the signaling adaptor protein CD3 ζ , a transmembrane protein involved in T cell differentiation and function and recently shown to regulate neuronal development in the central nervous system (CNS), may have a role in NPC differentiation. We analyzed the expression profile of CD3 ζ in embryonic rat brain during neurogenic periods and in neurosphere-derived neural cells, and we investigated the action of CD3 ζ on cell differentiation. We found that CD3 ζ expression coincided with neuronal commitment, but its forced expression in NPCs prevented the production of neurons and oligodendrocytes, but not astroglial cells. This blockade of neuronal differentiation was operated through an ITAM-independent mechanism, but required the Asp36

of the CD3 ζ transmembrane domain involved in membrane receptor interaction. Together, our findings show that ectopic CD3 ζ expression in NPCs impaired their normal cell-fate specification and suggest that variations of CD3 ζ expression in the developing CNS might result in neurodevelopmental anomalies.

Keywords Neuronal differentiation · Neurosphere · Neurogenesis · Neural stem cell · Neuroimmunology · Neuroinflammation

Abbreviations

NPC Neural precursor/stem cell
 DIV Day in vitro
 TCR T cell receptor
 ITAM Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
 CNS Central nervous system

J. Angibaud · S. J. Baudouin · A. Louveau · V. Nerrière-Daguin ·
 V. Bonnamain · P. Naveilhan · H. Boudin
 UMR 643, INSERM,
 Nantes 44000, France

J. Angibaud · S. J. Baudouin · A. Louveau · V. Nerrière-Daguin ·
 V. Bonnamain · P. Naveilhan · H. Boudin
 Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation,
 ITUN, CHU Nantes,
 Nantes 44000, France

J. Angibaud · S. J. Baudouin · A. Louveau · V. Nerrière-Daguin ·
 V. Bonnamain · P. Naveilhan · H. Boudin
 Faculté de Médecine, Université de Nantes,
 Nantes 44000, France

Z. Csaba · P. Dournaud
 UMR 676, INSERM,
 Paris, France

N. Noraz · V. Pellier-Monnin
 U842, INSERM,
 Lyon 69372, France

N. Noraz · V. Pellier-Monnin
 UMR-S842, Université Lyon 1,
 Lyon 69003, France

H. Boudin (✉)
 UMR643, INSERM,
 30 Bld Jean Monnet,
 Nantes 44093, France
 e-mail: helene.boudin@univ-nantes.fr

Present Address:
 S. J. Baudouin
 Biozentrum Universität Basel,
 Basel 4056, Switzerland

Introduction

Neural stem/progenitor cells (NPCs) are present throughout brain development and persist in the adult brain in particular zones such as the subventricular zone and the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus (Emsley et al. 2005). NPCs are self-renewing multipotent cells capable of differentiating into neurons, astrocytes and oligodendrocytes and represent therefore good candidates for developing therapeutic strategies to repair the injured central nervous system (CNS) (Erlandsson and Morshead 2006). NPCs can be expanded *in vitro* in the presence of growth factors to form neurospheres, free-floating colonies composed of cells that display the cardinal stem cell properties of self-renewal and multipotency (Reynolds and Weiss 1992). The great therapeutic potential of NPCs for brain repair has led to much interest in identifying extrinsic cues and signaling pathways that regulate their kinetics and fate. Immune signaling and neuroinflammatory mediators have recently emerged as influential variables that regulate NPC behavior and function (Ziv et al. 2006; Carpentier and Palmer 2009; Molina-Holgado and Molina-Holgado 2010). NPCs express several immune-relevant molecules such as costimulatory molecules CD80/CD86 (Imitola et al. 2004a), major histocompatibility complex molecules (Popa et al. 2011), chemokine receptors (Imitola et al. 2004b; Tran et al. 2007; Barkho et al. 2008) and Toll-like receptors (Rolls et al. 2007; Lathia et al. 2008) that play important roles in regulating proliferation, cell-fate choices, migration and survival. Moreover, the contribution of inflammation in neurodegenerative diseases and brain injury (Donnelly and Popovich 2008; Hirsch and Hunot 2009) supports the importance of neuroimmune signaling cross-talk between NPCs and brain pathologies/repair and underlines the need to better understand how immune signaling controls NPC fate and function. We therefore sought to investigate whether the signaling adaptor protein CD3zeta (CD3 ζ), a transmembrane protein involved in T cell differentiation and function and recently shown to regulate neuronal development and synaptic plasticity in the CNS (Huh et al. 2000; Barco et al. 2005; Baudouin et al. 2008), may have a role in NPC differentiation. CD3 ζ functions as a key signaling module for the T cell receptor (TCR) in T lymphocytes and for the low-affinity Fc receptor CD16 and the family of activating receptors NKp30/NKp60 receptors in NK cells (Lanier 2001; Pitcher and van Oers 2003). CD3 ζ contains in its cytoplasmic domain three immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs), which, upon tyrosine phosphorylation by an Src family protein tyrosine kinase, recruit ZAP-70/Syk tyrosine kinase family that, in turn, triggers several downstream signaling cascades, leading to T cell activation (Wange and Samelson 1996). In the CNS, CD3 ζ is mainly expressed by neurons. Its neuronal

function, only investigated to date at late developmental stages, was shown to regulate dendrite formation and synaptic connectivity during neuronal maturation (Baudouin et al. 2008; Xu et al. 2010). The expression pattern of CD3 ζ during neurogenesis and its potential action on early steps of neuronal differentiation have never been explored. In this study, we analyzed the expression profile of CD3 ζ in embryonic rat brain during neurogenic periods and in neurosphere-derived neural cells and investigated the action of CD3 ζ on neurogenesis.

Materials and Methods

All protocols were carried out in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals (Agreement #75-669).

Slice Preparation of Rat Brain Embryos

Sprague Dawley rats were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest Saint Isle, France). Pregnant females were sacrificed by cervical dislocation and the abdominal cavity was opened to remove embryos. Brains of embryos were quickly dissected and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.12 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, overnight at 4°C. Brains were cryoprotected for 2 days in 10% sucrose in PB at 4°C and next immersed in a solution of 7.5% gelatin and 10% sucrose in PB for 1 h at 37°C. They were then embedded in a block of the same solution for 1 h at 4°C. Brains were frozen in liquid isopentane at -70°C and stored at -80°C until sectioning. Coronal sections (thickness of 10 μ m) were cut on a cryostat, collected on Superfrost plus slides (Microm Microtech, Francheville, France) and processed for immunofluorescence.

Plasmid Constructs

Several plasmids encoding rat wild-type or mutant CD3 ζ fused at the C terminus with EGFP (Invitrogen) were produced. The wild-type and ITAM mutant forms of CD3 ζ containing the six tyrosine residues substituted by phenylalanine in the three ITAMs (CD3 ζ -6Y6F-EGFP) were constructed as previously described (Baudouin et al. 2008). The CD3 ζ mutant with the aspartic acid at position 36 substituted by a valine (CD3 ζ -D36V-EGFP) was created by site-directed mutagenesis using 100 ng of the following primer bearing the mutation, 5'-TGCTATATGC TAGTTGGAATCCTCTTC-3', mixed with 50 ng of CD3 ζ -EGFP cDNA template. The reaction was performed using the QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's instructions. All of the CD3 ζ cDNA constructs

were confirmed by sequencing. A membrane-associated form of GFP (mGFP) was produced by the addition of the GAP43 membrane anchoring signal as previously described (Moriyoshi et al. 1996).

Cell Cultures

Culture of NPCs and Transfection

Cultures of NPCs from E15 Sprague–Dawley rat brain were established as previously described (Sergent-Tanguy et al. 2006). Briefly, tissues freed of meninges were incubated with 0.25% trypsin for 15 min at 37°C. Following the addition of 10% fetal calf serum (FCS, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), tissues were exposed to 10 µg/ml of DNase I prior to mechanical trituration. Aggregates were removed by decantation, and cells were further purified from small debris by centrifugation. Cells were resuspended in medium composed of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/Ham's F12 (1/1, v/v), 33-mM glucose, 5-mM HEPES (pH 7.2), 100-µg/ml streptomycin and 100-U/ml penicillin (serum free medium), supplemented with 10% FCS (serum-supplemented medium) and plated in a dish for one night. On the following day, the floating cells were recovered, washed and resuspended in the serum-free medium supplemented with N2 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were then plated in uncoated dishes and expanded as neurospheres for 10 days (including a passage at day 7) in the presence of 25-ng/ml basic fibroblast growth factor (b-FGF) in serum-free medium supplemented with N2. Neurospheres were then collected, enzymatically dissociated with trypsin-EDTA and mechanical trituration to give a single-cell suspension. Cells were plated at a density of 2×10^5 cells/cm² on poly-L-ornithine-coated coverslips (50 µg/ml, Sigma) in serum-supplemented medium for 2 h. This procedure resulted in a cell culture containing undifferentiated nestin-positive cells (60.0±2.2%), neurons (9.9±1.0%), astrocytes (15.5±2.4%) and oligodendrocytes (10.9±1.3%) as quantified from $n=200$ –1,000 cells following specific immunolabelings for each cell type (see the following discussion). For transfection experiments, NPC cultures were prepared from embryonic mouse brain instead of rat because transfection efficiency was higher with the former. The whole brain was removed from E13 C57BL/6 mouse and processed as described for rat. After dissociation, 5×10^6 cells were transfected according to the manufacturer's instruction by nucleofection using 100 µl of the nucleofactor solution (Amaxa Biosystems) and 4 µg of plasmid encoding CD3ζ-EGFP, mGFP or EGFP. Cells were subsequently plated at 2.5×10^5 cells/cm² on poly-L-ornithine-coated coverslips in serum-supplemented medium overnight and remained for 1, 3 or 5 days in the serum-free medium supplemented with N2. This proce-

dure resulted in a transfection efficiency of $5.3 \pm 0.5\%$ of total cells. Cells were then fixed with 4% PFA and 4% sucrose in PBS for 15 min at room temperature (RT) and labeled by immunofluorescence.

Culture of Hippocampal Neurons and Transfection

Rat hippocampal cultures were prepared from E18 Sprague–Dawley embryos by previously described methods (Baudouin et al. 2006). Briefly, hippocampi were dissected and dissociated by 0.25% trypsin and trituration. Dissociated cells (3.0×10^5) were mixed with 3 µg of either EGFP, CD3ζ-EGFP CD3ζ-6Y6F-EGFP or CD3ζ-D36V-EGFP and 3 µl of lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) in a serum and streptomycin-free MEM containing N2 supplements. After 60 min of incubation, cells were plated at 10×10^3 cells/cm² on glass coverslips coated with poly-L-lysine (1 mg/ml, Sigma) in neuronal plating medium composed of MEM containing 10% FCS, 0.6% D-glucose, 100-µg/ml streptomycin, 100-U/ml penicillin and 1-mM sodium pyruvate. The cells were allowed to attach on coverslips before being transferred to a dish containing a glial feeder layer prepared from newborn Sprague–Dawley rat forebrains. Briefly, forebrains were dissected and dissociated by 0.25% trypsin and 0.01% DNase, and the cells were plated at a density of 35×10^3 cells/cm² in MEM containing 10% FCS, 0.6% D-glucose, 100-µg/ml streptomycin and 100-U/ml penicillin. The transfection procedure resulted in a $0.03\% \pm 0.02\%$ transfection efficiency. The medium was replaced with serum-free MEM containing N2 supplements 24 h before the neuron culture. Neurons were fixed at the indicated time in 4% PFA and 4% sucrose in PBS for 15 min.

Immunostaining

Brain Sections

Sections were permeabilized for 30 min at room temperature (RT) in PBS containing 0.3% Triton X-100 and incubated for an additional 60 min in blocking buffer (5% bovine serum albumin (BSA) and 5% normal goat serum (NGS) in PBS) containing 0.1% Triton X-100. For double immunofluorescence labeling, sections were incubated overnight at 4°C with rabbit CD3ζ antibody (Spring Bioscience, 0.2 µg/ml) and either βIII-tubulin (Tuj1, clone SDL3D10, Sigma, 2.1 µg/ml), neuronal nuclear antigen A60 (NeuN, clone A60, Chemicon, 5 µg/ml) or Ki67 antigen (Ki67, clone B56, Pharmingen, 0.5 µg/ml) antibodies diluted in PBS containing 5% NGS. After three washes in PBS, appropriate FITC- or Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) diluted in blocking solution were applied for 90 min at RT. Sections were washed three times and nuclear staining was

performed with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 1.6 $\mu\text{g/ml}$) before mounting slices in Fluoroprep (BioMérieux, Lyon, France). For control experiments, samples were treated following the same procedure but primary antibodies were omitted.

Cultured NPCs and Neurons

After fixation, NPCs were permeabilized for 5 min at RT in 0.25% Triton X-100 in PBS, and nuclear staining was performed with DAPI for 5 min at RT. After washing, NPCs were incubated for 30 min at 37°C in PBS containing 10% BSA and then overnight at 4°C with CD3 ζ antibody (Spring Bioscience, 0.2 $\mu\text{g/ml}$) diluted in PBS containing 3% BSA and 0.02% azide mixed with one of the following antibody: glial fibrillary acidic protein (GFAP, clone GA5, Sigma, 6.4 $\mu\text{g/ml}$) for astrocytes, anti-RIP (Developmental Studies Hybridoma Bank, 7.6 $\mu\text{g/ml}$) for oligodendrocytes, β III-tubulin (Tuj1, clone SDL3D10, Sigma, 2.1 $\mu\text{g/ml}$) for neurons or nestin (clone rat 401, Phammingen, 1 $\mu\text{g/ml}$) for undifferentiated cells. After washing, cells were incubated for 45 min at 37°C with FITC-conjugated donkey anti-rabbit (7.5 $\mu\text{g/ml}$) and/or Alexa Fluor568-goat anti-mouse (2 $\mu\text{g/ml}$) diluted in PBS containing 3% BSA and 0.02% azide. Cells were washed in PBS before mounted with Vectashield (AbCys, Paris, France) on glass slides for analysis on an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss). Pictures were acquired with 63 \times objective using a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss) driven by AxioVision Release 4.2 software. Images were processed and prepared for printing using Adobe Photoshop.

The same procedure was used for 0 and 3 DIV hippocampal neuron culture using anti-tau antibody as primary antibody (1.7 $\mu\text{g/ml}$, Dako).

Phenotype Analysis of Cells Derived from NPC Cultures

To determine the phenotype of CD3 ζ -expressing cells derived from NPC culture, each CD3 ζ -positive cell was defined as neuron, oligodendrocyte, astrocyte or nestin-positive cell according to the immunostaining for Tuj1, RIP, GFAP and nestin, respectively. A total of 523 CD3 ζ -positive cells were counted from four independent experiments. To analyze the morphology of Tuj1⁺/CD3 ζ ⁻ and Tuj1⁺/CD3 ζ ⁺ cells derived from NPCs, the cells were classified in two groups: smooth round-shaped cells and cells exhibiting at least one protrusion. A total of 155 cells were analyzed from three independent experiments, and the results were presented as percentage \pm SEM. To determine the number of neurons, oligodendrocytes, astrocytes and nestin-positive cells generated from NPCs transfected with mGFP, CD3 ζ -EGFP, CD3 ζ -6Y6F-EGFP or CD3 ζ -D36V-EGFP, coverslips immunostained for the appropriate cell marker were systematically

Fig. 1 Distribution of CD3 ζ immunoreactivity in the embryonic rat brain. In the cerebral cortex (A–A') and hippocampus (B–B') of E16 rat embryos, CD3 ζ immunoreactivity (A, B) was detected in the CP/MZ and SP/IZ but absent from the proliferative VZ labeled with the dividing cell marker Ki67 (A', B'; green). Double immunolabeling of E15–E16 rat brains with CD3 ζ antibody and the neuronal markers Tuj1 (C–C') and NeuN (D–D') indicated that CD3 ζ is restricted to postmitotic neurons. In the anlage of the olfactory bulbs, CD3 ζ immunoreactivity largely overlaps with Tuj1-labeled neuronal cell bodies (E–E'). Cell nuclei are labeled with DAPI (blue). CP cortical plate, DA dentate area, IZ intermediate zone, MZ marginal zone, SP subplate, VZ ventricular zone. Scale bars A, B and D 150 μm ; C 30 μm

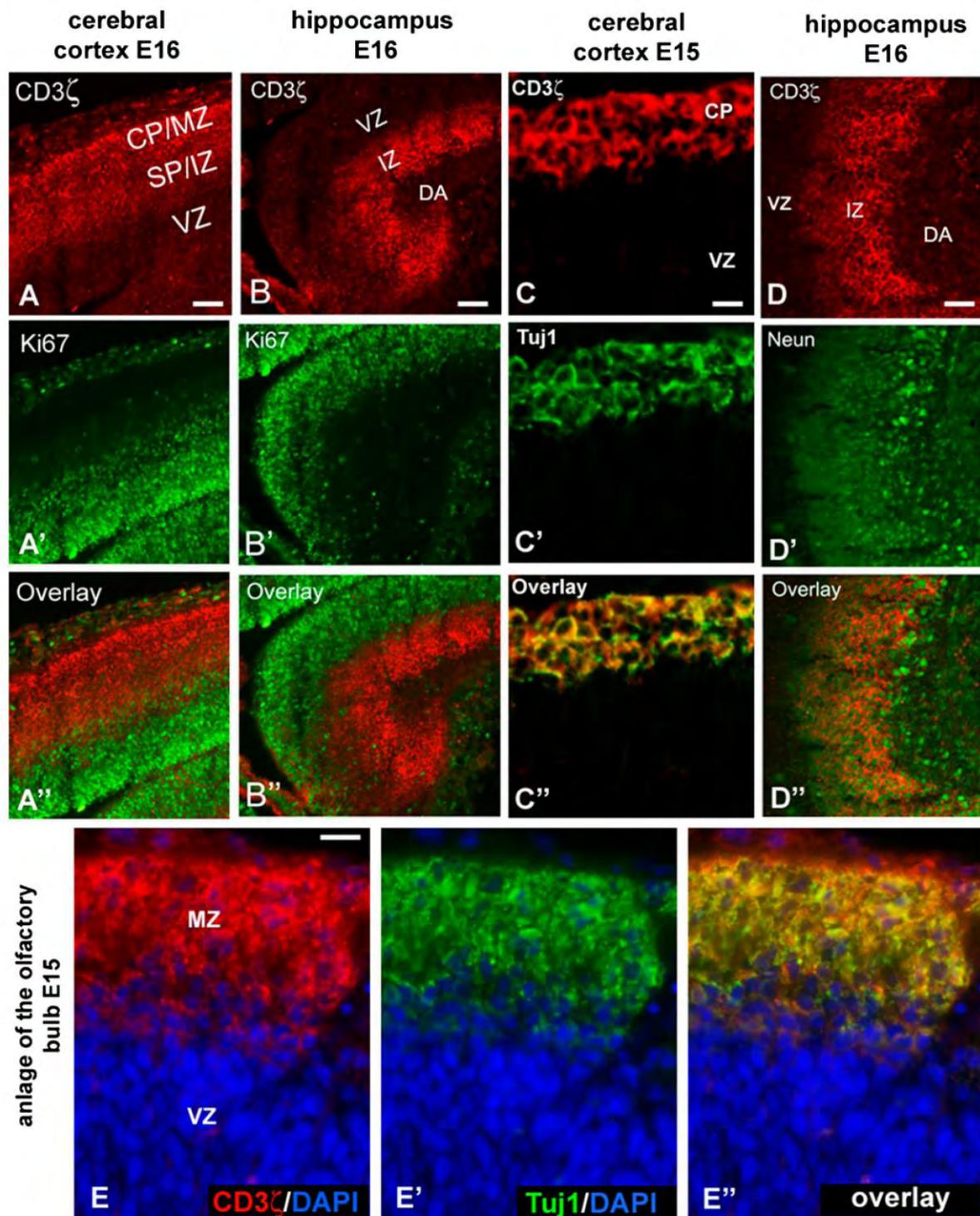
scanned with a 10 \times lens, and the phenotype of each transfected cell ($n=200$ per experiment) was scored and normalized to the total number of nucleus labeled with DAPI. Results were presented as percentage of total counted cells \pm SEM from two to five experiments. Data analysis was performed using Excel and GraphPad Prism 4, and statistical analysis was done by Student's t test.

Quantification of Neuronal Survival upon Transfection

To determine the effect of CD3 ζ -EGFP transfection on neuronal survival, the number of healthy transfected neurons from E18 rat brain culture was counted at 0 and 3 DIV. The neuronal health was assessed by morphology analysis and tau staining. Quantification was performed in two coverslips from two experiments. In each coverslip, the number of cells was recorded in eight fields randomly chosen with a 20 \times objective. The same procedure was achieved with mGFP-transfected neurons as control. Results were expressed as percentage of control. Data analysis was performed using Excel and GraphPad Prism 4, and statistical analysis was done by Mann Whitney and Student's t test.

Results

The distribution of CD3 ζ immunoreactivity was studied in embryonic rat brain sections by immunofluorescence during the neurogenic period E15–E16. Sections from the cerebral cortex and hippocampus of E16 animals costained for CD3 ζ and Ki67, a marker of dividing cells, indicated that CD3 ζ was excluded from the proliferative ventricular zone (VZ), demonstrating the lack of CD3 ζ expression in proliferative neural precursor cells (NPCs) (Fig. 1a, b). By contrast, extensive colocalization of CD3 ζ immunoreactivity with the neuronal nuclear antigen A60 (NeuN) or β III-tubulin (Tuj1), two neuron-specific and early differentiation markers, was observed in several brain areas, including the cerebral cortex (Fig. 1c), the hippocampus (Fig. 1d) and the anlage of the olfactory bulb (Fig. 1e), indicating that CD3 ζ -expressing cells were mostly postmitotic neurons.



We next examined CD3 ζ expression profile in neurosphere-derived neural cells to precisely study CD3 ζ ,

expression during neurogenesis. Rat NPCs were grown as neurospheres, free-floating cellular aggregates of prolifera-

tive multipotent cells that produce neuronal and glial cells under the appropriate differentiating conditions (Reynolds and Weiss 1992). The phenotype of CD3 ζ -expressing cells was analyzed in dissociated neurospheres at 2 h of differentiation, the earliest time point for which newly generated neurons and glia were detected. Cells were double immunolabeled for CD3 ζ and nestin (undifferentiated NPCs), GFAP (astrocytes), RIP (oligodendrocytes) or Tuj1 (neurons) (Fig. 2a). We found that 90.3 \pm 3.3% of CD3 ζ -expressing cells were immunopositive for Tuj1, while the remaining was distributed in minor proportions

between nestin-, GFAP- and RIP-positive cells (Fig. 2a). Conversely, 84.4 \pm 4.2% of Tuj1-positive cells were also immunolabeled for CD3 ζ . Thus, as observed in vivo, CD3 ζ was mainly expressed by newly born neurons. At this precocious stage of NPC differentiation, two distinct populations of recent postmitotic Tuj1-positive cells were observed: smooth round-shaped cells, corresponding to the most immature stage, and cells showing the first sign of morphological polarization exemplified by a short protrusion (Fig. 2b). To determine whether CD3 ζ was preferentially expressed by one of those two classes of Tuj1-positive

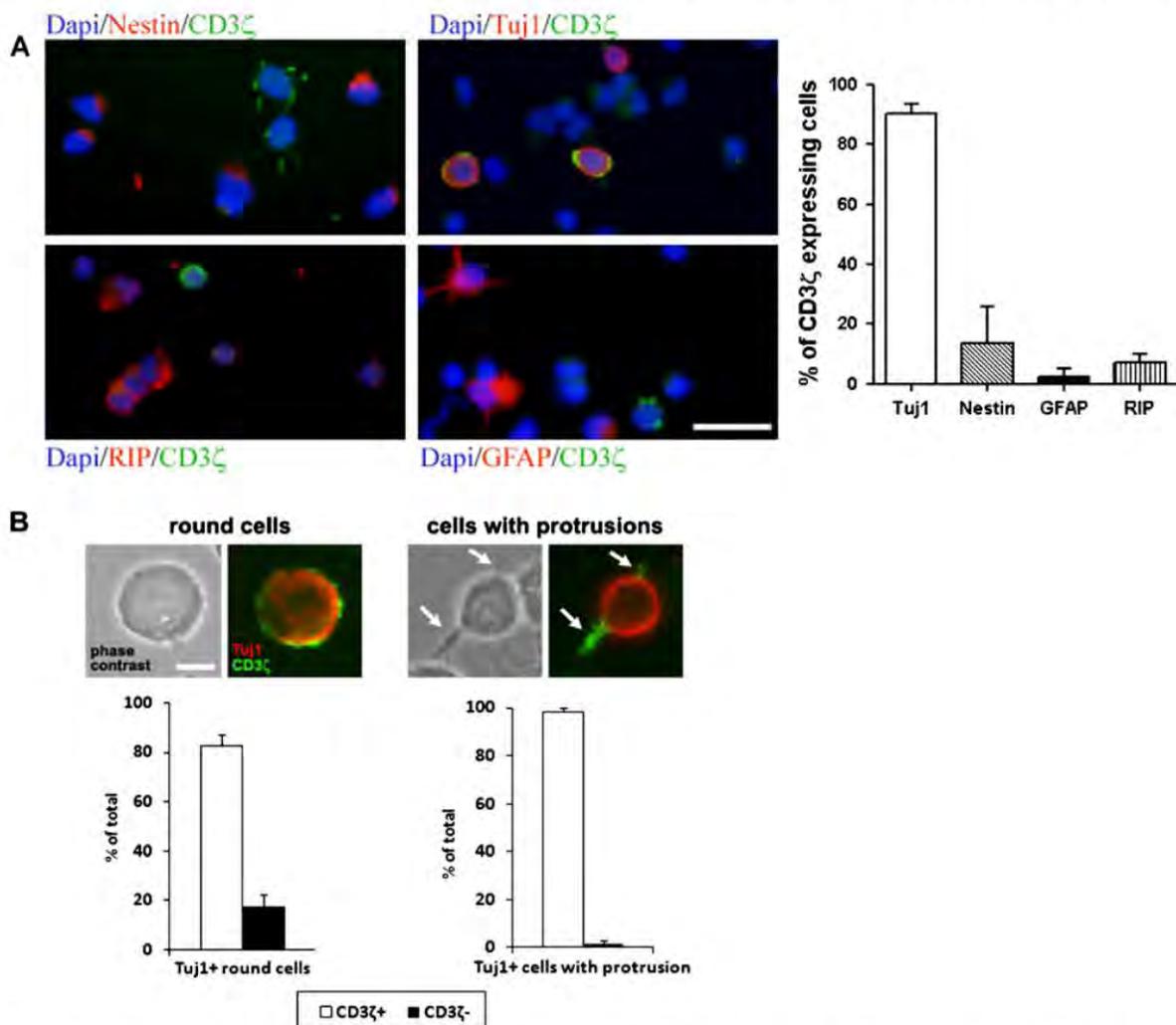


Fig. 2 CD3 ζ expression profile in neurosphere-derived neural cells: dominant expression in newly differentiated neurons. **a** Rat NPCs cultured as neurospheres were dissociated, plated on glass coverslips and fixed 2 h later for double immunofluorescent labeling for CD3 ζ (green) and the markers (red) of undifferentiated NPCs (nestin), neurons (Tuj1), oligodendrocytes (RIP) and astrocytes (GFAP). Quantification is presented as percentage (mean \pm SEM) of CD3 ζ -

expressing cells ($n=523$) analyzed from four independent experiments. Scale bar 20 μ m. **b** Representative pictures illustrating neuronal-cell-derived NPCs with either a smooth round shape or nascent protrusions (arrows). Quantification of Tuj1-positive cells at 2-h postdifferentiation that exhibited a smooth round cell body or protrusions. Data are presented as percentage (mean \pm SEM) of 155 cells analyzed from three independent experiments. Scale bars 3 μ m

cells, the number of Tuj1⁺/CD3ζ⁺ and Tuj1⁺/CD3ζ⁻ cells that exhibited a short emerging extension was quantified (Fig. 2b). Among the Tuj1-positive round cells, 82.5±4.8% of them were immunopositive for CD3ζ, suggesting that CD3ζ expression started before neurons entered the morphological polarization program. Among the Tuj1-positive cells exhibiting a short protrusion, almost all of them were also immunopositive for CD3ζ (98.4±1.5%), indicating that CD3ζ expression continued during the morphological differentiation.

The finding that CD3ζ expression coincided with neuronal commitment lets us to hypothesize that a forced expression of CD3ζ in NPCs might favor neuronal differentiation by promoting intracellular signaling pathways required to produce neurons from NPCs. We thus tested whether CD3ζ expression induced by transfection in NPCs would favor neurogenesis. Neurosphere cultures were prepared from mouse instead of rat embryos because higher transfection efficiency was obtained in mouse cells. Forced CD3ζ expression was achieved in mouse dissociated neurospheres by transfection with CD3ζ-EGFP, and the

number of Tuj1-positive neurons was quantified at 3 days of differentiation. Control conditions consisted in neurospheres transfected with either the parental EGFP empty vector or a membrane-associated form of GFP (mGFP). Transfection of NPCs with CD3ζ-EGFP severely impaired neuron production compared to control mGFP-transfected cells (2.7±2.6% of control; $n=3$ cultures; $p<0.01$; Fig. 3a, b). Nontransfected cells grown on the same coverslips were not affected and developed normally in neurons, indicating a cell autonomous effect of CD3ζ-EGFP expression (112.4±19.7% of control mGFP-transfected cells; $n=2$ cultures; $p=0.3$; Fig. 3a, c). We also observed that forced expression of CD3ζ-EGFP severely suppressed oligodendrocyte differentiation (5.8±2.5% of control; $n=3$ cultures; $p<0.001$), slightly increased the number of astrocytes (134.6±10.7% of control; $n=2$ cultures; $p<0.05$) and did not affect nestin-positive cell number (117.6±13.1% of control; $n=2$ cultures; $p=0.16$; Fig. 3d) compared to mGFP-transfected neurospheres. The low number of neuronal cells observed upon CD3ζ expression in NPCs might result from either a failure in maintaining a Tuj1 phenotype up to 3 days in vitro (DIV) or

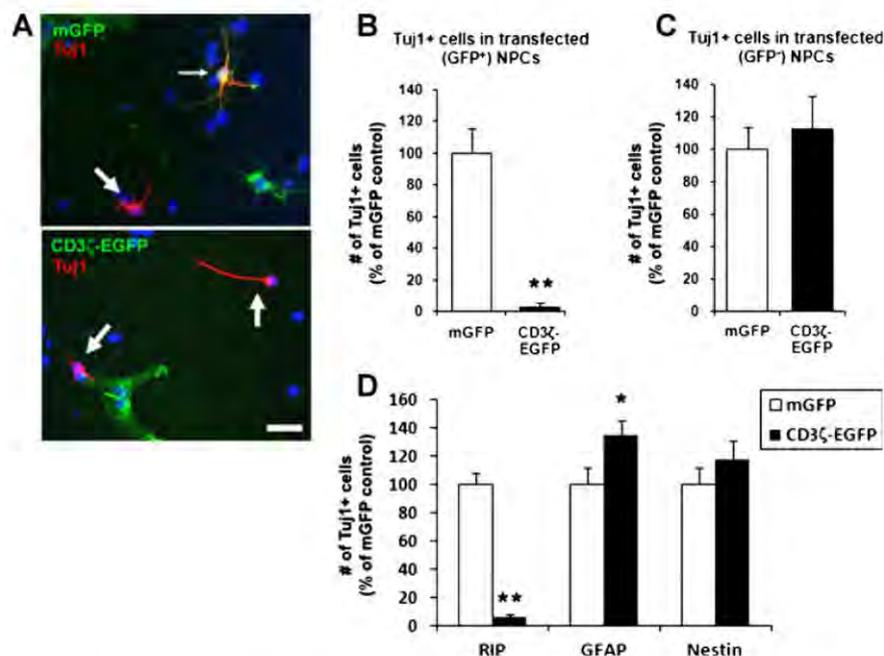


Fig. 3 Forced expression of CD3ζ in NPCs impairs neuronal differentiation. **a** Immunofluorescence for mGFP or CD3ζ-EGFP (green) and Tuj1 (red) in dissociated NPCs transfected with mGFP or CD3ζ-EGFP and cultured for 3 DIV. The small arrow denotes the presence of neurons derived from mGFP-transfected NPCs, while virtually no neurons were formed from CD3ζ-EGFP-transfected NPCs. Nontransfected cells grown on the same coverslips were not affected and developed normally in neurons (large arrows). Scale bars 50 μm. **b** Quantification of the number of transfected Tuj1-positive neurons in experiments similar to **a**. Data are expressed as percentage

of control (mean ± SEM) from three experiments; ** $p<0.01$ (Student's *t* test) compared to mGFP transfection. **c** Quantification of the number of nontransfected Tuj1-positive neurons in experiments similar to **a**. Data are expressed as percentage of control (mean ± SEM) from two experiments. **d** Quantification of the number of transfected RIP-, GFAP- or nestin-positive cells at 3 DIV. Oligodendrocyte differentiation was impaired in CD3ζ-EGFP-transfected cells compared to control cells transfected with mGFP. Data are expressed as percentage of control (mean ± SEM); * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Student's *t* test) compared to mGFP transfection

a delay in triggering the neuronal differentiation program. To respectively test these two hypotheses, the number of CD3 ζ -expressing NPC-derived neurons was determined at shorter (1 day) and longer times of differentiation (5 days). Similarly, as observed at 3 days of differentiation, the amount of Tuj1⁺ neurons was strongly reduced at 1 and 5 days of differentiation (Fig. 4a), suggesting that the deficiency of CD3 ζ -expressing NPCs to generate neuronal cells was independent on the duration of culture. The finding that ectopic expression of CD3 ζ -EGFP in NPCs did not affect the number of nestin-positive cells suggested that CD3 ζ had no detrimental influence on nestin-positive cell survival. By contrast, the low amount of neurons produced by CD3 ζ -EGFP-transfected NPCs might result from a robust neuronal death occurring just after neuronal commitment. To address this possibility, we analyzed the morphology of the cell's nuclei by DAPI labeling. Nuclei are considered to have a normal phenotype when glowing bright and homogeneously, while apoptotic nuclei can be identified by their fragmented morphology. No effect on the cell's nuclei morphology was observed in any of the studied cell types upon CD3 ζ transfection as compared to mGFP transfection, suggesting that CD3 ζ overexpression did not induce cell death. However, to confirm that the low proportion of NPC-derived neurons upon CD3 ζ transfection was attributable to a blockade of neurogenesis and not to an additional effect on precocious neuronal cell death which could have been unnoticed by the cell's nuclei morphology analysis, we tested the effect of CD3 ζ overexpression on neuronal cell death in a model of postmitotic neurons. Neurons were cultured from E18 rat brain to overcome the potential influence of CD3 ζ on neurogenesis and therefore to accurately study the effect of CD3 ζ on neuronal survival. Neurons freshly dissociated were transfected with mGFP or

CD3 ζ -EGFP, plated on glass coverslips, and the number of living transfected cells was quantified 3 days later. Although a decrease in the number of transfected neurons was observed between 0 and 3 DIV, likely attributable to the transfection procedure itself, no difference was observed between the number of mGFP- and CD3 ζ -transfected neurons whatever the time of culture is, suggesting that overexpression of CD3 ζ had no significant effect on neuronal survival (Fig. 4b). Altogether, these data suggest that forced expression of CD3 ζ blocks normal differentiation of the affected neural progenitor cells.

To gain insights into the molecular mechanisms involved in the inability of CD3 ζ -transfected NPCs to differentiate into neurons, two CD3 ζ constructs containing mutation or deletion of functional domains were generated, and their capacity to promote or inhibit neuronal differentiation was compared to full-length CD3 ζ (Fig. 5). In the CD3 ζ -6Y6F construct, the six Tyr of the ITAMs were substituted into Phe residues, therefore converting CD3 ζ into an ITAM-deficient form that lost the ability to be tyrosine-phosphorylated (Lowin-Kropf et al. 1998; van Oers et al. 2000). The CD3 ζ -D36V construct was created by site-directed mutagenesis to substitute Asp36 to a Val residue. This Asp residue has been shown to be required for the transmembrane interaction of CD3 ζ with associated receptors such as the TCR alpha chain in T cells and CD16 in NK cells (Lanier et al. 1991; Call et al. 2002). Although the CD3 ζ -associated receptors have not yet been characterized in the nervous system, the importance of Asp36 is likely to be conserved for functional interaction with its cognate receptor. Each construct fused to EGFP was transfected by electroporation in dissociated neurospheres, and the resulting cell suspension was plated on glass coverslips and left to differentiate for 3 days before Tuj1 immunostaining to quantify the number of neurons generated

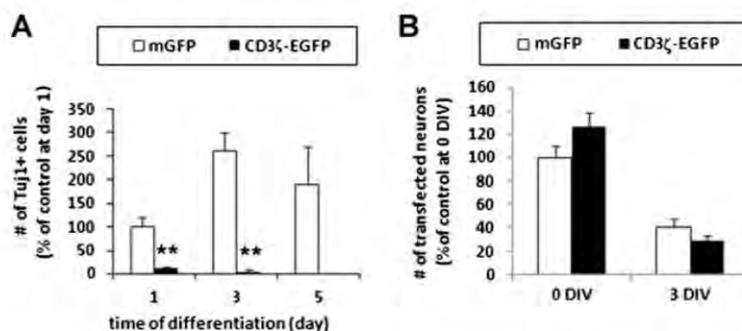


Fig. 4 The impairment of CD3 ζ -expressing NPCs to produce neurons is independent of time culture. **a** Mouse dissociated NPCs transfected with mGFP or CD3 ζ -EGFP were allowed to differentiate for 1, 3 and 5 DIV and immunolabeled for Tuj1. The number of Tuj1-positive cells was quantified at each time point. Data are presented as percentage of Tuj1⁺ cells at 1 day of differentiation relative to control mGFP transfection \pm SEM from three experiments. ** p <0.01 (Student's t

test) compared to NPC mGFP transfection. **b** Quantification of the number of transfected neurons prepared from E18 rat brain. Neurons were transfected at 0 DIV, and quantification was performed at 0 and 3 DIV. For each time point, no difference is observed between the number of mGFP- and CD3 ζ -EGFP-transfected neurons. Data are presented as percentage of total mGFP-transfected neurons at 0 DIV \pm SEM of 40–100 cells analyzed from two experiments

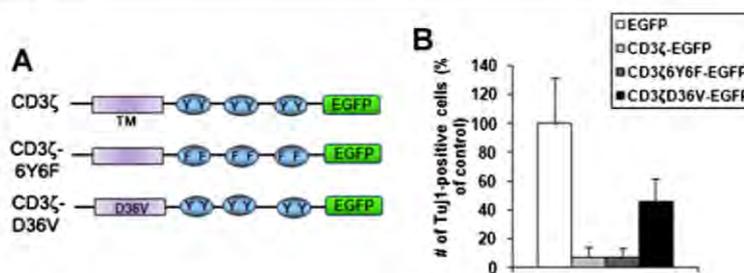


Fig. 5 CD3 ζ -induced blockade of neuronal differentiation required the Asp36 of CD3 ζ transmembrane domain. **a** Schematic representation of the three CD3 ζ constructs. For CD3 ζ -6Y6F-EGFP, the six tyrosine residues of the ITAMs were mutated in alanine. For CD3 ζ -D36V-EGFP, the aspartic acid residue located in the transmembrane domain was substituted by a valine. *TM* transmembrane domain. **b**

Dissociated NPCs transfected with EGFP, CD3 ζ -EGFP, CD3 ζ -6Y6F-EGFP or CD3 ζ -D36V-EGFP were cultured for 3 DIV and immunostained for Tuj1. The histogram shows the quantification of the number of transfected Tuj1-positive neurons. Data are expressed as percentage of control (mean \pm SEM) from two to five experiments

in each condition. NPC transfection with CD3 ζ -6Y6F-EGFP produced as few neurons as with CD3 ζ -EGFP compared to control cells transfected with the parental empty vector EGFP (CD3 ζ -EGFP, $7.1 \pm 7.0\%$ of control; CD3 ζ -6Y6F-EGFP, $6.5 \pm 7.0\%$ of control; $n=4$ cultures; $p<0.05$). By contrast, NPCs transfected with CD3 ζ -D36V-EGFP showed a moderate reduction in the number of neurons compared to control cells transfected with the parental empty vector EGFP ($46.1 \pm 15.4\%$ of control; $n=2$ cultures; $p=0.27$). These results suggest that the blockade of neuronal differentiation induced by CD3 ζ overexpression was operated through an ITAM-independent mechanism but likely required, at least partially, the interaction of CD3 ζ with a yet unknown membrane partner. Altogether, these data showed that forced CD3 ζ expression in NPCs disrupted cell-fate specification.

Discussion

Our study showed a lack of CD3 ζ protein expression in proliferative areas of E15–E16 embryonic rat brains but an abundant expression in brain regions containing postmitotic neurons such as in the cerebral cortex, hippocampus and anlage of olfactory bulbs. Accordingly, we found in a neurosphere culture model that CD3 ζ immunoreactivity was mostly absent in nestin-positive NPCs but largely detected in newly born neurons shortly after their differentiation, as shown by the concomitant expression of CD3 ζ with the early neuronal marker Tuj1. This observation implies that CD3 ζ was probably not involved in NPC proliferation and survival or in the initial cell-fate decision, but could however play a role in the maintenance of a neuronal phenotype shortly after NPC differentiation.

When ectopic expression of CD3 ζ was achieved in NPCs, major alterations of cell-fate specification were observed. Manipulation of protein expression levels by cell transfection with cDNA often revealed a helpful tool in

understanding the potential biological functions and therapeutic application of a given protein. However, overexpression approaches, although very informative, should be carefully interpreted since nonphysiological effects might also occur. We found that ectopic expression of CD3 ζ in NPCs prevented neurogenesis and caused a coincident small increase in astrocyte number. The modification in the ratio of neurons versus astrocytes as a consequence of CD3 ζ ectopic expression might result from perturbations in intracellular signaling pathways and gene expression involved in neural cell-fate specification (Guillemot 2007). For instance, Hes1 gene, a repressor-type of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor, has dual activities in neural progenitors by inhibiting neurogenesis and promoting astrocyte formation (Kageyama et al. 2008). Hes1 is a major transcriptional downstream target of the Notch pathway (Kageyama et al. 2008). In immune cells, Notch activation is induced upon TCR-CD3 engagement through the ligation of anti-CD3 antibody (Fiorini et al. 2009). One possibility is that CD3 ζ overexpression in NPCs would activate a Notch–Hes1 signaling pathway, leading to a blockade of neuronal differentiation and facilitation of gliogenesis.

CD3 ζ -induced blockade of neuronal differentiation was observed even when the tyrosine residues of ITAMs were mutated into nonphosphorylatable motifs, suggesting that CD3 ζ -induced blockade of neuronal differentiation operated through an ITAM-independent mechanism. In T cells, CD3 ζ regulates the trafficking and cell surface expression of the TCR through an ITAM-independent mechanism (Sussman et al. 1988; Shores et al. 1994; D'Oro et al. 2002). In this case, the transport of newly assembled TCR, endocytosis of surface receptors and recycling to the plasma membrane of internalized receptors are regulated by the extracellular and transmembrane domains of CD3 ζ . One possibility is that the ectopic expression of CD3 ζ in NPCs might affect the trafficking or cell surface expression of receptors and signaling proteins that would, in turn,

impact on cell differentiation. This possibility is strengthened by the fact that CD3 ζ -induced blockade of neurogenesis was partially alleviated with CD3 ζ -D36V-GFP, a CD3 ζ mutant that exhibited impaired transmembrane interaction with associated membrane receptors, and a weaker homodimerization propensity (Lanier et al. 1991; Call et al. 2002; Call et al. 2006). Together, these data suggest that the reduced neuronal differentiation triggered by CD3 ζ expression in NPCs did not require the classical ITAM-based signaling pathway but likely depended on CD3 ζ interactions with membrane receptors. Besides the TCR and the low-affinity Fc receptor CD16, which are not reported to be expressed by neural cells, CD3 ζ has been shown in T cells to associate with the CXCL12 chemokine receptor CXCR4, suggesting that modification of CD3 ζ expression regulates CXCL12/CXCR4 signaling (Kumar et al. 2006; Patrussi et al. 2007). Accordingly, cross-desensitization of the CXCR4 receptor occurred in T cells upon engagement of the CD3 subunits, as part of the TCR-associated signaling network (Schneider et al. 2009). The CXCL12/CXCR4 pathway plays a critical role in many aspects of CNS development, with major regulatory functions in the proliferation and differentiation of adult and embryonic NPCs (Deverman and Patterson 2009). Hence, alteration of CD3 ζ expression in NPCs might affect the balance in signaling molecules, such as CXCR4 downstream signaling effectors, resulting in impaired neuronal differentiation.

We found an early and selective expression of CD3 ζ in newly born neurons, compared to glial cells and NPCs. Given that CD3 ζ is a cell surface protein, its prominent expression by newly born neurons might constitute a promising selection marker to sort neuroblasts from a mixed population derived from NPCs, embryonic or induced pluripotent stem cells. Stem cells and their neural derivatives have been used experimentally to develop replacement cell therapy approaches for neurodegenerative diseases and stroke (Bliss et al. 2007; Rosser et al. 2007). However, the heterogeneity of stem cell cultures and the risk of uncontrolled growth potentially leading to tumors following transplantation advocate for strict cell selection steps to isolate or eliminate neurons and nonneural cells, respectively. Isolation of stem-cell-derived neurons by immunoisolation or fluorescence-activated cell sorting (FACS)-based methodology has been performed using antibodies against the neural cell adhesion molecule L1, PSA-NCAM (Jungling et al. 2003; Pruszk et al. 2007) or a combination of CD15/CD24/CD29 markers (Pruszk et al. 2009). The use of CD3 ζ , in conjunction with the other aforementioned markers, might reinforce the selection step, leading to better selection of neurons for developmental studies and pharmacological and therapeutic applications.

Acknowledgements We are grateful to Pr. JP Soullou and Dr. I Anegon for their support. We thank Drs. K. Moriyoshi for kindly providing cDNAs. This work was supported by INSERM, Fondation Progrèffe, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau, Association pour la Recherche sur le Cancer (to PD and ZC) and INSERM/Région Pays de la Loire doctoral fellowship (to SJB).

References

- Bareo A, Patterson S, Alarcon JM et al (2005) Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron* 48:123–137
- Barkho BZ, Munoz AE, Li X, Li L, Cunningham LA, Zhao X (2008) Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines. *Stem Cells* 26:3139–3149
- Baudouin SJ, Pujol F, Nicot A, Kitabgi P, Boudin H (2006) Dendrite-selective redistribution of the chemokine receptor CXCR4 following agonist stimulation. *Mol Cell Neurosci* 33:160–169
- Baudouin SJ, Angibaud J, Loussouarn G et al (2008) The signaling adaptor protein CD3zeta is a negative regulator of dendrite development in young neurons. *Mol Biol Cell* 19:2444–2456
- Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK (2007) Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 38:817–826
- Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW (2002) The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111:967–979
- Call ME, Schnell JR, Xu C, Lutz RA, Chou JJ, Wucherpfennig KW (2006) The structure of the zeta-zeta transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor. *Cell* 127:355–368
- Carpentier PA, Palmer TD (2009) Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron* 64:79–92
- D'Oro U, Munitic I, Chacko G, Karpova T, McNally J, Ashwell JD (2002) Regulation of constitutive TCR internalization by the zeta-chain. *J Immunol* 169:6269–6278
- Deverman BE, Patterson PH (2009) Cytokines and CNS development. *Neuron* 64:61–78
- Donnelly DJ, Popovich PG (2008) Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* 209:378–388
- Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD (2005) Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 75:321–341
- Erlandsson A, Morshead CM (2006) Exploiting the properties of adult stem cells for the treatment of disease. *Curr Opin Mol Ther* 8:331–337
- Fiorini E, Merck E, Wilson A et al (2009) Dynamic regulation of notch 1 and notch 2 surface expression during T cell development and activation revealed by novel monoclonal antibodies. *J Immunol* 183:7212–7222
- Guillemot F (2007) Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Prog Neurobiol* 83:37–52
- Hirsch EC, Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8:382–397
- Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ (2000) Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290:2155–2159
- Imitola J, Comabella M, Chandraker AK et al (2004a) Neural stem/progenitor cells express costimulatory molecules that are differentially regulated by inflammatory and apoptotic stimuli. *Am J Pathol* 164:1615–1625

- Imitola J, Raddassi K, Park KI et al (2004b) Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18117–18122
- Jungling K, Nagler K, Pfrieger FW, Gottmann K (2003) Purification of embryonic stem cell-derived neurons by immunoisolation. *FASEB J* 17:2100–2102
- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T (2008) Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ* 50(Suppl 1):S97–103
- Kumar A, Humphreys TD, Kremer KN et al (2006) CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity* 25:213–224
- Lanier LL (2001) On guard—activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2:23–27
- Lanier LL, Yu G, Phillips JH (1991) Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J Immunol* 146:1571–1576
- Lathia JD, Okun E, Tang SC et al (2008) Toll-like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurosci* 28:13978–13984
- Lowin-Kropf B, Shapiro VS, Weiss A (1998) Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 140:861–871
- Molina-Holgado E, Molina-Holgado F (2010) Mending the broken brain: neuroimmune interactions in neurogenesis. *J Neurochem* 114:1277–1290
- Moriyoshi K, Richards LJ, Akazawa C, O'Leary DD, Nakanishi S (1996) Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron* 16:255–260
- Patrussi L, Ulivieri C, Lucherini OM et al (2007) p52Shc is required for CXCR4-dependent signaling and chemotaxis in T cells. *Blood* 110:1730–1738
- Pitcher LA, van Oers NS (2003) T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol* 24:554–560
- Popa N, Cedile O, Pollet-Villard X, Bagnis C, Durbec P, Boucraut J (2011) RAE-1 is expressed in the adult subventricular zone and controls cell proliferation of neurospheres. *Glia* 59:35–44
- Pruszak J, Sonntag KC, Aung MH, Sanchez-Pernaute R, Isacson O (2007) Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations. *Stem Cells* 25:2257–2268
- Pruszak J, Ludwig W, Blak A, Alavian K, Isacson O (2009) CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells* 27:2928–2940
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707–1710
- Rolls A, Shechter R, London A et al (2007) Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 9:1081–1088
- Rosser AE, Zietlow R, Dunnett SB (2007) Stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 20:688–692
- Schneider OD, Weiss AA, Miller WE (2009) Pertussis toxin signals through the TCR to initiate cross-desensitization of the chemokine receptor CXCR4. *J Immunol* 182:5730–5739
- Sergent-Tanguy S, Veziers J, Bonnamain V, Boudin H, Neveu I, Naveilhan P (2006) Cell surface antigens on rat neural progenitors and characterization of the CD3 (+)/CD3 (-) cell populations. *Differentiation* 74:530–541
- Shores EW, Huang K, Tran T, Lee E, Grinberg A, Love PE (1994) Role of TCR zeta chain in T cell development and selection. *Science* 266:1047–1050
- Sussman JJ, Bonifacio JS, Lippincott-Schwartz J et al (1988) Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell* 52:85–95
- Tran PB, Banisadr G, Ren D, Chenn A, Miller RJ (2007) Chemokine receptor expression by neural progenitor cells in neurogenic regions of mouse brain. *J Comp Neurol* 500:1007–1033
- van Oers NS, Tohlen B, Malissen B, Moomaw CR, Afendis S, Slaughter CA (2000) The 21- and 23-kD forms of TCR zeta are generated by specific ITAM phosphorylations. *Nat Immunol* 1:322–328
- Wange RL, Samelson LE (1996) Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5:197–205
- Xu HP, Chen H, Ding Q et al (2010) The immune protein CD3zeta is required for normal development of neural circuits in the retina. *Neuron* 65:503–515
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O et al (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9:268–275

Publications scientifiques:

Louveau A, Nerrière-Daguin V, Naveilhan P, Vanhove B, Boudin H. (en préparation) CTLA4-Ig induces axonal outgrowth stimulation through microglial CD80/CD86.

Louveau A, Angibaud J, Baudouin SJ, Thinard Reynald, Boudin H. (en revision dans J. Neurosci) Impaired spatial memory in mice lacking CD3zeta is associated with altered NMDA and AMPA receptors signaling but independent of T cell deficiency.

Angibaud J, Baudouin SJ, **Louveau A**, Nerrière-Daguin V, Bonnamain V, Csaba Z, Dournaud P, Naveilhan P, Noraz N, Pellier-Monnin V, Boudin H. (2012). Ectopic Expression of the Immune Adaptor Protein CD3zeta in Neural Stem/Progenitor Cells Disrupts Cell-Fate Specification. *J Mol Neurosci* 46(2) :431-41

Angibaud J, **Louveau A**, Baudouin SJ, Nerrière-Daguin V, Evain S, Bonnamain V, Hulin P, Csaba Z, Dournaud P, Thinard R, Naveilhan P, Noraz N, Pellier-Monnin V, Boudin H. (2011). The immune molecule CD3zeta and its downstream effectors ZAP-70/Syk mediate ephrin signaling in neurons to regulate early neuritogenesis. *J Neurochem.* 119(4):708-22

Communications orales:

Louveau A, Angibaud J, Baudouin SJ, Nerrière-Daguin V, Thinard R, Naveilhan P and Boudin H. Involvement of the immune molecule CD3zeta in ephrin pathway and in the regulation of synaptic content. 2ème reunion annuelle du Club Français de Neuro-Immunologie, Paris, France (19Mai 2011)

Prix de la meilleure communication orale

Posters:

Louveau A, Angibaud J, Haspot F, Baudouin SJ, Thinard R, Naveilhan P and Boudin H. Role of the immune molecule CD3zeta in spatial memory and synaptic plasticity. FENS Forum à Barcelone, Espagne (14-18 Juillet 2012).

Louveau A, Angibaud J, Baudouin SJ, Nerrière-Daguin V, Thinard R, Naveilhan P and Boudin H. The immune molecule CD3zeta and its downstream effectors ZAP-70/Syk mediate ephrin signaling in neurons and regulate glutamatergic synaptic content. 10th colloque Société des Neurosciences, Marseille, France (24-27 Mai 2011)

Louveau A, Angibaud J, Baudouin SJ, Nerrière-Daguin V, Thinard R, Naveilhan P and Boudin H. Involvement of the immune molecule CD3zeta in ephrin pathway and in the regulation of synaptic content. 2nd reunion annuelle du Club Français de Neuro-Immunologie, Paris, France (19 Mai 2011)

Rôle de la molécule adaptatrice CD3zeta et de la voie de co-stimulation CTLA4/CD80-
CD86 dans le développement et la plasticité neuronale.

Des données récentes montrent que des molécules que l'on pensait restreintes au système immunitaire sont exprimées dans le système nerveux central (SNC), où elles exercent une fonction non-immune en participant notamment au développement et à la plasticité neuronale. Nous avons étudié la fonction cérébrale de l'immunorécepteur CD3 ζ , et celle de la voie de co-stimulation CTLA4/CD80-CD86.

Concernant CD3 ζ , nous avons mis en évidence un rôle inhibiteur de CD3 ζ sur la formation des neurites à des stades précoces du développement neuronal, par un mécanisme impliquant la voie éphrine A1/EphA4. Sur des neurones matures, CD3 ζ promeut la localisation synaptique de la sous-unité GluN2A du NMDAR, et est impliqué dans la voie signalétique de la CaMKII recrutée lors d'un paradigme de plasticité synaptique. Ces mécanismes sont associés à une action pro-cognitive de CD3 ζ sur les comportements d'apprentissage et de mémoire, indépendamment de son rôle immunitaire sur les lymphocytes T.

Concernant la voie de co-stimulation, nous avons montré sur un modèle in vivo de greffe intracérébrale une action bénéfique de la molécule CTLA4-Ig sur la pousse axonale. L'action de CTLA4-Ig est corrélée à une plasticité morphologique de la microglie, médiée par le récepteur microglial CD86, et à une augmentation d'expression de BDNF et d'arginase 1. Ces résultats suggèrent que l'action bénéfique de CTLA4-Ig sur la pousse/survie neuronale est médiée par la libération de BDNF et de l'arginase 1 microglial.

Nos études ont permis d'identifier des fonctions inédites des molécules CD3 ζ et CD86 dans le SNC. Ces résultats sont importants pour appréhender les relations physiologiques et pathologiques entre SI et SNC.

Mots clés : Immunorécepteurs, neurone, développement, plasticité, CTLA4, microglie, synapse, lymphocyte

Role of the adaptor molecule CD3zeta and the co-stimulatory pathway CTLA4/CD80-
CD86 in neuronal development and plasticity.

Recent studies have shown that molecules thought to be restricted to the immune system (IS) are expressed in the central nervous system (CNS) where they exert non-immune function on neuronal development and plasticity. We studied the cerebral function of the immunoreceptor CD3 ζ and of the CTLA4/CD80-CD86 co-stimulatory pathway.

Regarding CD3 ζ , we found that CD3 ζ inhibits neurite formation at early neuronal developmental stages, through a mechanism involving the ephrinA1/EphA4 pathway. In mature neurons, CD3 ζ supports the synaptic localization of the NMDAR subunit GluN2A, and is required for the CaMKII-dependent signaling pathway underlying synaptic plasticity. These mechanisms are associated to a pro-cognitive action of CD3 ζ on learning and memory behavior, independently of its immune role on T lymphocytes.

Concerning the co-stimulatory pathway, we showed that the molecule CTLA4-Ig promotes axonal growth in vivo in a model of intracerebral transplantation. This effect is correlated with a morphological plasticity of microglial cells mediated through the microglial receptor CD86, and with an increased expression of BDNF and arginase 1. These results suggest that the beneficial effect of CTLA4-Ig on neuronal survival/growth is mediated through the release of microglial BDNF and arginase 1.

Our studies reveal unexpected role of CD3 ζ and the co-stimulatory molecules in the CNS. Our results highlight new mechanisms important to better understand neuroimmune interactions in normal and pathological conditions.

Key words: Immunoreceptor, neuron, development, plasticity, CTLA4, microglia, synapse, lymphocyte