

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DE MEDECINE  
École doctorale **BIOLOGIE SANTÉ**

Année 2010

N° 27

Rôle de la molécule immune CD3 $\zeta$  dans le  
développement neuronal et les fonctions cérébrales

THÈSE DE DOCTORAT  
Discipline : Sciences de la vie  
Spécialité : Neurobiologie

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**ANGIBAUD Julie**

*Le 29 octobre 2010, devant le jury ci-dessous*

Rapporteurs : Isabelle DUSART, Directeur de Recherche, Paris  
Bruno GONZALEZ, Directeur de Recherche, Rouen

Examineurs : Nelly NORAZ, Chargée de Recherche, Lyon  
Patricia PARNET, Directeur de Recherche, Nantes

Directeur de Thèse: Hélène BOUDIN, Chargée de Recherche, Nantes

# SOMMAIRE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>ABREVIATIONS UTILISEES.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>AVANT PROPOS.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>INTRODUCTION.....</b>  | <b>13</b> |
| <b>I. LE DEVELOPPEMENT NEURONAL.....</b>  | <b>14</b> |
| A. NEUROGENESE.....   | 14        |
| 1. Neurogenèse chez l'embryon.....  | 14        |
| 2. Neurogenèse chez l'adulte.....   | 15        |
| a) La zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux.....                                 | 16        |
| b) La zone sous-granulaire de l'hippocampe.....   | 17        |
| 3. Rôle des molécules immunes dans la neurogenèse.....                                      | 19        |
| B. POLARISATION NEURONALE.....  | 20        |
| 1. Polarisation neuronale <i>in vitro</i> .....   | 20        |
| a) L'émergence des premiers neurites.....   | 22        |
| (1) Domaines cellulaires importants impliqués dans l'émergence des neurites.....            | 23        |
| (2) Mécanismes cellulaires impliqués dans l'émergence des filopodes et des neurites.....    | 24        |
| b) Différenciation axonale.....   | 29        |
| (1) Les grandes étapes de la spécification axonale.....                                     | 29        |
| (2) Signalisation impliquée dans la différenciation axonale.....                            | 31        |
| c) Différenciation dendritique.....   | 34        |
| (1) Les grandes étapes de la différenciation dendritique.....                               | 34        |
| (2) Signalisation impliquée dans la différenciation dendritique.....                        | 35        |
| (3) Croissances axonale et dendritique.....   | 39        |
| 2. Polarisation neuronale <i>in vivo</i> .....  | 41        |
| a) Similitudes entre la polarisation <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .....                | 42        |
| b) Différences entre la polarisation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....                | 42        |
| 3. Rôle des molécules immunes dans la formation des prolongements neuronaux.....            | 43        |
| C. LES SYNAPSES.....  | 43        |
| 1. Structure et fonction des synapses.....  | 44        |
| 2. La synapse excitatrice.....  | 45        |
| a) Les récepteurs au glutamate.....   | 46        |
| (1) Les récepteurs métabotropiques (mGluR).....   | 47        |
| (2) Les récepteurs ionotropiques (iGluR).....   | 47        |
| b) Les protéines d'échafaudage.....   | 51        |
| (1) Les protéines MAGUKs.....   | 51        |
| (2) Les protéines Shank.....  | 52        |
| (3) Les protéines Homer.....  | 52        |
| c) Les protéines kinases et phosphatases.....   | 53        |
| (1) La protéine CaMKII.....   | 53        |
| (2) Les protéines kinase PKA et PKC.....  | 54        |
| (3) Les protéines phosphatases PP1 et PP2B (calcineurine).....                              | 55        |
| 3. Molécules du SI impliquées dans la fonction et l'homéostasie des synapses.....           | 55        |
| <b>II. CONSEQUENCES DE L'EXPRESSION NEURONALE DES MOLECULES DU SYSTEME IMMUNITAIRE.....</b> | <b>58</b> |
| A. NEURODEVELOPPEMENT.....  | 58        |
| 1. Infections au cours de la grossesse.....   | 58        |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| 2.          | <i>Mutation des gènes du système immunitaire</i> .....   | 59         |
| B.          | THERAPIE D'IMMUNOINTERVENTION.....   | 59         |
| 1.          | <i>Cyclosporine A</i> .....  | 59         |
| 2.          | <i>L'anticorps monoclonal de souris : OKT3</i> .....   | 60         |
| <b>III.</b> | <b>CD3<math>\zeta</math> : MOLECULE ADAPTATRICE DANS LES SYSTEMES IMMUNITAIRE ET NERVEUX CENTRAL</b> .....   | <b>62</b>  |
| A.          | STRUCTURE DU CD3ZETA .....   | 62         |
| B.          | LES RECEPTEURS COUPLES A CD3 $\zeta$ ET LES FONCTIONS ASSOCIEES.....   | 64         |
| 1.          | <i>Le TCR (T cell receptor)</i> .....  | 64         |
| 2.          | <i>Les récepteurs des cellules NK</i> .....  | 65         |
| 3.          | <i>Le récepteur CXCR4</i> .....  | 66         |
| C.          | SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DECLENCHEE PAR L'ACTIVATION DE CD3 $\zeta$ .....   | 68         |
| D.          | ROLE DU CD3 $\zeta$ DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....   | 69         |
|             | <b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....   | <b>72</b>  |
|             | <b>ARTICLE I : THE IMMUNE SIGNALING MOLECULE CD3<math>\zeta</math> PREVENTS NEURONAL CELL-FATE DECISION FROM NEURAL PROGENITOR CELLS AND RESTRAINS NEURITOGENESIS IN NEWLY-BORN NEURONS THROUGH A RHO-GEF VAV2 PATHWAY</b> ..... | <b>74</b>  |
|             | <b>ARTICLE II : THE SIGNALING ADAPTOR PROTEIN CD3<math>\zeta</math> IS A NEGATIVE REGULATOR OF DENDRITE DEVELOPMENT IN YOUNG NEURONS</b> .....   | <b>110</b> |
|             | <b>RESULTATS SUPPLEMENTAIRES</b> .....   | <b>124</b> |
|             | <b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....   | <b>149</b> |
|             | <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....   | <b>159</b> |
|             | <b>A</b> .....   | <b>159</b> |
|             | <b>B</b> .....   | <b>160</b> |
|             | <b>C</b> .....   | <b>161</b> |
|             | <b>D</b> .....   | <b>163</b> |
|             | <b>E</b> .....   | <b>165</b> |
|             | <b>F</b> .....   | <b>165</b> |
|             | <b>G</b> .....   | <b>166</b> |
|             | <b>H</b> .....   | <b>167</b> |
|             | <b>I</b> .....   | <b>169</b> |
|             | <b>J</b> .....   | <b>170</b> |
|             | <b>K</b> .....   | <b>170</b> |
|             | <b>L</b> .....   | <b>172</b> |
|             | <b>M</b> .....   | <b>175</b> |
|             | <b>N</b> .....   | <b>177</b> |
|             | <b>O</b> .....   | <b>178</b> |
|             | <b>P</b> .....   | <b>178</b> |
|             | <b>Q</b> .....   | <b>180</b> |

|                |            |
|----------------|------------|
| <b>R</b> ..... | <b>180</b> |
| <b>S</b> ..... | <b>182</b> |
| <b>T</b> ..... | <b>186</b> |
| <b>U</b> ..... | <b>187</b> |
| <b>V</b> ..... | <b>187</b> |
| <b>W</b> ..... | <b>188</b> |
| <b>X</b> ..... | <b>189</b> |
| <b>Y</b> ..... | <b>189</b> |
| <b>Z</b> ..... | <b>189</b> |

## Table des illustrations

|  |    |
|--|----|
| Figure 1: Hypothèses possibles de l'évolution des cellules immunitaires et neurales. ....  | 11 |
| Figure 2: Neurogenèse corticale chez l'embryon.....  | 15 |
| Figure 3: Neurogenèse adulte dans le cerveau de mammifères représentée par un schéma du<br>cerveau adulte de rat. ....                 | 16 |
| Figure 4: Neurogenèse dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) adulte. ....   | 17 |
| Figure 5: Neurogenèse dans la zone sous-granulaire (ZSG) dans le gyrus dentelé de l'hippocampe<br>adulte.....                          | 18 |
| Figure 6: Etablissement de la polarisation des neurones hippocampiques <i>in vitro</i> .....   | 21 |
| Figure 7: Etapes clés de la polarisation neuronale.....  | 22 |
| Figure 8: Hypothèses de la formation du site d'initiation du premier neurite. ....   | 22 |
| Figure 9: Structure du cône de croissance. ....  | 23 |
| Figure 10: Propriétés fondamentales des filaments d'actine et des microtubules. ....   | 24 |
| Figure 11: Régulation des protéines Rho GTPases.....   | 27 |
| Figure 12: Vue simplifiée de l'action des protéines Rho GTPases dans la neuritogenèse. ....  | 28 |
| Figure 13: Rôle de des protéines associées à l'actine dans la formation et l'extension des neurites ..                                 | 28 |
| Figure 14: Modèle de la spécification axonale au cours de la polarisation neuronale. ....  | 30 |
| Figure 15: Voies de signalisation impliquées dans la spécification axonale au cours de la polarisation<br>neuronale. ....              | 31 |
| Figure 16: Voies de signalisation impliquées dans la spécification dendritique au cours de la<br>polarisation neuronale. ....          | 36 |
| Figure 17: Etapes de l'élongation du cône de croissance. ....  | 40 |
| Figure 18: Polarisation neuronale <i>in vivo</i> . ....  | 42 |
| Figure 19: Représentation schématique de la structure d'une synapse chimique. ....   | 45 |
| Figure 20: Structure d'une synapse excitatrice.....  | 46 |
| Figure 21: Représentation schématique du récepteur AMPA et des protéines qui régulent son<br>accumulation au niveau des synapses. .... | 48 |
| Figure 22: Représentation de la chaîne $\zeta$ et l'interaction de cette molécule avec le récepteur des LT,<br>le TCR.....             | 62 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 23: Structure du CD3 $\zeta$ . .....   | 63 |
| Figure 24: Les récepteurs des cellules NK et leurs molécules adaptatrices. ....   | 65 |
| Figure 25: L'activation de CD3 $\zeta$ suite à la liaison de SDF-1 avec CXCR4. ....   | 67 |
| Figure 26: Les voies de signalisation induites par l'activation de CD3 $\zeta$ . ....   | 69 |
| Figure 27: Représentation de la voie réticulo-géiculée. ....  | 70 |
| Figure 28: Images illustrant le défaut développemental observé dans le noyau genouillé latéral (NGL) chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$ . .... | 70 |

## Abréviations utilisées

ABP : AMPA receptor binding protein  
ADF : Actin depolymerizing faction  
AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid  
ATP : Adénosine triphosphate  
 $\beta$ 2-m :  $\beta$ 2-microglobuline  
BAT-3 : Antigen-B-associated 3  
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor  
BHE : Barrière hématoencéphalique  
bHLH : Basic helix-loop-helix  
BMP : Bone morphogenetic protein  
Ca<sup>2+</sup>/CaM : Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline  
CaMKII : Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline dependant kinase 2  
CBL : Casitas B-lieage lymphoma  
CBP : CREB binding protein  
Cdc42 : Cell division cycle 42  
CE : Cortex entorhinal  
CGR : Cellules de la glie radiaire  
CMHI : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1  
CMHII : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2  
CPI : Cellules progénitrices intermédiaires  
CREB : cAMP response element binding protein  
CREST : Calcium-responsive transactivator  
CRMP : Collapsin response mediator protein-2  
CSN : Cellules souches neurales  
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4  
DAG : Diacyl glycérol  
DAP12 : DNAX activating protein 12  
Dscam : Down syndrome-related cell adhesion molecule  
EVH1 : N-terminal Ena/VASP homology 1  
FGF : Fibroblast growth factors  
GABA :  $\gamma$ -amino butyric acid  
GAD : Glutamic acid decarboxylase

GADS : Growth-factor-receptor-bound protein 2 (GRB2)-related adaptor protein  
GAP-43 : Growth-associated protein-43  
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein  
GK : Guanylate kinase-like  
GKAP : Guanylate kinase associated protein/SAP90/PSD-95-associated proteins  
GPCR : G protein coupled receptor  
GRIP : Glutamate receptor-interacting protein  
GSK3 $\beta$  : Glycogen synthase kinase  $\beta$   
iGluR : Récepteurs glutamatergiques ionotropiques  
ITAMs : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif  
ITIMs : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif  
JNK : c-jun N-terminal kinase  
LAT : Linker for activation of T-cells  
Lck : Leukocyte-specific protein tyrosine kinase  
LT : Lymphocyte T  
LTD : Long term depression  
LTP : Long term potentiation  
MAGUKs : Membrane associated guanylate kinase  
MAPs : Microtubule-associated proteins  
MC : Manteau cortical  
MEC : Matrice extracellulaire  
mGluR : Récepteurs glutamatergiques métabotropiques  
MTOC : Centres organisateurs des microtubules  
NE : Neuroépithélium  
NEP : Cellules souches neuroépithéliales  
NFAT : Nuclear factor of activated T-cells  
NGF : Nerve growth factor  
NGL : Noyau géniculé latéral  
NGRs : Neurones ganglionnaires de la rétine  
NK : Natural killer  
NLS : Nuclear localization signal  
NMDA : N-methyl d aspartate  
NT : Neurotransmetteur  
NT- : Neurotrophine

Par : Partitioning defective  
PDZ : PSD-95/Discs-large/Zona Occludens-1  
PI : Progéniteurs de type 1  
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase  
PICK1 : Protein interacting with C-kinase-1  
PII : Progéniteurs de type 2  
PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate  
PIP3 : Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate  
PirB : Paired immunoglobulin-like receptor B  
PKA : Protein kinase A  
PKC : Protein kinase C  
PLC : Phospholipase C  
PP1 : Protein phosphatase 1  
PP2B : Protein phosphatase 2B  
PSD : Post-synaptic density  
PSD-95 : Post-synaptic density 95  
PTEN : Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10  
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1  
Ras-GRF1 : Ras guanine nucleotide-releasing factor 1  
Rho GAPs : GTPase activating protein  
Rho GEFs : Guanine nucleotide exchange factors  
Rho GTPase : Ras-homologous guanosine triphosphatases  
RhoA : Ras homologous member A  
SAM : Sterile alpha helice  
SDF-1 : Stromal derived factor-1  
Sema : Sémaphorine  
SI : Système immunitaire  
SLP76 : Src homology 2 (SH2)-domain-containing leukocyte protein of 76kDa  
SNC : Système nerveux central  
Syk : Spleen tyrosine kinase  
TAP1 : Transporter antigenic peptid 1  
TARPs : Transmembrane AMPA regulatory proteins  
TCR : T cell receptor  
TGF- $\beta$  : Transforming growth factor- $\beta$

TLRs : Toll-like receptors

VASP : Vasodilator stimulated phosphoprotein

WAVE : Wiskott-Aldrich syndrom protein [WASP]-family verprolin-homologous protein

ZA : Zone active

ZAP70 :  $\zeta$  chain-associated protein kinase 70kDa

ZM : Zone marginale

ZSG : Zone sous-granulaire

ZSV : Zone sous-ventriculaire

ZV : Zone ventriculaire

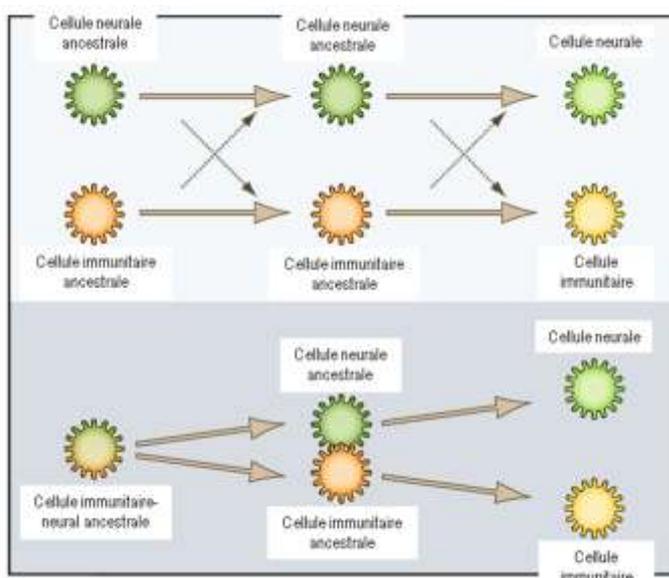
## AVANT PROPOS

Le système nerveux central (SNC) et le système immunitaire (SI) possèdent des fonctions distinctes mais partagent des mécanismes développementaux et des modes opératoires communs incluant la migration, la communication et la plasticité cellulaire.

Les cellules de l'immunité et les cellules nerveuses communiquent entre elles par l'intermédiaire de structures membranaires spécialisées appelées synapses bien que leur morphologie et leur mécanisme d'action sont très différentes entre les deux systèmes. Il existe cependant des mécanismes communs aux deux systèmes appartenant à la famille des cytokines, chimiokines, des neurotransmetteurs, neurotrophines (Camacho-Arroyo et al., 2009) et leurs récepteurs correspondant (Levite, 2008; Selmeczy et al., 2008).

En plus d'un système commun de communication, ces cellules sont capables de migrer en réponse à divers stimuli (Bajénoff et al., 2006; Mizui et al., 2009) et sont dotées d'une certaine plasticité. Suivant les signaux environnementaux perçus, les cellules immunitaires et nerveuses modifient leur réponse par l'expression ou la sécrétion de différentes molécules (Allen, 2008; Wilson et al., 2009).

Ainsi les similarités entre le SNC et le SI décrites précédemment posent une question intéressante sur l'origine évolutive des composantes cellulaires de chaque système. En effet, les travaux menés par Arendt proposent deux hypothèses évolutives. La première suppose une co-évolution d'ancêtres indépendants de cellules immunitaires et de cellules neurales. Soumis aux mêmes contraintes environnementales, ces cellules se seraient adaptées au cours de l'évolution en utilisant les mêmes systèmes de régulation. La seconde propose une évolution de ces cellules à partir d'un ancêtre commun (Figure 1) (Arendt, 2008).



**Figure 1: Hypothèses possibles de l'évolution des cellules immunitaires et neurales.**

Connaître l'origine évolutive de ces cellules afin de mieux caractériser les similarités entre les deux systèmes est primordiale. En effet, cela permettrait dans un premier temps de mieux comprendre chaque système, en particulier le SNC, et dans un second temps de déterminer l'impact des molécules immunitaires dans le développement du SNC. Des dysfonctions cérébrales et pathologies neurodéveloppementales lourdes induites par certaines infections par exemple ont été observées (Watanabe et al., 2010). De plus, il est nécessaire d'identifier les molécules immunitaires exprimées par le SNC dans le cadre par exemple de traitements thérapeutiques immunosuppresseurs. Les molécules immunosuppressives passant la barrière hématoencéphalique peuvent avoir des répercussions graves sur le SNC comme l'induction de troubles neuropsychiatriques (Pittock et al., 2003a).

**Le but général de cette thèse est de caractériser l'expression de la molécule immunitaire CD3 $\zeta$  au cours du développement neuronal et d'identifier son rôle à des stades clés de ce développement.**

Dans l'introduction, Les grandes étapes du développement neuronal et l'influence des molécules immunitaires exprimées par le SNC sur celles-ci seront dans un premier temps décrits. A l'exception des cytokines et des chimiokines dont le rôle est déjà connu dans le SNC, seules les molécules de l'immunité innée et adaptative que l'on pensait restreintes au SI seront présentées au cours de cette introduction. La neurogenèse et la polarisation neuronale, stades développementaux que nous avons particulièrement étudiés, seront détaillés. Dans une seconde partie, les conséquences de l'expression neuronale des molécules immunitaires dans le SNC seront développées. Enfin, nous décrirons plus particulièrement la molécule immunitaire CD3 $\zeta$  et les données actuelles dans le SNC la concernant.

# INTRODUCTION

---

# INTRODUCTION

## I. Le développement neuronal

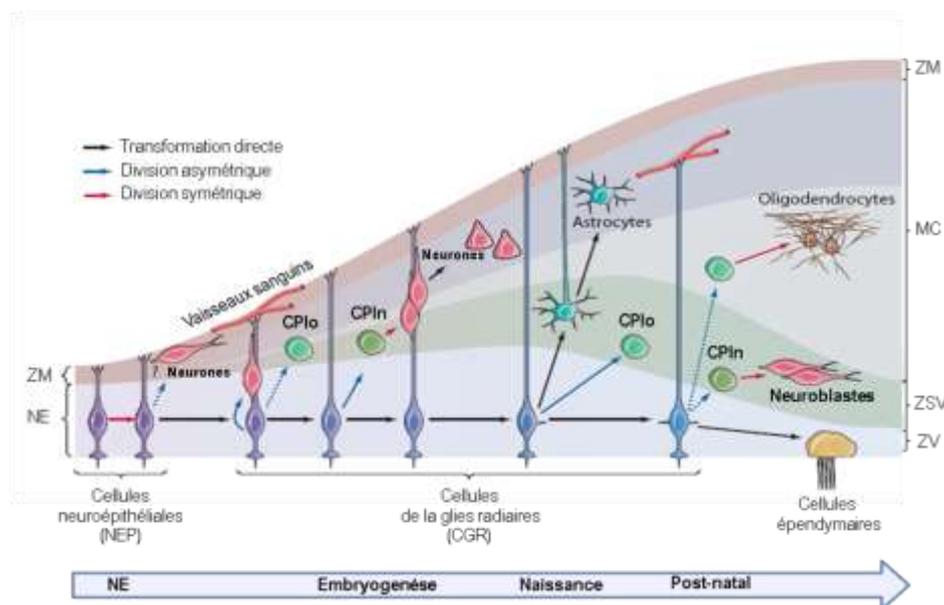
Avant de s'associer en réseaux, tous les neurones doivent franchir un certain nombre d'étapes successives : neurogenèse, migration à leur emplacement définitif, différenciation et maturation fonctionnelle. Cette partie a pour objectif la présentation de deux stades du développement neuronal principalement étudiés au cours de ma thèse que sont la neurogenèse et la polarisation neuronale.

### A. *Neurogenèse*

#### 1. Neurogenèse chez l'embryon

Au stade embryonnaire E10-E11 chez le rat, le tube neural est constitué d'une population cellulaire homogène proliférative, appelée cellules souches neuroépithéliales (NEP) (Kalyani et al., 1997). Ces cellules sont essentiellement présentes dans la zone ventriculaire (ZV) constituée d'une simple couche d'épithélium pseudo stratifié d'origine ectodermique qui borde les ventricules cérébraux au cours du développement embryonnaire précoce. La neurogenèse embryonnaire corticale est la mieux décrite, et les mécanismes impliqués peuvent être appliqués à d'autres régions du SNC. La neurogenèse est fondée sur un principe de division asymétrique d'une cellule souche qui formera ainsi une autre cellule souche équivalente et une cellule progénitrice neuronale. Deux types de cellules souches capables de générer des neurones ont été décrits à ce jour : les NEP et les cellules de la glie radiaire. Afin de générer une quantité massive de neurones, les NEP se divisent symétriquement pour amplifier le nombre de cellules indifférenciées (Götz et Huttner, 2005). Certaines d'entre elles génèrent par division asymétrique des cellules progénitrices qui se différencient en neurones (Zhong et Chia, 2008). L'épithélium s'épaississant au cours du développement cérébral, les NEP commencent à exprimer des caractéristiques de cellules gliales et s'orientent obliquement, étendant leurs prolongements vers la face externe du tube neural (pôle basal). Ces cellules sont ainsi référencées comme cellules de la glie radiaire (CGR) (Kriegstein et Götz, 2003). Ces cellules se divisent asymétriquement afin de générer des neurones et des cellules progénitrices intermédiaires (CPI). Les CPI donnent naissance à des neurones par division symétrique. Les cellules de la glie radiaire ne se limitent donc pas à des cellules de soutien, permettant la migration des neurones de leur site de formation vers leur position finale. Elles peuvent être également considérées comme des cellules souches neurales (Rakic, 2003). A la fin du développement embryonnaire, quand les neurones ont achevés leur migration, la majorité des CGR

se détache de la face apicale du neuroépithélium et se transforme en astrocytes. Une sous-population de CGR reste en contact avec la face apicale et continue de se comporter en cellules souches neurales au cours du développement post-natal. Les CGR post-natales génèrent des neurones ou des oligodendrocytes *via* les CPI. Ces derniers se divisent à partir de la région apicale du neuroépithélium, transloquent leur noyau vers la région basale de la ZV pour former une deuxième couche germinale, la zone sous-ventriculaire (ZSV) (Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009). Chez le rongeur, une petite proportion de ces progéniteurs basaux sont capables de divisions symétriques prolifératives, permettant ainsi le maintien du pool de progéniteurs basaux dans la ZSV (Figure 2) (Farkas et Huttner, 2008).



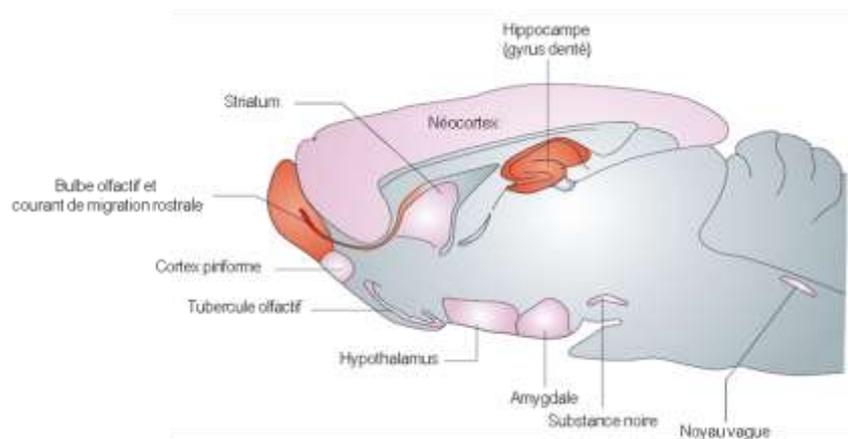
**Figure 2: Neurogenèse corticale chez l'embryon.**

Les cellules neuroépithéliales (NEP) localisées dans la couche cellulaire apicale du tube neural appelée zone ventriculaire (ZV) se divisent rapidement, générant dans un premier temps les cellules de la glie radiaire (CGR), puis les cellules progénitrices intermédiaires (CPIo et CPIn) et neuroblastes. Les CGR, considérées comme des cellules souches neurales, expriment des caractères de glias différenciées et émettent de longs prolongements qui servent de support pour la migration des neurones néoformés. Cette migration dite radiaire, importante pour l'établissement d'une organisation cérébrale normale, se fait de la ZV vers les couches émergentes du néocortex. Une fois la migration neuronale achevée, les CGR se transforment en astrocytes et certaines en cellules épendymaires. Cependant, un petit nombre de CGR reste accolé à la région apicale et continue de se comporter en cellules souches neurales au cours du développement post-natal. CPIn, cellules progénitrices intermédiaires générant les neurones; CPIo, cellules progénitrices intermédiaires générant les oligodendrocytes; MC, manteau cortical; NE, neuroépithélium; ZM, zone marginale; ZSV, zone sous-ventriculaire; ZV, zone ventriculaire. Adapté de A. Kriegstein et A. Alvarez-Buylla 2009.

## 2. Neurogenèse chez l'adulte

Le développement de nouvelles méthodes de marquage de prolifération cellulaire dans les années 90 (marquage bromodeoxyuridine BrdU par exemple) ont permis de mettre en évidence l'existence d'une neurogenèse au sein du SNC chez le rat et la souris adulte (Luskin, 1993; Corotto et

al., 1993; Seki et Arai, 1993). Les principales structures cérébrales, capables de recevoir naturellement de nouveaux neurones, ont par la suite été identifiées chez plusieurs mammifères incluant les rongeurs (Lois et Alvarez-Buylla, 1994), les primates non humains (Kornack et Rakic, 1999) et l'homme (Eriksson et al., 1998). Il s'agit du bulbe olfactif (relai central de l'information olfactive) et de l'hippocampe (structure limbique) pour lesquels les neurones nouvellement formés ont pour origine respective une zone germinative contenant des cellules souches : la ZSV des ventricules latéraux (Alvarez-Buylla et Garcia-Verdugo, 2002) et la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus dentelé de l'hippocampe (Kempermann et Gage, 2000). La neurogenèse en dehors de ces deux régions est extrêmement limitée voire inexistante dans le SNC intact chez l'adulte (Figure 3)



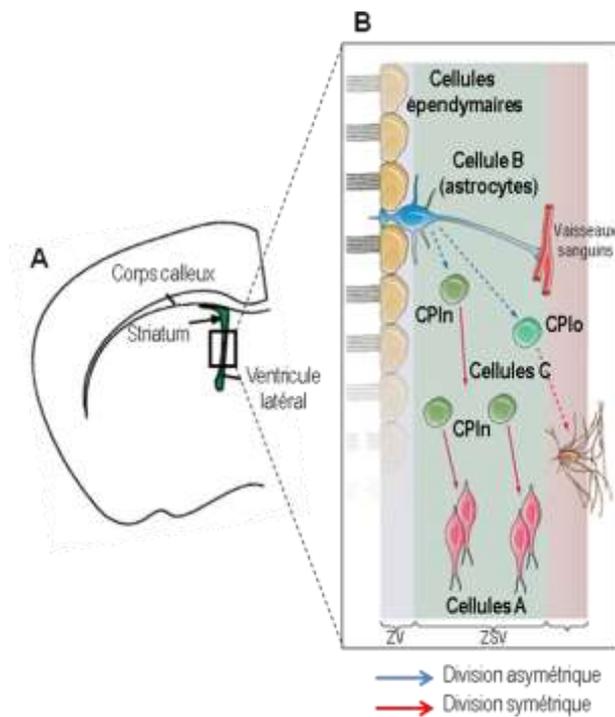
**Figure 3: Neurogenèse adulte dans le cerveau de mammifères représentée par un schéma du cerveau adulte de rat.**

*Les régions neurogéniques connues sont indiquées en rouge et les régions pour lesquelles des preuves controversées de bas niveaux de neurogenèse existent sont représentées en rose. Les régions n'étant pas sur le même plan sagittal, leurs localisations sont donc approximatives sur le schéma. Adapté de E. Gould 2007.*

### a) La zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux

La ZSV est localisée le long de l'épendyme constitué d'une fine couche de cellules bordant les ventricules latéraux du cerveau (Figure 4). Les cellules épendymaires, générées par les CGR, ont pendant un temps été considérées comme étant les cellules souches neurales adultes responsables de la neurogenèse dans la ZSV (Johansson et al., 1999). Plusieurs études ont cependant montré que ces cellules sont quiescentes dans des conditions physiologiques normales et ne présentent pas les propriétés de cellules souches *in vitro* (Doetsch et al., 1999). Il a été cependant observé que les cellules dérivées de la CGR et présentes au sein de la ZSV, participent à la neurogenèse à long terme dans le bulbe olfactif. Plusieurs types cellulaires spécifiques de la ZSV, distinguables de part leur morphologie, ont été observés et ont été classés en cellules de type A, B et C (Doetsch et al., 1997).

Des sous-types de cellules se divisant lentement, exprimant la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, marqueur des astrocytes) et se comportant comme des cellules souches (Doetsch et al., 1999) ont été morphologiquement définis comme cellules de type B. Ces cellules génèrent des CPI qui ont la capacité de se diviser très rapidement. Ces cellules d'amplification transitoire, extrêmement sensibles à l'araC (un anti-mitotique), ont été définies comme cellules de type C. Ces CPI, définies comme cellules de type A, donnent naissance par division symétrique à des neuroblastes (Figure 4).



**Figure 4: Neurogenèse dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) adulte.**

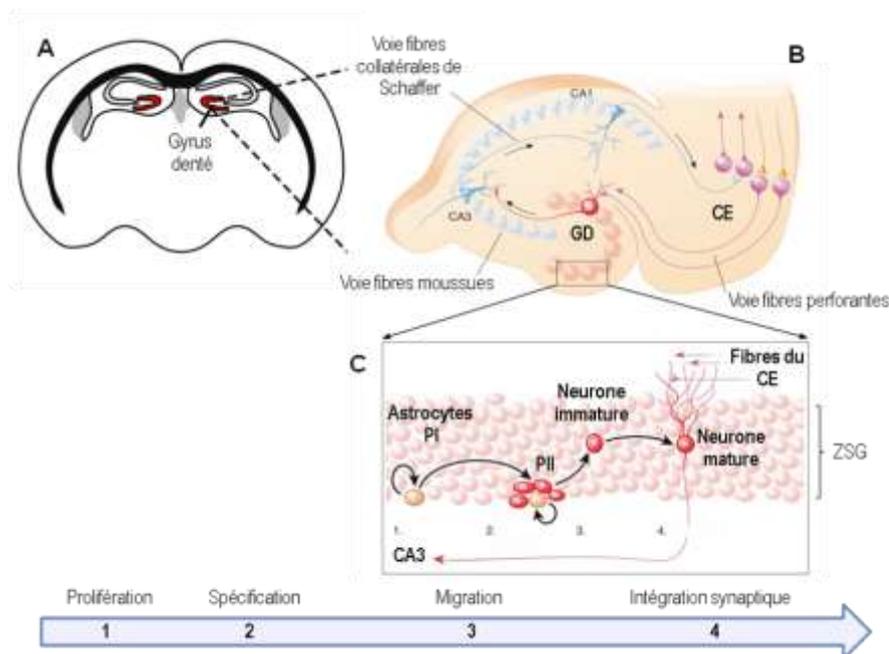
(A) Coupe coronale de cerveau de rat. Le ventricule latéral, identifié en vert, est rempli de liquide céphalorachidien. L'encadré est agrandi en B. (B) Illustration schématique de la composition et de l'architecture de la ZSV. CPIn, cellules progénitrices intermédiaires générant les neurones; CPIo, cellules progénitrices intermédiaires générant les oligodendrocytes; ZSV, zone sous-ventriculaire; ZV, zone ventriculaire. Adapté de A. Kriegstein et A. Alvarez-Buylla 2009.

Une fois les neuroblastes générés, ceux-ci migrent par la suite dans le courant de migration rostrale à travers le tissu neural mature jusqu'aux bulbes olfactifs.

## b) La zone sous-grulaire de l'hippocampe

Les nouveaux neurones de l'hippocampe sont générés dans la ZSG, qui est localisée à l'interface de la couche de cellules granulaires et du hile de l'hippocampe, région impliquée dans l'apprentissage et la mémoire. La neurogenèse dans la ZSG a lieu dans un foyer cloisonné étroitement associé avec des vaisseaux sanguins (Palmer et al., 2000), suggérant ainsi que des facteurs dérivant des vaisseaux sanguins peuvent influencer le comportement des cellules souches neurales (CSN) dans la ZSG. La ZSG contient deux types de cellules en division : les astrocytes radiaires, appelés progéniteurs de type I (PI) dérivés de la glie radiaire du neuroépithélium du gyrus dentelé (Eckenhoff et Rakic, 1984), et les cellules sombres, dites cellules de type D ou progéniteurs

de type II (PII) (Fukuda et al., 2003; Seri et al., 2004). En cohérence avec ce qui a pu être observé dans la ZSV au cours du développement et chez l'adulte, les PI de la ZSG fonctionnent comme des premiers précurseurs de nouveaux neurones dans le gyrus dentelé (Fukuda et al., 2003). Ces cellules, exprimant la nestine et la GFAP, ont un prolongement proéminent qui traverse la couche de cellules granulaires mais également de courts prolongements tangentiels le long de la ZSG (Seri et al., 2004). Les PI ne génèrent pas de neurones directement mais donnent naissance aux PII par division asymétrique. La plupart des neurones générés par les cellules PII meurent entre la première et seconde semaine après leur genèse. Les neurones qui survivent migrent dans la couche des cellules granulaires (Kempermann et al., 2003). Contrairement aux neurones générés dans la ZSV, les neurones provenant de la ZSG ne migrent que sur de courtes distances dans la couche granulaire. Une fois arrivés à leur destination finale, ils projettent leurs axones dans la région CA3 de l'hippocampe afin de former les fibres moussues et projettent leurs dendrites à l'extérieur de la couche granulaire (Figure 5) (Kempermann et al., 2003; Markakis et Gage, 1999).



**Figure 5: Neurogenèse dans la zone sous-granulaire (ZSG) dans le gyrus dentelé de l'hippocampe adulte.**

**(A)** Coupe coronale de cerveau de rat. Le gyrus dentelé, identifié en rouge, est agrandi en **(B)**. **(B)** Structure de l'hippocampe. L'encadré est agrandi en **(C)**. **(C)** Illustration schématique de la composition et de l'architecture de la ZSG du gyrus dentelé. La neurogenèse adulte dans le gyrus dentelé de l'hippocampe se déroule en 4 étapes.

**Etape 1 : Prolifération.** Les progéniteurs de type I (PI ; rose) génèrent des progéniteurs de type II (PII ; rouge) par division asymétrique.

**Etape 2 : Spécification.** Les PII donnent naissance à des neurones immatures.

**Etape 3 : Migration.** Les neurones immatures migrent dans la couche des cellules granulaires.

**Etape 4 : Intégration synaptique.** Les neurones immatures se différencient en neurones matures. Ils projettent leurs axones dans la région CA3 de l'hippocampe afin de former les fibres moussues et projettent leurs dendrites à l'extérieur de la couche granulaire. CE, cortex entorhinal ; GD, gyrus dentelé ; ZSG, zone sous-granulaire.

Adapté de D.C. Lie et al 2004.

### 3. Rôle des molécules immunes dans la neurogenèse

Nous avons vu précédemment que la neurogenèse *in vivo* était restreinte à deux régions bien précises que sont la SZV et la ZSG. Cependant, des études montrent que des CSN prélevées dans de nombreuses régions du cerveau sont capables *in vitro* de générer des neurones (Palmer et al., 1999). L'incapacité de produire de nouveaux neurones dans le cerveau adulte ne serait donc pas due à l'absence de cellules souches mais serait plutôt due à des voies de signalisation locales qui freineraient cette neurogenèse. Connaître ces mécanismes inhibiteurs afin de pouvoir moduler cette neurogenèse est donc important pour le développement des stratégies de restauration cellulaire, notamment dans le cadre des maladies neurodégénératives. Il a été démontré que des molécules du système immunitaire ont un impact sur la régulation de la neurogenèse adulte. Parmi ces molécules, on retrouve des molécules de l'immunité innée mais également des molécules produites lors de l'inflammation (cytokines et chimiokines).

Les molécules de l'immunité innée impliquées dans la régulation de la neurogenèse sont les récepteurs spécifiques des cellules dendritiques du SI appelés récepteurs de type Toll (TLRs : Toll-like receptors) et la molécule C3a, peptide dérivé du système du complément, et son récepteur C3aR.

Les TLRs, comptant 10 à 12 membres chez l'homme et la souris, sont des récepteurs spécifiques des cellules dendritiques du SI. Découvertes au milieu des années 90, ces protéines transmembranaires de type 1 font partie de la famille des PRR (Pattern-recognition receptors) et sont capables de détecter des motifs microbiens très conservés appelés PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) qui peuvent être des lipides, lipoprotéines, protéines et acides nucléiques provenant de bactéries, virus, parasites et champignons (Kawai et Akira, 2010; Akira et al., 2001; Janeway et Medzhitov, 2002). Ces récepteurs sont classiquement impliqués dans l'immunité innée immédiate et participent à la première défense d'un organisme lors d'une agression. Les TLR2, 3 et 4 sont exprimés par les cellules souches neurales (Okun et al., 2010; Lathia et al., 2008; Ma et al., 2006; Lafon et al., 2006). Des études montrent *in vitro* comme *in vivo* que le TLR2 facilite la neurogenèse de la ZSG du gyrus dentelé de l'hippocampe de souris adulte tandis que les TLR4 et TLR3 l'inhibent (Lathia et al., 2008; Rolls et al., 2007). De plus, l'activation de TLR4 dans les cellules progénitrices de la rétine de souris au cours de la période post-natale freine leur prolifération (Shechter et al., 2008).

Les molécules du complément, protéines circulantes ou membranaires connues du 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 microbiens appelés PAMPs et ACAMPs (apoptotic cell-associated molecule patterns). Ainsi, elles peuvent détruire les pathogènes directement par lyse ou en recrutant des cellules phagocytaires (Morgan et Gasque, 1996). Une étude montre l'expression des récepteurs des molécules du

complément C3a et C5a dans les cellules progénitrices neurales (Rahpeymai et al., 2006). Chez la souris, la neurogenèse de la ZSV est favorisée par l'activation de la molécule C3a et de son récepteur C3aR *in vivo* (Rahpeymai et al., 2006) et stimule la différenciation neuronale des cellules progénitrices neurales *in vitro* (Shinjyo et al., 2009).

La mise en évidence de l'expression de facteurs dits immuns par les CSN et de leur action sur la neurogenèse pourrait représenter un lien entre les infections virales contractées lors du développement *in utero* et la survenue de maladies neurodéveloppementales telles que l'autisme et la schizophrénie (Ashwood et al., 2006; Ellman et Susser, 2009).

## **B. Polarisation neuronale**

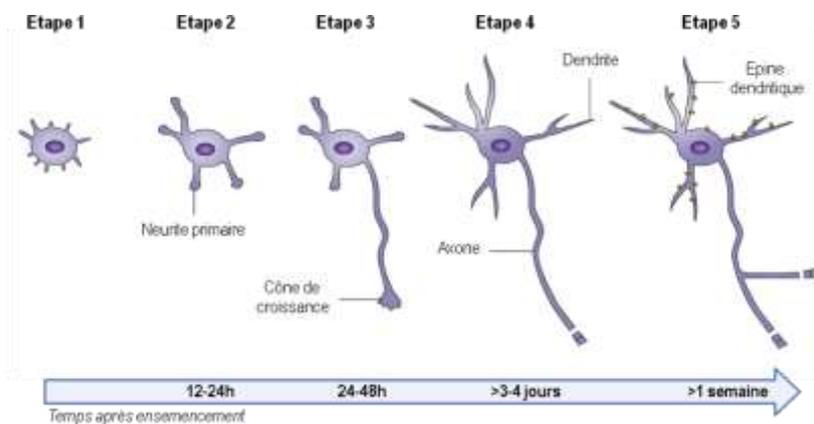
La fonction du système nerveux dépend majoritairement de la complexité architecturale des réseaux neuronaux. Cette complexité résulte de la morphologie particulière que les neurones acquièrent lors de leur différenciation à partir d'une simple sphère. L'émergence ainsi que l'élongation des axones et des dendrites forment les bases d'une connexion neuronale correcte. Malgré la variété de formes de neurones au cours du développement neuronal, la pousse initiale d'un neurite est observée chez tous les neurones et est divisée en trois étapes. Tout d'abord, la forme sphérique initiale du neurone se brise et un bourgeon se forme. Puis ce bourgeon se transforme en neurite qui se développe par la suite soit en axone ou en dendrites.

### **1. Polarisation neuronale *in vitro***

Il existe plusieurs systèmes *in vitro* largement utilisés pour l'étude de la polarisation neuronale : culture de neurones embryonnaires d'hippocampe, neurones post-nataux du cervelet ou encore les neurones ganglionnaires de la rétine. Ces systèmes de culture *in vitro* ont permis de comprendre certains des mécanismes intracellulaires et moléculaires impliqués au cours de la polarisation neuronale car ils reproduisent *in vitro* certaines caractéristiques du développement *in vivo*.

Un des modèles les plus utilisés est la culture de neurones d'hippocampe de rat (Craig et Banker, 1994; Kaech et Banker, 2006). L'équipe de Banker a ainsi décrit en détail les changements morphologiques qui se produisent au cours de cette polarisation (Dotti et al., 1988). Ils ont ainsi divisé les événements morphologiques en cinq étapes (Figure 6). Suite à leur dissociation à partir de cerveau embryonnaire de rat, 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 appelés également prolongements mineurs se développent (étape 2). Ces neurites, qui possèdent à leurs extrémités des structures

mobiles appelées cônes de croissance, sont de morphologie identique et suivent un processus d'allongement/rétraction répété et aléatoire qui n'est possible que par un remaniement continu du cytosquelette d'actine. Un de ces neurites immatures commence à s'étendre plus rapidement et devient beaucoup plus long que les autres neurites (étape 3). Ce prolongement suit alors les étapes de différenciation axonale. Les autres neurites continuent de suivre leur processus d'allongement/rétraction, maintenant ainsi leur longueur et se différencient en dendrites au bout de quelques jours (étape 4). Au cours de ce processus, les dendrites s'épaissent et forment des épines dendritiques immatures. Une semaine environ après ensemencement, les neurones établissent les premiers contacts synaptiques entre les filopodes dendritiques et les terminaisons axonales et créent ainsi un réseau neuronal (étape 5).



**Figure 6: 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 de petites protrusions appelées filopodes (étape 1). Ces filopodes vont donner naissance aux neurites immatures appelés également neurites primaires (étape 2). Puis un des ces neurites casse la morphologie symétrique initiale et croît rapidement, établissant ainsi la polarité neuronale (étape 3). Quelques jours plus tard, les neurites restant s'allongent et se transforment en dendrites (étape 4). Une semaine après ensemencement, les neurones créent des contacts synaptiques entre les épines dendritiques et les terminaisons axonales, et forment un réseau neuronal fonctionnel (étape 5). Adapté de N. Arimura et K. Kaibuchi 2007.*

L'un des avantages de ce système de culture est la capacité des neurones dissociés d'établir leur polarité morphologique et fonctionnelle *in vitro* et de présenter un système cellulaire relativement homogène composé à 80% de neurones glutamatergiques pyramidaux et à 20% d'interneurones GABAergiques.

L'un des gros challenges scientifiques est de comprendre dans un premier temps comment une cellule, initialement de forme sphérique, se transforme en une cellule contenant de nombreux neurites. Et dans un second temps, pourquoi l'un de ces neurites se différencie en un unique axone et les autres en dendrites (Figure 7).

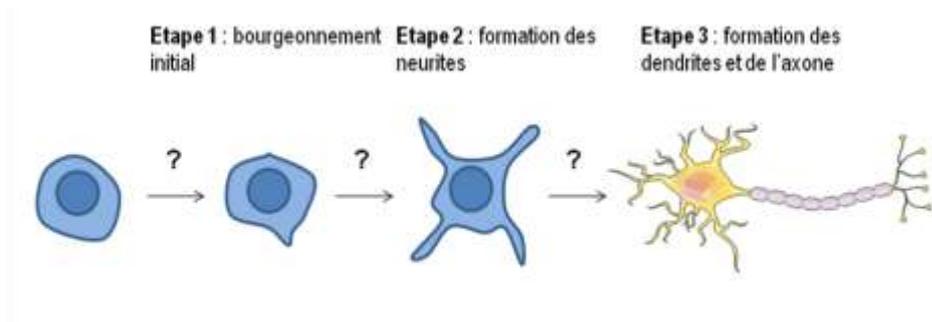


Figure 7: Etapes clés de la polarisation neuronale.

### a) L'émergence des premiers neurites

La croissance des neurites, découverte par Santiago Ramon y Cajal, est un processus fondamental dans la différenciation des neurones. La formation de ces neurites est déterminée par l'existence au niveau de la membrane plasmique de microdomaines caractérisés par la présence de récepteurs spécifiques et de leurs protéines associées. Cependant, les mécanismes permettant la formation de ces microdomaines sont encore mal identifiés. Deux hypothèses sont proposées (Figure 8) : (A) une interaction entre la membrane plasmique du neurone en migration et un ligand extracellulaire induit la formation de ce microdomaine ou (B) le microdomaine est déjà pré-formé puis activé par le ligand extracellulaire. Les ligands extracellulaires possibles sont des molécules solubles comme par exemple le FGF2 (fibroblast growth factors), TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) ou les neutrophines (Labelle et Leclerc, 2000; Tucker et al., 2001).

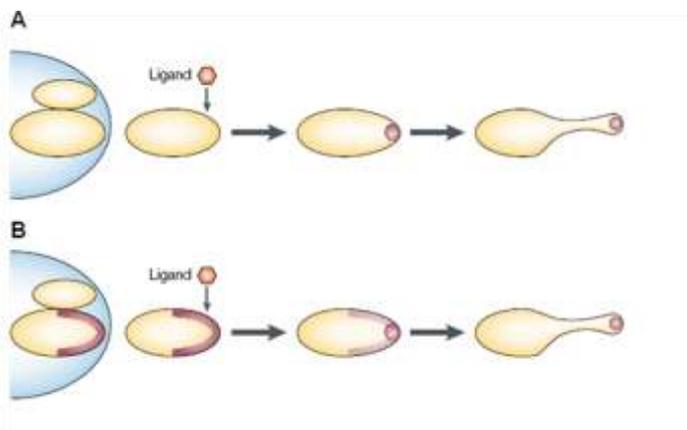


Figure 8: Hypothèses de la formation du site d'initiation du premier neurite.

(A) Modèle de formation du microdomaine. Au cours de leur migration des neuroblastes, un ligand spécifique induit la formation du microdomaine qui permet la pousse du premier neurite. (B) Modèle d'activation du microdomaine. Les neuroblastes possèdent déjà un domaine membranaire qui s'active en présence du ligand. Cette activation stimule la formation d'un site qui permet la pousse du neurite. Adapté de J.S. Da Silva et C.G. Dotti 2002.

Dans tous les cas, le premier signe de contact entre la membrane plasmique et le ligand extracellulaire est le changement d'apparence de la membrane qui aboutit à la formation d'extensions membranaires dynamiques formant un voile (lamellipodes) ou des pics (filopodes) (Condeelis, 1993; Pantaloni et al., 2001). De nombreuses études montrent que les lamellipodes, filopodes et les cônes de croissance sont des structures spécialisées impliquées dans la neuritogenèse (Dent et al., 2007; Igarashi et al., 1996; Kwiatkowski et al., 2007).

## (1) Domaines cellulaires importants impliqués dans l'émergence des neurites

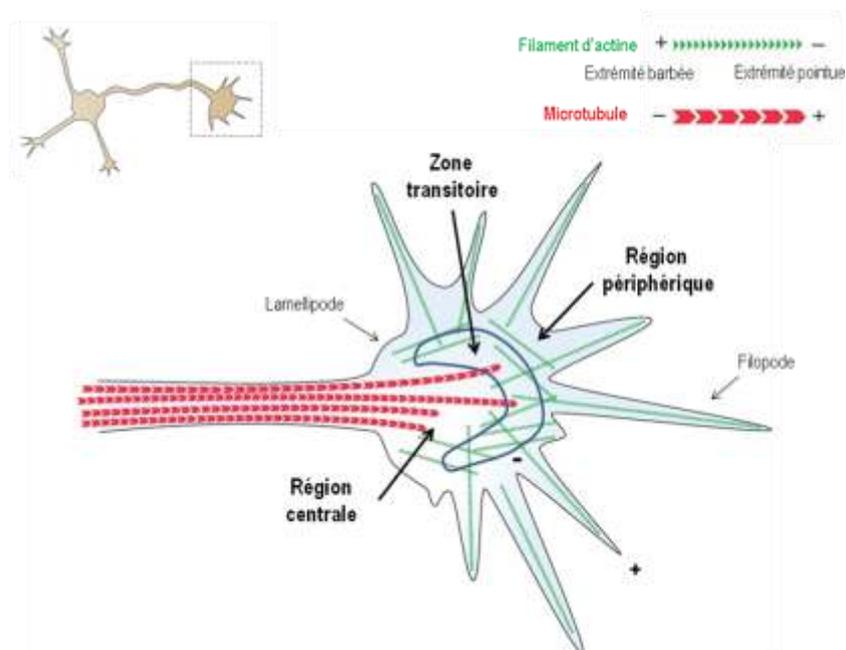
### (a) Les lamellipodes et filopodes

Les lamellipodes et les filopodes sont des structures riches en actine localisées tout autour de la cellule. 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 et non ramifiés. Les filopodes sont extrêmement mobiles. Ils s'allongent et se rétractent rapidement continuellement suite à l'exploration de leur environnement.

### (b) Le cône de croissance

Présent aux extrémités des neurites, le cône de croissance est un compartiment cellulaire très mobile (Figure 9). Cette structure permet la croissance des neurites grâce à la perception de signaux environnementaux (Dickson, 2002) qu'elle transmet au cytosquelette.

Il est composé d'une région centrale constituée d'organelles et de microtubules, d'une région transitoire composée de filaments d'actine et de microtubules, et d'une région périphérique, hautement dynamique et très riche en actine-F, contenant des lamellipodes et filopodes (Figure 9) (Ishikawa et Kohama, 2007).

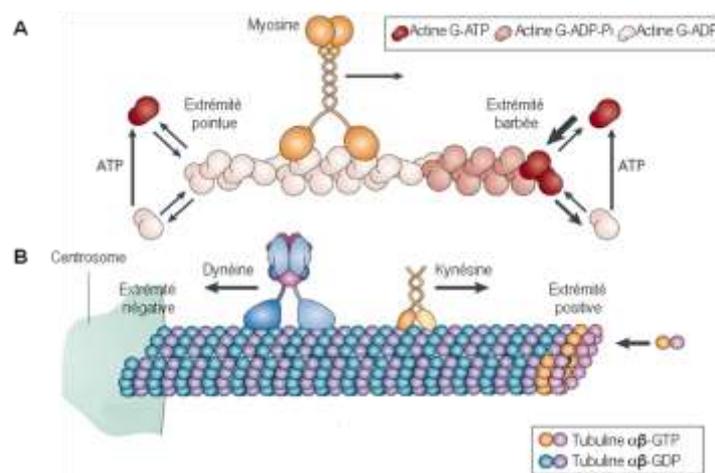


**Figure 9: Structure du cône de croissance.**

Le cône de croissance est organisé en 3 régions bien distinctes : Le domaine périphérique riche en actine, le domaine transitoire (bleu) et le domaine central riche en microtubules et en organelles. Deux superstructures sont présentes dans le domaine périphérique : des filaments d'actine forment les filopodes et entre les filopodes se trouvent des lamellipodes formés de maille d'actine. D'après S. Tahirovic et F. Bradke 2010.

## (2) Mécanismes cellulaires impliqués dans l'émergence des filopodes et des neurites

Le cytosquelette, composant les différentes structures décrites précédemment, est important puisqu'il permet l'établissement et le maintien de la polarité neuronale (Witte et Bradke, 2008). L'actine-F et les microtubules ont des propriétés fonctionnelles uniques qui leur permettent d'établir et de réguler la polarité des neurones mais également d'autres types de cellules polarisées (Li et Gundersen, 2008). Ce sont des polymères polaires qui sont composés, respectivement de sous-unités d'actine monomérique globulaire (actine-G) qui lient et hydrolysent l'ATP, et de sous-unités hétérodimériques de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  qui lient et hydrolysent le GTP (Figure 10). 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, barbée et pointue pour l'actine-F ; positive et négative pour les microtubules.



**Figure 10: Propriétés fondamentales des filaments d'actine et des microtubules.**

**(A) Représentation schématique d'un filament d'actine.** Les filaments d'actine sont composés de sous-unités orientées toutes dans la même direction de ce fait il existe deux extrémités bien distinctes (barbée et pointue). Les extrémités pointue et barbée du filament d'actine possèdent des associations de sous-unités ainsi que des vitesses de dissociation différentes. **(B) Représentation schématique d'un microtubule.** Les microtubules sont constitués de sous-unités hétérodimériques, tubulines  $\alpha\beta$ , qui sont orientées dans la même direction permettant ainsi la distinction de deux extrémités différentes (positive et négative). Dans les deux cas, les protéines motrices, myosine **(A)**, kinésines et dynéines **(B)** se déplacent de manière unidirectionnelle le long du filament en raison des interactions répétées avec l'orientation régulière des sous-unités. Adapté de R. Li et G. Gundersen 2008.

Dans le cône de croissance, les extrémités barbées (croissance rapide) de l'actine-F sont orientées vers le bord du cône de croissance tandis que les extrémités pointues (croissance lente) sont orientées vers la base du cône de croissance (Figure 9). Les sous-unités d'actine-G liée à l'ATP s'intègrent continuellement vers l'extrémité barbée tandis que les sous-unités d'actine-G liée à l'ADP se dissocient de l'extrémité pointue (Figure 10, A). Cette dynamique des sous-unités d'actine résulte

en un flux de sous-unités d'actine comme un tapis roulant permettant la régulation de la dynamique du cône de croissance. Ce mécanisme est modulé par de nombreuses protéines comme la myosine et/ou des régulateurs de l'actine (Ishikawa et Kohama, 2007). Concernant les microtubules, la polymérisation, qui nécessite l'hydrolyse du GTP en GDP, s'effectue au niveau du pôle positif orienté vers l'extrémité du cône de croissance tandis que la dépolymérisation se déroule dans le pôle négatif souvent ancré dans le centrosome ou autres centres organisateurs des microtubules (MTOC) (Figure 10, B). Le mécanisme de régulation de la dynamique des microtubules s'appuie sur des phénomènes de déstabilisation ou de stabilisation de l'organisation des microtubules (Geraldo et Gordon-Weeks, 2009).

### (a) Protéines régulatrices 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 le réseau complexe interagissant avec toute la cellule. Parmi ces protéines, il existe : des protéines dites de nucléation (Arp2/3 et la 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 les actine-F.

Dans les lamellipodes, le complexe Arp2/3 permet l'initiation de la polymérisation des filaments d'actine-F ramifiés (Ishikawa et Kohama, 2007) tandis que la formine joue ce rôle dans les filopodes (Kovar, 2006; Faix et Rottner, 2006). Cependant, d'autres études suggèrent un rôle du complexe Arp2/3 dans la formation des filopodes et des neurites (Korobova et Svitkina, 2008). En plus de ces protéines, il existe d'autres régulateurs de la dynamique du cône de croissance comme WAVE (Wiskott-Aldrich syndrom protein [WASP]-family verprolin-homologous protein), Ena/VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein), la profiline et ADF (actin depolymerizing factor)/cofiline (Ishikawa et Kohama, 2007). WAVE est exprimé dans les lamellipodes et fait partie d'un complexe protéique qui régule la polymérisation de l'actine dans les lamellipodes *via* Arp2/3 ou *via* la profiline (Takenawa et Miki, 2001; Pilo-Boyl et al., 2007). Les protéines Ena/VASP, localisées aux extrémités des lamellipodes et des filopodes, accélèrent la polymérisation de l'actine par leur activité anti-capping (Krause et al., 2003). En effet, chez les mammifères, la délétion des trois protéines Ena/VASP conduit à la formation aberrante de paquets d'actine et l'incapacité à former des filopodes (Kwiatkowski et al., 2007). De plus, les neurones délévés de ces protéines sont incapables de former des neurites. Les protéines Ena/VASP peuvent recruter le régulateur de l'actine, la profiline, cependant la relevance physiologique de cette interaction n'est pas encore claire (Krause et al., 2003). La profiline est localisée dans les cônes de croissance et favorise la formation des monomères

d'actine-G liés à l'ATP qui sont intégrés au niveau de l'extrémité barbée (Kwiatkowski et al., 2003). L'absence de l'isoforme neuronale, profiline IIa provoque la déstabilisation du cytosquelette d'actine et une augmentation de la longueur et du nombre de neurites (Da Silva et al., 2003). De manière surprenante, les souris déficientes pour la profiline II ont une polarisation neuronale normale, suggérant que la profiline I compense l'absence de la profiline II. Cependant, l'absence de la profiline I est létale (Witke et al., 2001). Les protéines de fragmentation comme la cofiline sont aussi impliquées dans la polarisation neuronale (Sarmiere et Bamberg, 2004). Deux des trois cofilines de mammifères (ADF et cofiline I) sont exprimées dans le cerveau. Elles sont abondantes dans les cônes de croissance des neurones. Elles lient avec une forte affinité l'actine liée à l'ADP par rapport à l'actine liée à l'ATP, ce qui favorise son association au niveau de l'extrémité pointue du filament d'actine et favorise la dépolymérisation de l'actine (Pak et al., 2008). Ces protéines régulant l'actine modulent donc ensemble le cytosquelette d'actine afin de briser la symétrie neuronale.

#### **(b) Protéines régulatrices des microtubules**

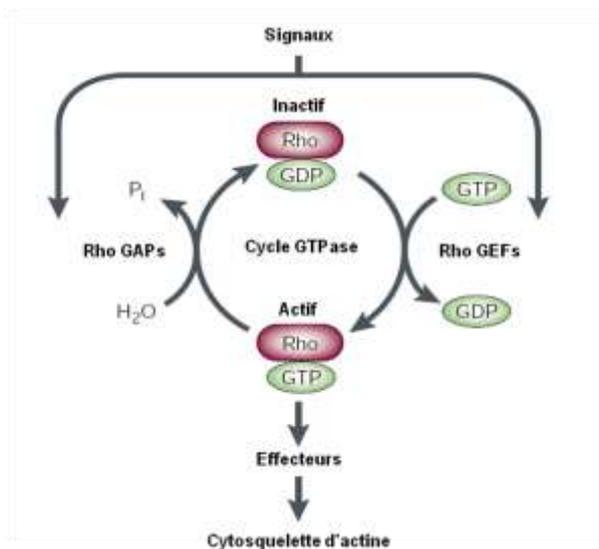
Les microtubules sont des polymères très instables qui suivent des phases alternatives de polymérisation et de dépolymérisation. La stabilité des microtubules est régulée *via* les protéines associées au microtubules (MAPs : microtubule-associated proteins). Certaines de ces protéines comme MAP1B ou MAP2 sont particulièrement intéressantes dans la polarité neuronale puisqu'elles interagissent aussi bien avec l'actine qu'avec les microtubules. Les membres de la famille des protéines plus-end tracking (+TIP) et les protéines de structure comme la famille MAP2/Tau appartiennent la famille des MAPs (Dehmelt et Halpain, 2004). Certaines protéines +TIP s'accumulent dans le microtubule en croissance au niveau de l'extrémité positive et ainsi régule sa dynamique (Galjart, 2005). Cependant, leur rôle dans la polarité neuronale reste à définir. Les MAPs de structure comme MAP2/Tau sont fortement exprimées dans le système nerveux et régulent la formation des neurites (Dehmelt et Halpain, 2004). Ces protéines agissent comme des stabilisateurs des microtubules, et de ce fait sont capables de limiter leur dépolymérisation et ainsi favoriser leur polymérisation. La diminution de l'expression de MAP2 inhibe la formation des neurites (Caceres et al., 1992). Cependant les souris déficientes pour ces protéines ne développent pas de défauts au niveau de la polarisation neuronale (Dehmelt et Halpain, 2004), suggérant une certaine redondance avec les autres MAPs. Bien que la plupart des MAPs augmente la stabilité des microtubules par fixation directe sur les polymères des microtubules, CRMP2 (collapsin response mediator protein-2) se fixe aux sous-unités de tubuline libres et augmente leur liaison aux microtubules (Fukata et al., 2002). Certaines données montrent que la protéine CRMP2 stimule l'assemblage des microtubules *via* son activité GTPase et favorise ainsi la formation des neurites (Chae et al., 2009). Récemment, il a été observé que l'isoforme courte de CRMP2 de 58KDa, présente aux stades embryonnaire et péri-

natal uniquement, inhibe la croissance des neurites *via* sa séquence NLS (nuclear localization signal) (Rogemond et al., 2008).

Les protéines régulant les microtubules ont le potentiel de gouverner la polarisation neuronale par la modulation de la dynamique des microtubules (Kawano et al., 2005).

### (c) Action coordonnées de l'actine et des microtubules grâce à la famille des protéines Rho GTPases ?

La nature des molécules qui font un lien entre elles pour coordonner les réponses aux signaux extracellulaires et former les neurites est peu connue. Actuellement, la piste de la famille des Rho GTPases (Ras-homologous guanosine triphosphatases) est privilégiée (Figure 11). Cette famille joue un rôle d'intermédiaire entre les récepteurs membranaires et le cytosquelette d'actine dont elle régule la dynamique (Wahl et al., 2000). Ces protéines alternent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. De nombreux régulateurs modulent la signalisation médiée par les Rho GTPases. Les régulateurs positifs appelés Rho GEFs (guanine nucleotide exchange factors) facilitent la transition de la forme inactive à la forme active des Rho GTPases tandis que les régulateurs négatifs, les Rho GAPs (GTPase activating protein) provoquent l'effet inverse (Figure 11). Les Rho GTPases les plus caractérisées sont les membres des familles RhoA (Ras homologous member A), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1) et Cdc42 (cell division cycle 42).

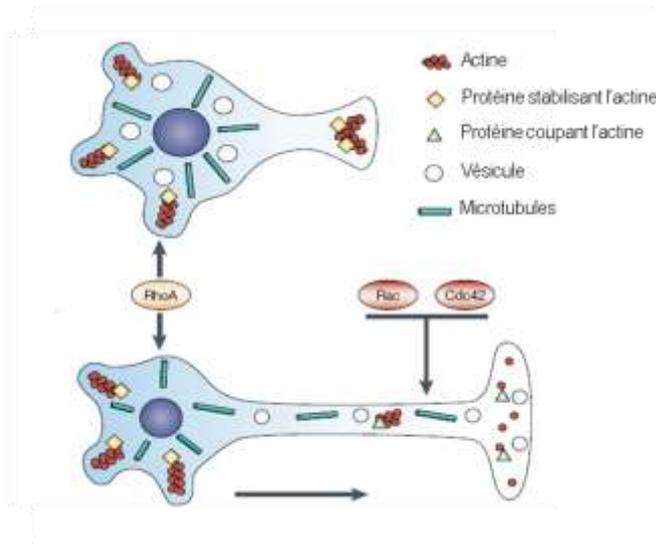


**Figure 11: Régulation des protéines Rho GTPases.**

Les Rho GTPases existent sous deux états différents : inactif lorsqu'elles sont liées au GDP et actif quand elles sont liées au GTP. Deux classes de molécules facilitent ce changement d'état : les GEFs (guanine nucleotide exchange factors) et les GAPs (GTPase activating proteins). Les GEFs permettent l'activation des protéines Rho GTPases, une fois liée au GTP elles se lient à une variété d'effecteurs et provoquent ainsi diverses activités biologiques. Au contraire les GAPs maintiennent les Rho GTPases dans un état inactif. Adapté de L. Luo et al 2000.

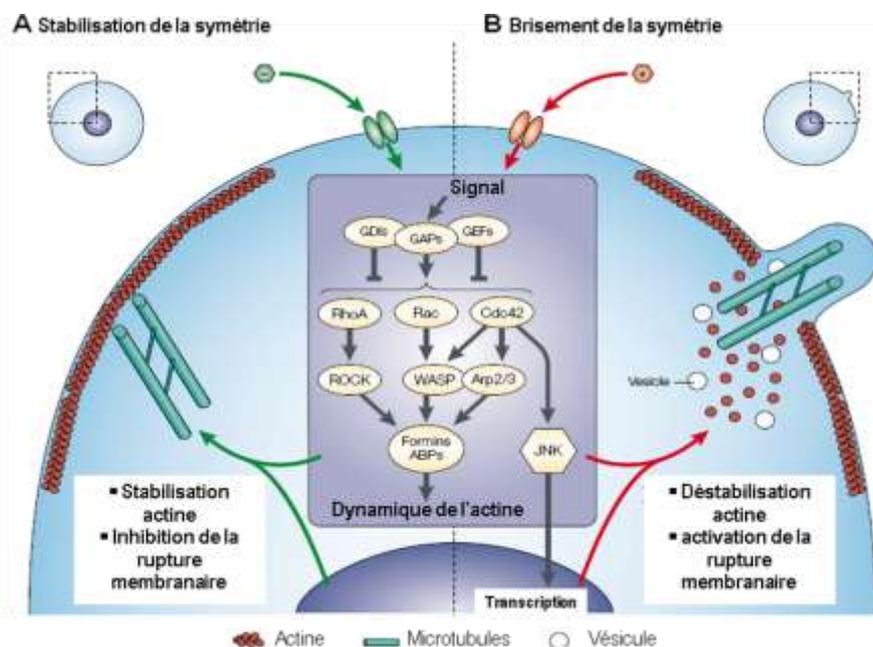
RhoA est impliqué dans la rétraction neuritique en régulant la contraction de l'actine liée à la myosine II (Luo, 2000). Rac1 participe à la formation des lamellipodes et Cdc42 à la formation des filopodes en agissant sur le complexe Arp2/3 *via* les protéines N-WASP (Notarangelo et Ochs, 2003). L'activation de Rac1 et Cdc42 favorise l'élongation des neurites alors que l'activation de RhoA l'inhibe (Figure 12) (Kozma et al., 1997). Cependant, cette classification fonctionnelle n'est pas rigide et peut être révisée en fonction des modèles cellulaires. Ces protéines sont également associées aux

microtubules permettant ainsi des intrusions transitoires de ceux-ci dans les régions riches en actine-F entraînant ainsi des changements dans la dynamique de l'actine (Dehmelt et Halpain, 2004).



**Figure 12: Vue simplifiée de l'action des protéines Rho GTPases dans la neuritogenèse.** Les lamellipodes sont riches en protéines Rho et expriment des protéines qui stabilisent l'actine. Dans les prolongements en élévation, Rac1 et Cdc42 favorisent l'action des protéines qui cassent l'actine. Adapté de J. S. Da Silva et C.G.Dotti 2002.

Les microtubules et l'actine par l'intermédiaire des protéines Rho GTPases sont importants pour briser la symétrie neuronale et permettre ainsi la pousse neuritique (Figure 13). Suivant les ligands extracellulaires perçus, les signaux favorisant ou inhibant la croissance neuritique sont transmis au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un même groupe de molécules. Cependant les mécanismes impliqués ne sont pour l'instant pas entièrement connus.



**Figure 13: Rôle de des protéines associées à l'actine dans la formation et l'extension des neurites**  
**(A)** Quand la stabilisation de la sphère est nécessaire, la cellule reçoit un signal inhibiteur de l'extension neuritique qui active via les GEFs ou inhibe via les GDIs et GAPs les petites protéines GTPases (RhoA, Rac1 et Cdc42). Le signal est transmis par d'autres protéines effectrices (ROCK, WASP, le complexe Arp2/3 et JNK). Les

protéines associées à l'actine augmentent la stabilité de l'actine et inhibent la rupture de la membrane. **(B)** Quand la formation des neurites est nécessaire, un signal favorisant cette formation transduit une cascade d'évènements intracellulaires qui provoque des changements d'activité des mêmes molécules effectrices. Cette modification d'activité moléculaire induit la déstabilisation de l'actine et la rupture de la membrane formant ainsi une extension neuritique. ABP, actin-binding protein; Arp, actin-related protein; Cdc42, cell-division cycle 42; GAP, GTPase-activating protein; GDI, guanine-nucleotide-dissociation inhibitor; GEF, guanine-nucleotide-exchange factor; JNK, c-Jun N-terminal kinase; ROCK, Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein. Adapté de J. S. Da Silva et C.G.Dotti 2002.

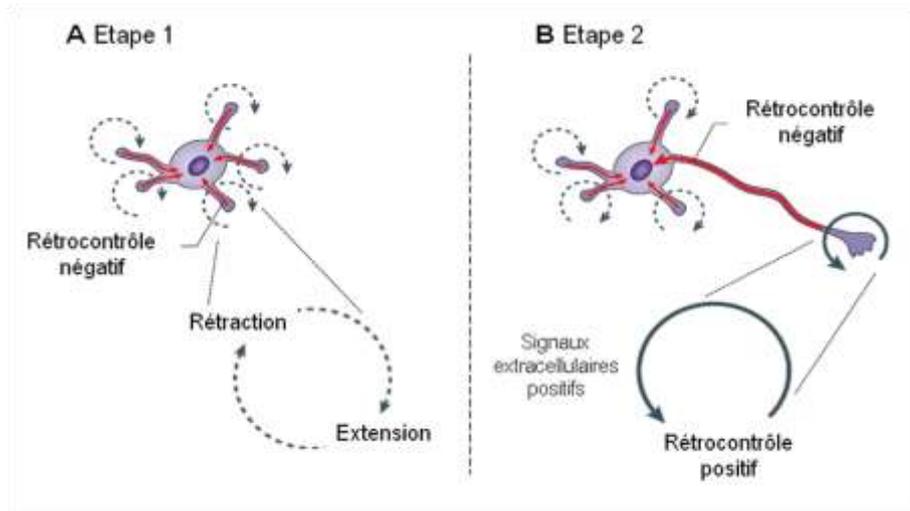
Parmi les protéines régulatrices des protéines Rho, la protéine GEF Vav est particulièrement intéressante pour notre étude. En effet, cette protéine est classiquement activée par la signalisation médiée par la protéine CD3 $\zeta$ . Suite à l'engagement du récepteur des lymphocytes T (TCR, T cell receptor), la protéine CD3 $\zeta$  est phosphorylée permettant la formation d'un complexe de protéines signalétiques incluant SLP-76, Nck et Vav (Barda-Saad et al., 2010; Tybulewicz, 2005). Ces protéines sont importantes pour le contrôle du cytosquelette d'actine et sont de ce fait essentielles pour la régulation des fonctions des lymphocytes T (LT). Des données récentes montrent l'importance de la protéine Vav2 dans la formation des prolongements neuronaux. En effet, l'activation de cette protéine favorise la ramification des neurites et des axones *in vivo* et *in vitro* (Moon et Gomez, 2010), le développement dendritique et axonal ainsi que la formation des filopodes et épines dendritiques *in vitro* (Murata et al., 2006).

## **b) Différentiation axonale**

La différenciation des premiers neurites conduit à la formation d'un axone et des dendrites. Cette spécification axonale et dendritique est réalisée grâce à des signaux extracellulaires, intracellulaires et aux mêmes structures cellulaires impliquées dans l'émergence des neurites incluant les filopodes, lamellipodes et cônes de croissance.

### **(1) Les grandes étapes de la spécification axonale**

Les neurites formés passent par des cycles d'extension et de rétraction. Ces cycles sont contrôlés par des molécules extracellulaires répulsives (négatives) ou attractives (positives) qui régulent la dynamique de l'actine et des microtubules et influencent le transport protéique (Figure 14) (Andersen et Bi, 2000).



**Figure 14: Modèle de la spécification axonale au cours de la polarisation neuronale.**

**(A)** Au cours de l'étape 1, les neurites s'étendent et se rétractent aléatoirement pour maintenir leur longueur.  
**(B)** Quand la balance entre les signaux positifs et négatifs est déséquilibrée par les signaux extracellulaires au cours de la transition entre l'étape 1 et 2, un des neurites croît rapidement. Adapté de N. Arimura et K. Kaibuchi 2007.

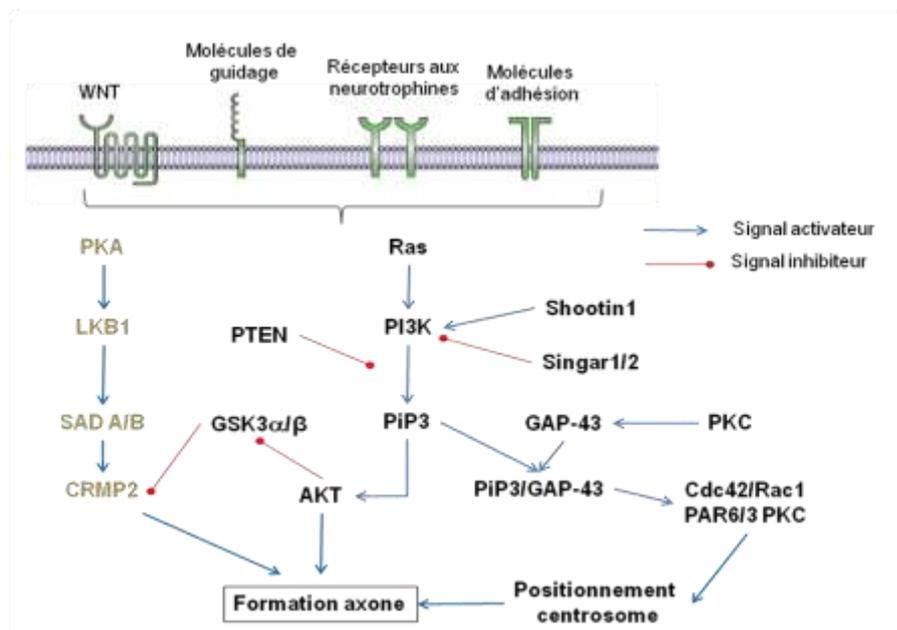
L'extension des neurites se divise en 4 étapes : (1) une augmentation de la fusion et du recrutement de vésicules, (2) une augmentation locale de la concentration et de l'activation de protéines de signalisation, (3) une augmentation de la dynamique de l'actine et (4) la stimulation de la formation des microtubules. Suite à cette petite élongation, la réaction inverse se produit : (1) déstabilisation des microtubules, (2) diminution de la dynamique de l'actine et (3) augmentation de l'endocytose. De plus, chaque neurite renvoie un signal négatif dans le corps cellulaire afin d'inhiber la spécification axonale (Andersen et Bi, 2000). Les signaux négatifs et positifs perçus par les neurites sont équilibrés avant la spécification axonale. Cependant cet équilibre est brisé par un signal extracellulaire positif qui conduit à l'élongation d'un neurite et forme ainsi l'axone (Figure 14) (Arimura et Kaibuchi, 2007). Cette élongation renvoie un signal négatif aux autres neurites afin d'inhiber la formation d'un nouvel axone. Pourquoi un neurite plutôt qu'un autre est sélectionné pour former l'axone ? Quels sont les mécanismes impliqués dans cette sélection ? De nombreuses études montrent une corrélation entre la localisation du centrosome et la différenciation de l'axone. En effet, il s'oriente *in vitro* vers le neurite qui deviendra le plus long et permet le recrutement de molécules de signalisation comme Cdc42 et le complexe Par (partitioning defective). Cette agrégation sélective dans l'un des neurites permet la différenciation de ce neurite en axone (De Anda et al., 2005; Mishra et al., 2008; Gupta et al., 2010). De même, il a été montré que l'activité de la protéine PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) est concentrée à l'extrémité du neurite qui deviendra l'axone (Shi et al., 2003) et son inhibition empêche la spécification axonale (Ménager et al., 2004; Shi et al.,

2003; Schwamborn et Püschel, 2004a). Récemment, une étude montre un rôle de la protéine JNK (c-Jun N-terminal kinase), membre de la famille des MAP (mitogen-activated protein) kinases (Manning et Davis, 2003), dans la régulation de la polarité neuronale. Cette protéine phosphorylée est sélectivement enrichie dans l'axone naissant et son inhibition pharmacologique ou génétique empêche la formation de l'axone sans affecter celle des neurites et des dendrites (Oliva et al., 2006).

Les observations décrites ci-dessus indiquent que les signaux extracellulaires conduisent à une réponse intracellulaire qui va permettre la détermination de l'axone au cours du développement *in vivo*. Cependant, les neurones embryonnaires en culture (en l'absence de gradient physiologique de signaux extracellulaires) se polarisent. Par conséquent, des cascades de signalisation intracellulaire requises pour la polarisation neuronale sont activées même hors du contexte physiologique du cerveau en développement. Cela suppose qu'il puisse exister une programmation intrinsèque aux neurones pour l'établissement de leur polarisation.

## (2) Signalisation impliquée dans la différenciation axonale

Il existe différentes classes de molécules extracellulaires qui permettent l'activation de la voie de signalisation impliquée dans la différenciation axonale. Elles incluent les familles des protéines Wnt, des molécules d'adhésion comme la laminine et la vitronectine, des molécules de guidage comme les sémaphorines et les nétrines, les neurotrophines comme le NGF (nerve growth factor) et le BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Parmi les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la différenciation axonale, il y a la voie dépendante de la protéine PI3K et la voie dépendante de la protéine kinase A (PKA) (Figure 15).



**Figure 15: Voies de signalisation impliquées dans la spécification axonale au cours de la polarisation neuronale.** Les flèches rouges indiquent la régulation négative tandis que les bleues indiquent la régulation positive.

### (a) Voie dépendante de la PI3K

La protéine PI3K activée par la protéine Ras au cours de la transduction du signal, génère du PIP3 (phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate). Les signaux permettant l'activation de Ras comprennent des récepteurs de facteurs de croissance, les molécules de guidage, les molécules d'adhésion et le facteur Wnt. De nombreux travaux montrent le rôle majeur de la PI3K dans la spécification axonale car l'inhibition pharmacologique de celle-ci bloque la formation de l'axone (Jiang et al., 2005; Ménager et al., 2004; Shi et al., 2003; Yoshimura et al., 2006) et sa surexpression engendre la formation de nombreux axones (Yoshimura et al., 2006). Deux protéines, Shootin1 et Singar1/2, interagissant avec la PI3K ont été identifiées comme des régulateurs potentiels de la formation axonale (Mori et al., 2007; Toriyama et al., 2006). La surexpression de Shootin1 favorise l'accumulation de la PI3K dans les neurites et induit la formation excessive d'axones tandis que la déficience en cette protéine empêche la formation de l'axone. Ces études mettent en évidence le rôle de Shootin1 dans la régulation de l'activité de la PI3K et son transport sélectif dans le futur axone. Au contraire Singar inhibe la formation axonale en bloquant l'activité de la PI3K. En effet, la diminution de l'expression protéique de Singar favorise la formation axonale. Une autre protéine jouant un rôle en opposition directe avec l'activité de la PI3K est la protéine PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10). Elle déphosphoryle le PIP3 en PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) et de ce fait régule négativement la signalisation médiée par la PI3K. La surexpression de la protéine PTEN empêche la formation de l'axone tandis que sa répression la favorise (Jiang et al., 2005; Shi et al., 2003).

Suite à l'activation de la PI3K, la protéine kinase B, appelée également protéine AKT, est recrutée par le PIP3 au niveau des cônes de croissance et activée par phosphorylation de sa thréonine 308 et de sa sérine 473 (Shi et al., 2003). Cette protéine agit en aval de la voie de signalisation médiée par la PI3K afin de réguler la formation de l'axone. En effet, la surexpression de cette protéine favorise la genèse axonale (Yoshimura et al., 2006). La protéine AKT régule l'activité de plusieurs protéines par des processus de phosphorylation. Elle peut notamment inhiber l'activité de la protéine kinase GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase  $\beta$ ) (Delcomenne et al., 1998), une protéine sérine/thréonine kinase qui inhibe la formation de l'axone (Jiang et al., 2005; Yoshimura et al., 2005). L'inhibition de la GSK3 $\beta$  provoque la conversion des dendrites en axones démontrant ainsi que les dendrites ont le potentiel de devenir des axones et que cette action est normalement réprimée par l'activité de la protéine GSK3 $\beta$ . Ainsi pour former l'axone, la protéine AKT inhibe l'activité de la protéine GSK3 $\beta$ . De nombreuses cibles de cette protéine sont des effecteurs de la polarité neuronale impliqués dans la régulation du cytosquelette des microtubules. L'un de ces effecteurs est la protéine CRMP2 qui se lie aux microtubules et qui est enrichie dans les terminaisons des axones en formation. La protéine CRMP2 inhibée par la protéine GSK3 $\beta$  a une affinité de liaison diminuée pour les

hétérodimères des microtubules ce qui les désassemble et empêche la formation de l'axone (Inagaki et al., 2001; Yoshimura et al., 2005). Le PIP3 peut également s'associer à la protéine GAP-43 (growth-associated protein-43) activée par la PKC (protéine kinase C). Ainsi les protéines GTPases de la famille Rho, Cdc42 et Rac1, sont recrutées et en s'associant avec le complexe PAR3/PAR6 favorisent la différenciation axonale (Garvalov et al., 2007; Schwamborn et Püschel, 2004b; Lin et al., 2000). Les protéines PAR3 et PAR6 se complexent également avec la PKC (Joberty et al., 2000). La surexpression ou la mutation de ce complexe perturbe la formation axonale (Shi et al., 2003).

### **(b) Voie dépendante de la protéine kinase A, PKA**

Une autre voie impliquée dans la spécification axonale est celle médiée par la PKA. Cette voie de signalisation intracellulaire peut être activée par les neurotrophines, nétrines ou les sémaphorines (Adler et al., 2006; Chen et al., 2008; Polleux et al., 1998). L'activation de la PKA induit la phosphorylation de la protéine LKB1 appelée également PAR4 (Collins et al., 2000; Sapkota et al., 2001; Shelly et al., 2007). Pour être active, la protéine LKB1 doit être phosphorylée et se lier à son co-activateur, la protéine Strad. La délétion génétique de la protéine LKB1 dans les neurones pyramidaux du cortex bloque la formation des axones tandis que la surexpression de LKB1 et de son co-activateur Strad dans les progéniteurs neuronaux ou celle de LKB1 seul dans les neurones post-mitotiques conduit à la formation de plusieurs axones (Asada et al., 2007; Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007). De plus, il a été démontré que la phosphorylation des protéines kinases SAD A et B par LKB1 est nécessaire pour la formation axonale. L'absence des kinases SAD inhibe la capacité de LKB1 à former l'axone *in vitro* et *in vivo* supposant ainsi que la fonction de la protéine LKB1 dérive de l'activation des protéines SAD A et B (Barnes et al., 2007; Kishi et al., 2005). La surexpression des protéines SAD favorise la formation des axones (Choi et al., 2008).

Une fois l'axone formé, des molécules neurotrophiques, participent également à la régulation de sa croissance. En effet, des études montrent que le BDNF et le NGF favorisent l'élongation axonale (Tucker et al., 2001; Yoshimura et al., 2005) mais peuvent également augmenter le nombre de ramifications des terminaisons axonales sans affecter la longueur de l'axone (Madduri et al., 2009; Ozdinler et Macklis, 2006). De plus, *via* leur fixation aux intégrines, les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) ont une action coordonnée avec les neurotrophines afin de réguler efficacement la croissance axonale (Goldberg et al., 2002; Liu et al., 2002). Les intégrines activées par les protéines de la MEC stimulent la croissance axonale par la régulation de la dynamique des microtubules et par l'activation de la transcription génique (Ffrench-Constant et Colognato, 2004). Chez les mammifères, l'inhibition des Rho GTPases bloque la croissance axonale stimulée par les nétrines *in vitro* (Yuan et al., 2003). En effet, chez la drosophile, des défauts de l'activité de Rac1 bloquent la croissance axonale (Ng et Luo, 2004) et sa surexpression chez la souris provoque une

diminution de l'arborisation terminale axonale (Luo et al., 1996). Cependant, certains résultats indiquent que Rac1 favorise la croissance axonale (Kozma et al., 1997; Ng et al., 2002). Ces données suggèrent que suivant la signalisation impliquée, Rac1 peut à la fois activer ou réprimer la croissance axonale. De plus, RhoA est un acteur central dans la régulation de la croissance axonale, mais son action est différente suivant le modèle étudié. En effet, chez le rat, il est essentiel à la régulation positive de la croissance axonale des neurones de l'hippocampe (Ahnert-Hilger et al., 2004). A l'inverse, chez la drosophile, son activation provoque une inhibition de la pousse axonale (Brouns et al., 2001). Ces données suggèrent une extrême adaptation de l'action de RhoA en fonction du contexte physiologique. Bien que certaines études montrent que le Cdc42 réprime la croissance axonale chez la drosophile et chez le Xénope (Luo et al., 1994; Ruchhoeft et al., 1999), il semble qu'il soit en général un régulateur positif chez le rat (Schwamborn et Püschel, 2004a) (Figure 15).

Il a aussi été montré que les netrines et les neurotrophines stimulent la croissance axonale *via* le facteur de transcription NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) (Graef et al., 2003). L'activation du facteur NFAT est dépendante de l'activation de la calcineurine par le calcium intracellulaire (Hogan et al., 2003). De nombreuses études montrent l'implication de la voie de signalisation Calcineurine/NFAT dépendante du calcium au cours du développement neuronal (Groth et Mermelstein, 2003; Graef et al., 2003). En effet, les souris déficientes pour le NFAT ont des défauts majeurs de la croissance axonale ainsi que des anomalies de projections axonales. Il a également été montré que les sémaphorines 7A et 4D favorisent la croissance axonale (Masuda et al., 2004; Pasterkamp et al., 2003) tandis que la sémaphorine 3A l'inhibe (Ben-Zvi et al., 2008).

## **c) Différenciation dendritique**

### ***(1) Les grandes étapes de la différenciation dendritique***

Une fois la spécification axonale achevée, les neurites restant vont se différencier en dendrites. La maturation des dendrites consiste en une série d'étapes qui inclut (1) l'élongation dendritique, (2) la ramification des dendrites, la formation des épines dendritiques et des synapses (3) puis la stabilisation (Williams et Truman, 2004; Portera-Cailliau et al., 2003; Polleux et al., 1998).

La croissance initiale des dendrites est relativement lente puis s'accélère. Par exemple, la longueur totale des dendrites augmente de 50 à 100  $\mu\text{m}$  au cours des premières 24h du développement de l'arborisation dendritique puis la croissance est 4 fois plus rapide au cours des 48h suivantes (Wu et al., 1999). Par la suite, la ramification dendritique se produit en étroite

corrélation avec l'activité neuronale et la genèse des synapses grâce à la formation des épines dendritiques. Les épines dendritiques sont des éléments post-synaptiques de la taille du micron. Elles sont présentes sur les neurones épineux excitateurs (neurones pyramidaux du néocortex et l'hippocampe) mais aussi sur les neurones épineux inhibiteurs (cellules de Purkinje du cervelet et neurones GABAergiques du striatum) (Harris et Stevens, 1989; Spacek et Hartmann, 1983). Ces épines sont caractérisées par la présence d'une structure dense aux électrons visibles en microscopie électronique, la densité post-synaptique (PSD), qui est associée à la membrane synaptique en regard de l'élément pré-synaptique. La PSD a une composition moléculaire complexe contenant notamment des récepteurs au glutamate, des canaux ioniques, des molécules d'échafaudage et des protéines du cytosquelette (Sheng et Hoogenraad, 2007). Certains de ces éléments seront plus particulièrement présentés au cours de cette introduction. Ces épines dendritiques peuvent être générées au contact d'un élément pré-synaptique à partir des filopodes présents sur le tronc dendritique (Portera-Cailliau et al., 2003; Yuste et Bonhoeffer, 2004). Cependant, des études montrent une émergence des épines dendritiques de manière indépendante des filopodes (Marrs et al., 2001; Engert et Bonhoeffer, 1999). Dans certains neurones, les filopodes ne se transforment pas systématiquement en épines dendritiques suggérant ainsi que la formation des épines dendritiques ne nécessite pas la formation préalable de filopodes et inversement. A ce jour, les mécanismes impliqués dans la formation et la maturation des épines dendritiques ne sont pas clairement définis.

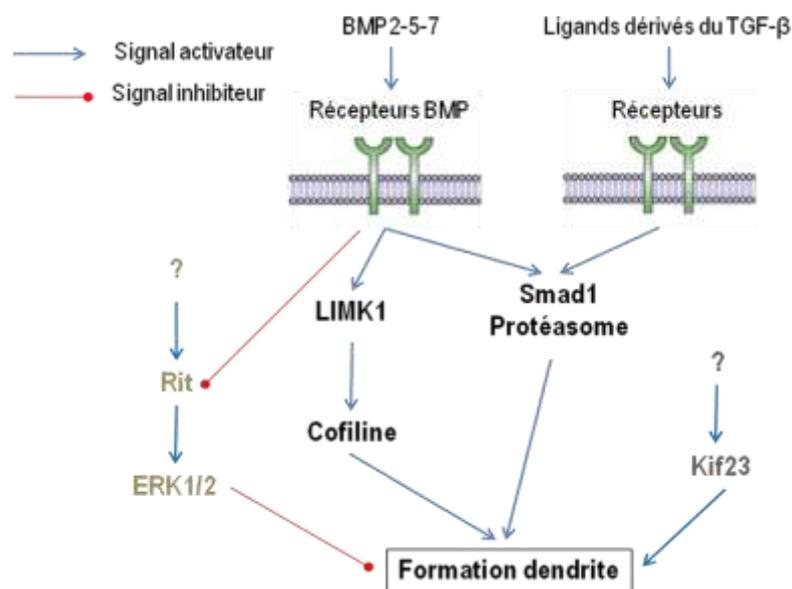
Toutes ces étapes participant à la différenciation dendritique sont hautement régulées par des signaux extracellulaires présents dans l'environnement local des neurones.

## **(2) Signalisation impliquée dans la différenciation dendritique**

Malgré de nombreuses données concernant la croissance et l'élaboration des embranchements dendritiques, les mécanismes moléculaires responsables de la spécification dendritique sont encore très mal connus.

Certaines études montrent que les protéines motrices du cytosquelette des microtubules peuvent affecter l'identité du neurite et que la protéine Kif23 est nécessaire pour la formation et la maintenance des dendrites (Figure 16) (Sharp et al., 1997; Yu et al., 2000). Il a été montré que les neurones sympathiques forment des axones mais pas de dendrites en l'absence de sérum et de support glial *in vitro* (Tropea et al., 1988). De manière intéressante, le traitement avec certaines protéines BMP (bone morphogenetic protein), appartenant à la superfamille du TGF- $\beta$  (transforming growth factor), induisent la formation des dendrites de ces neurones *in vitro* cependant ce rôle n'a pas encore été démontré *in vivo* (Beck et al., 2001; Guo et al., 2001; Lein et al., 1995). D'autres

résultats montrent que cet effet est médié par l'activation de la protéine Smad1 et du protéasome (Guo et al., 2001). Certaines études révèlent que le récepteur 2 des BMP facilite l'activation de la protéine kinase LIMK1 *via* Cdc42 et ainsi favorise la formation des dendrites (Lee-Hoeflich et al., 2004). Rit, une petite protéine GTPase inhibe les effets induits par la stimulation du facteur soluble BMP7 *via* l'activation des protéines ERK1/2 (Lein et al., 2007). De plus les ligands dérivés du TGF- $\beta$  favorisent la formation dendritique dans les neurones ganglionnaires de la rétine chez le Xénope *in vivo* et *in vitro* (Hocking et al., 2008).



**Figure 16: Voies de signalisation impliquées dans la spécification dendritique au cours de la polarisation neuronale.**

*Les flèches rouges indiquent la régulation négative tandis que les bleues indiquent la régulation positive.*

De nombreuses familles de molécules régulent le développement dendritique. Parmi ces différentes familles, on trouve des facteurs de transcription, la famille des protéines Rho GTPases, des protéines d'échafaudage, des molécules d'adhésion et des molécules de guidage.

### (a) Facteurs de transcription

Une voie de signalisation dépendante du calcium mettant en jeu le facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein) est importante dans le développement dendritique. CREB se lie constitutivement à l'ADN et quand il est phosphorylé au niveau de la sérine 133, il se fixe à un coactivateur de la transcription, la protéine CBP (CREB binding protein) et permet ainsi la transcription de gènes. Le mécanisme par lequel CREB et CBP régulent la croissance dendritique n'est

pas encore défini. Cependant, l'implication de CREB et CBP est évident car la perturbation de l'un de ces facteurs altère le développement dendritique (Redmond et al., 2002).

Un autre facteur de transcription activé par le calcium, CREST (calcium-responsive transactivator) est aussi impliqué dans le développement dendritique (Aizawa et al., 2004). En effet, des études *in vitro* et *in vivo* sur des souris déficientes pour CREST montrent des anomalies du développement dendritique (Redmond et Ghosh, 2005). Localisé constitutivement dans le noyau, il ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN et se lie directement aux coactivateurs CBP et p300. Les mécanismes de régulation induits par le calcium restent à ce jour inconnus. CREB et CREST partagent donc le même coactivateur, CBP, ainsi qu'une fonction commune dans la croissance dendritique médiée par le calcium. La fonction de régulation de CBP apparaît donc comme centrale dans ce mécanisme et dans le choix du facteur de transcription impliqué.

Le facteur de transcription NeuroD, appartenant à la famille des protéines dites bHLH (basic helix-loop-helix), est exprimé dans les neurones avant même que la spécification axonale ou dendritique ne s'est effectuée (Lee et al., 2000), suggérant ainsi que ce facteur de transcription ait un rôle dans la croissance axonale et dendritique. L'inactivation du gène codant pour le neuroD dans les neurones granulaires du cervelet provoque l'inhibition du développement dendritique sans affecter la pousse axonale. Cette étude révèle donc un rôle sélectif du NeuroD dans la formation des dendrites (Gaudillière et al., 2004).

Récemment, il a été montré que les protéines Cux (Cux1 et Cux2), appartenant à la famille des facteurs de transcription à homéodomains, régulent l'établissement des embranchements dendritiques et la morphologie des épines dendritiques des neurones pyramidaux du cortex chez la souris *in vivo* et *in vitro* (Cubelos et al., 2010; Li et al., 2010).

### **(b) Les petites protéines de la superfamille des GTPases**

Il a été montré que la surexpression de Rac1 provoque une augmentation de la complexité dendritique (Lee et al., 2003; Luo et al., 1996) tandis que RhoA génère un effet négatif sur la croissance dendritique. L'expression constitutive de la forme active de RhoA dans les neurones de mammifères (Ahnert-Hilger et al., 2004; Nakayama et al., 2000) ou non (Ruchhoeft et al., 1999; Lee et al., 2000) induit une diminution de la croissance dendritique. Le modèle de régulation ainsi proposé est que sous des conditions physiologiques normales, la voie dépendante de RhoA est réprimée afin de permettre la croissance dendritique et est localement activée quand cette croissance doit être limitée. Cdc42 semble jouer un rôle particulièrement important dans le remodelage et la ramification dendritique en favorisant la croissance de l'arborisation dendritique dans les neurones pyramidaux du cortex (Hayashi et al., 2002). Les protéines Rho ont également une influence considérable sur les épines dendritiques. La surexpression de Rac1 et RhoA dans les

neurones corticaux perturbe la formation des épines (Tashiro et al., 2000). Rac1 favorise la formation des épines tandis que RhoA réduit leur nombre et leur longueur. Les mêmes résultats ont été observés dans les neurones de l'hippocampe et les cellules de Purkinje (Nakayama et al., 2000; Tashiro et al., 2000).

### (c) Protéines d'échafaudage

Alors que ces protéines ont été largement caractérisées pour leurs rôles dans la formation et la régulation des synapses, des données récentes montrent également leur importance dans la régulation de la morphologie des dendrites.

La PSD-95 (post-synaptic density 95), Shank et homer présentent des fonctions de régulateurs du développement dendritique (Charych et al., 2006; Quitsch et al., 2005; Tanaka et al., 2006). L'interaction entre la PSD95 et les protéines snapin permet l'inhibition de la croissance dendritique tandis que son interaction avec les protéines cypin la favorise. Les protéines PSD-95, snapin et cypin forment donc un complexe moléculaire modulant la croissance dendritique (Charych et al., 2006). La protéine Homer, en modulant la concentration de calcium intracellulaire réprime la croissance dendritique des neurones de Purkinje du cervelet (Tanaka et al., 2006).

La protéine Shank quant à elle stimule la croissance dendritique *via* l'activation de la voie dépendante de Rac et par la réorganisation du cytosquelette d'actine (Proepper et al., 2007). Ce rôle de régulateur positif de Shank est médié grâce à son interaction avec d'autres molécules comme la Densin-180. La Densin-180 est une autre protéine de la PSD, qui suite à sa liaison avec la  $\delta$ -caténine induit une diminution de la croissance dendritique (Quitsch et al., 2005). En effet, cette interaction entre la Densin-180 et la  $\delta$ -Caténine est nécessaire pour moduler l'activité des Rho GTPases et de ce fait inhiber le développement dendritique (Martinez et al., 2003). Quand shank est activé, la liaison entre Densin-180 et  $\delta$ -Caténine est inhibée, favorisant ainsi la croissance dendritique. Il s'établit donc entre ces protéines une communication moléculaire qui permet la régulation fine de la croissance dendritique.

Une autre protéine de la PSD, Grip1, est impliquée dans le développement dendritique. Son activation dans les neurones de l'hippocampe induit une arborisation dendritique moins complexe sans aucun effet sur la croissance axonale (Hoogenraad et al., 2005). Grip1 est donc essentiel pour le développement et le maintien de l'arborisation dendritique.

Ces études montrent l'importance nouvelle des protéines d'échafaudage de la PSD dans les mécanismes de développement neuronal.

#### **(d) Facteurs de croissance**

Le BDNF, NT-4/5 (neurotrophin-4/5), NT-3 et NGF provoquent également l'augmentation de la complexité dendritique (Horch et Katz, 2002; McAllister et al., 1995). Cependant, ces facteurs n'exercent pas un rôle sur tous les neurones, leur fonction est dépendante en particulier du type cellulaire. En effet, par exemple, NT-3 stimule la croissance dendritique des neurones de la couche 6 du cortex tandis que son action est moindre voir nul dans les autres couches du cortex (McAllister et al., 1995). La spécificité d'action de ces facteurs est due à un haut degré de régulation qui passe par un système d'endocytose, un système de régulation de l'expression des récepteurs aux neurotrophines et par l'expression de co-activateurs.

#### **(e) Les molécules de guidage**

La Sema3A (sémaphorine 3A) et la Sema4D augmentent la croissance et la complexité de l'arborisation dendritique des neurones hippocampiques *in vitro* (Vodrazka et al., 2009; Schloman et al., 2009).

Dans les neurones ganglionnaires de la rétine (NGRs), Slit, glycoprotéine sécrétée, favorise *in vitro* la ramification des dendrites *via* le récepteur Robo 2 (Hocking et al., 2010). Il a été également montré que Slit1 stimule la croissance dendritique et la ramification des dendrites des neurones corticaux *via* les récepteurs Robo *in vitro* chez le rat (Whitford et al., 2002b) mais également chez la drosophile (Dimitrova et al., 2008).

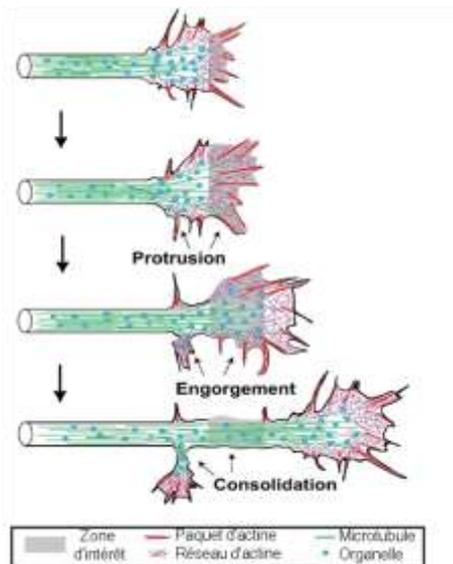
#### **(f) Les molécules d'adhésion cellulaire**

Certains types de molécules d'adhésion sont impliqués dans des mécanismes d'adhésion intercellulaires, comme les protéines Dscam (Down syndrome-related cell adhesion molecule) ou Notch. Le système Notch présente une importance particulière dans la mise en place de l'arborisation dendritique. En effet, par un mécanisme d'activation de la transcription génique, il inhibe l'élongation des dendrites (Sestan et al., 1999) et augmente leur nombre de ramifications (Redmond et al., 2000). Les protéines Dscam sont aussi nécessaires au blocage de la croissance dendritique (Hughes et al., 2007; Matthews et al., 2007).

### **(3) Croissances axonale et dendritique**

Le contrôle de la croissance axonale est de loin plus documentée que celui de la croissance dendritique. Néanmoins, il est possible d'envisager l'existence d'un schéma général de la croissance commun à l'axone et aux dendrites dépendant du remaniement de l'actine-F et des microtubules. L'élongation du cône de croissance permettant la croissance de l'axone ou des dendrites se déroule

en trois étapes : protrusion, engorgement et consolidation (Lee-Hoeflich et al., 2004). 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 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 ainsi jusqu'à l'élongation de l'axone et des dendrites (Figure 17).



**Figure 17: Etapes de l'élongation du cône de croissance.**

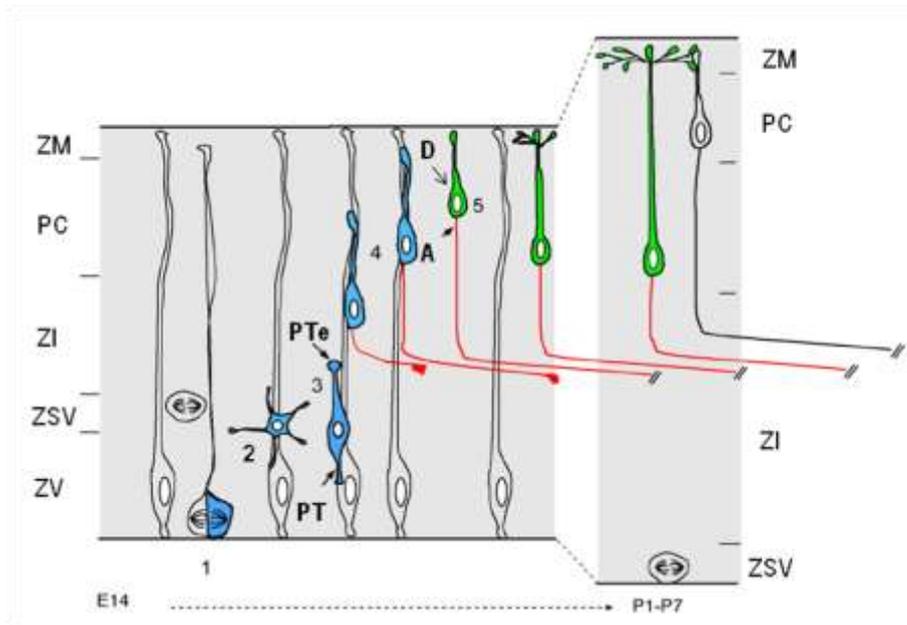
Trois étapes de croissance ont été décrites et nommées : protrusion, engorgement et consolidation. La protrusion est l'extension rapide du cône de croissance, suivie par l'invasion des microtubules, des vésicules membranaires et des organelles qui correspond à l'engorgement. Enfin, la consolidation permet la stabilisation des microtubules et ainsi la formation du dendrite ou de l'axone. Adapté de E.W. Dent et F.B Gertler 2003.

L'activité neuronale joue un rôle crucial dans le développement axonal et dendritique. La dépolarisation ou l'élévation du niveau d'AMPC stimule l'expression du récepteur aux neurotrophines TrkB dans les neurones ganglionnaires de la rétine et dans les neurones des ganglions rachidiens *in vitro* (Meyer-Franke et al., 1998; Goldberg et al., 2002). De ce fait, l'action du BDNF est augmentée et induit une augmentation de la longueur de l'axone. De plus de nombreuses études ont montré que le blocage ou l'atténuation de l'activité neuronale affecte le développement dendritique. En effet, le blocage pharmacologique de cette activité provoque des altérations de la croissance dendritique (Rajan et Cline, 1998). Certains résultats montrent que l'activation de cette activité augmente la complexité de l'arborisation dendritique (Redmond et al., 2002; Vaillant et al., 2002; Wayman et al., 2006). L'importance de l'activité neuronale dans la formation des prolongements neuronaux a également été mise en évidence *in vivo*. La stimulation de l'activité neuronale par une exposition à un environnement riche induit une augmentation de la complexité de l'arborisation dendritique (Holloway, 1966). Il a également été observé que suite à une section de l'axone, une stimulation électrique accélère sa régénération (Geremia et al., 2007).

## 2. Polarisation neuronale *in vivo*

Les premières études de la polarisation neuronale *in vivo* ont été réalisées dans le néocortex de primate en 1972 par Pasko Rakic. C'est par l'utilisation de la méthode de Golgi, basée sur la fixation de particules de chromate d'argent sur la membrane de certains neurones, et le microscope électronique qu'une description de la morphologie de neurones corticaux en migration a été effectuée. Ces analyses ont mis en évidence l'émergence de l'axone à partir du prolongement de traîne (Figure 18) (Rakic, 1972). Ce n'est que 30 ans plus tard, grâce au développement de traceurs rétrogrades de l'axone que les travaux de Rakic ont été confirmés (Schwartz et al., 1991). Depuis, le développement de la vidéomicroscopie confocale sur tissu vivant a permis l'examen plus fin des changements morphologiques des neurones en migration (Hatanaka et Murakami, 2002; Noctor et al., 2004).

Ainsi grâce à l'avancée technologique, les connaissances des différentes étapes de la polarisation neuronale *in vivo* ont récemment progressées. Dans le néocortex, la mise en place de la polarisation neuronale a lieu lors de la migration radiaire (Figure 18). Les neurones sont générés par la division asymétrique des CGR dans la ZV et/ou par la division symétrique des CPI dans la ZSV (étape 1) (chapitre I, A, 1). Après leur dernière division, les neurones établissent une morphologie multipolaire (étape 2) avant d'élaborer une forme unipolaire où le prolongement de tête est attaché à la glie radiaire et initie la migration radiaire (étape 3). Au cours de la migration radiaire, le prolongement de traîne se développe rapidement pour former l'axone tandis que le corps cellulaire des neurones en migration est transloqué dans la plaque corticale (étapes 3-4). Une fois la migration radiaire terminée, le prolongement de tête forme le dendrite primaire lorsque la région cérébrale appropriée est atteinte puis le neurone se détache de la glie radiaire (Figure 18). Le moment où se forment l'axone et les dendrites varie entre les structures cérébrales et les différents types de neurones étudiés. Dans le cervelet, où un mécanisme similaire à celui du néocortex est observé, la croissance du premier dendrite à partir du prolongement de tête est accompagnée de la formation et de la croissance d'autres dendrites primaires.



**Figure 18: Polarisation neuronale *in vivo*.**

L'émergence de l'axone (A) des neurones du néocortex se produit au cours de la migration radiale au sein de la zone intermédiaire à partir du prolongement de traîne (PT). L'émergence du dendrite (D) quant à lui a lieu à la fin de la migration radiale à partir du prolongement de tête (PTe). PL ; plaque corticale, ZI ; zone intermédiaire, ZM ; zone marginale, ZSV ; zone sous-ventriculaire, ZV ; zone ventriculaire. Adapté de A.P. Barnes et F. Polleux 2008.

### a) Similitudes entre la polarisation *in vivo* et *in vitro*

Des caractéristiques communes sont observées au cours de la polarisation neuronale *in vitro* et *in vivo*. Le stade intermédiaire de neurones multipolaires, présentant plusieurs petits neurites de taille équivalente, est observé dans les deux systèmes. De plus, au cours de la polarisation neuronale, les mêmes étapes sont observées, avec en premier lieu l'élongation axonale, suivie de la différenciation dendritique (Craig et Banker, 1994). De même, certaines protéines comme les protéines associées à la PI3K et les protéines GTPases, impliquées dans la polarisation neuronale *in vitro* (Ménager et al., 2004; Shi et al., 2003; Jiang et al., 2005; Yoshimura et al., 2006) le sont également *in vivo* (Whitford et al., 2002a). Cependant, la fonction des autres molécules impliquées dans la polarité neuronale sont basées principalement sur des données *in vitro* et n'ont pas toutes été confirmées *in vivo*.

### b) Différences entre la polarisation *in vitro* et *in vivo*.

Une étude récente a comparé les changements morphologiques des cellules ganglionnaires de la rétine au cours du développement précoce *in vivo* et *in vitro*. Cette étude révèle qu'*in vivo* l'axone émerge des cellules polarisées en absence de neurites immatures alors qu'*in vitro* les neurites sont formés avant que l'axone ne le soit (Zolessi et al., 2006). Ces différences de

morphologies observées *in vivo* et *in vitro* au cours de la polarisation neuronale pourraient être dues à la présence de signaux extracellulaires qui pourraient inhiber la formation des neurites immatures *in vivo*. De plus, des études montrent que le centrosome et l'appareil de Golgi, éléments du MTOC, sont localisés vers le prolongement de tête qui deviendra le dendrite apical dans les neurones corticaux en migration. Cependant ces études *in vivo* sont contredites par les études menées *in vitro* sur des neurones d'hippocampe qui suggèrent que le MTOC est orienté vers le neurite qui deviendra l'axone (de Anda et al., 2005) correspondant au prolongement de traîne *in vivo*. De futures investigations sont à mener pour résoudre ces contradictions.

### **3. Rôle des molécules immunes dans la formation des prolongements neuronaux**

Plusieurs études montrent un rôle des molécules de l'immunité adaptative dans la polarisation neuronale. C'est le cas du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMHI) qui joue un rôle important dans la formation des dendrites et des axones (Zohar et al., 2008). L'application d'anticorps ciblant deux isotypes spécifiques du CMHI de souris induit une augmentation de la croissance neuritique des neurones corticaux *in vitro* (Zohar et al., 2008). De plus, le traitement avec un anticorps bloquant dirigé contre la protéine Ly49, un récepteur du CMHI, induit une diminution de la croissance neuritique. Ces données suggèrent que le CMHI neuronal agirait sur la croissance des neurites en se liant au récepteur Ly49.

L'expression de la sous-unité CD3 $\epsilon$ , molécule signalétique associée au TCR, a été identifiée dans les cellules de Purkinje dans le cervelet de souris (Nakamura et al., 2007). L'utilisation de souris déficientes pour le CD3 $\epsilon$  démontre le rôle de cette sous-unité dans le développement dendritique. En effet, l'absence du CD3 $\epsilon$  réduit la complexité de l'arborisation dendritique (Nakamura et al., 2007).

Une famille de molécules de l'immunité innée, la famille des TLRs est également impliquée dans la polarisation neuronale. En effet, l'activation du TLR8, exprimé abondamment dans le cerveau de souris aux stades embryonnaires (E12 à E21) et post-nataux (P1-P7), inhibe la croissance neuritique (Ma et al., 2006). De plus, l'activation du TLR3 *in vitro* et *in vivo* inhibe la pousse axonale (Cameron et al., 2007). Une étude récente montre que le traitement avec un agoniste du TLR2 stimule la neuritogenèse des neurones ganglionnaires de la rétine *in vitro* (Hauk et al., 2010).

#### ***C. Les synapses***

Suite à la maturation des axones et des dendrites, les neurones établissent des connexions synaptiques. Mon travail de thèse ne s'étant pas focalisé sur cette étape du développement neuronal, la synaptogenèse ne sera donc pas abordée dans cette introduction. En revanche, les

caractéristiques structurelles et fonctionnelles des synapses excitatrices seront plus particulièrement décrites.

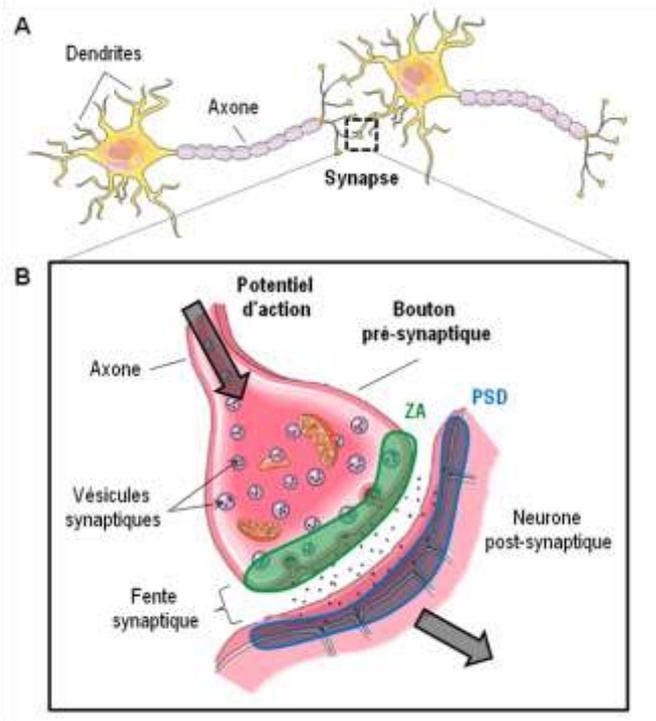
## 1. Structure et fonction des synapses

C'est grâce à la microscopie électronique dans les années 50 que la visualisation des synapses a été permise. Les travaux de George Palade et Keith Porter ont mis en évidence différents types de synapses et leurs composants structuraux. Deux catégories de synapses existent : les synapses électriques et chimiques.

Les synapses chimiques permettent la communication entre deux neurones *via* la sécrétion hautement régulée de signaux chimiques appelés neurotransmetteurs (NT). Contrairement aux synapses électriques, les synapses chimiques sont des jonctions polarisées qui transmettent l'information dans une seule direction. Bien qu'il y ait une grande variété moléculaire et morphologique de synapses chimiques, elles partagent les mêmes caractéristiques fonctionnelles et structurelles. Ce sont des jonctions cellulaires asymétriques formées entre les neurones et leurs cibles. Elles sont formées de deux domaines spécialisés, l'un pré-synaptique et l'autre post-synaptique (Gray, 1963). Le domaine pré-synaptique, contenant des vésicules synaptiques remplies de NT, établit des contacts avec une ou plusieurs cellules post-synaptiques.

Dans le cas d'une synapse excitatrice glutamatergique, la dépolarisation induite par l'activité neuronale (potentiel d'action) entraîne une entrée massive de calcium permettant la migration des vésicules synaptiques du bouton axonal. Ces vésicules fusionnent à la membrane plasmique et relarguent le glutamate dans la fente synaptique (espace étroit entre les cellules pré- et post-synaptiques). Une fois le glutamate libéré, les vésicules synaptiques sont endocytées *via* les clathrines, régénérées puis rechargées en NT (Brodin et al., 1997). Le glutamate se fixe à ses récepteurs post-synaptiques (AMPA, NMDA et mGluR) puis est recapturé par les transporteurs (neuronaux et gliaux) afin d'interrompre la transmission synaptique. Les récepteurs de type AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) s'ouvrent rapidement sous l'action du glutamate et dépolarisent la membrane grâce à une entrée d'ions  $\text{Na}^{2+}$  et la sortie d'ions  $\text{K}^+$ . En parallèle, les récepteurs de type NMDA (N-methyl d-aspartate) et les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage s'ouvrent et permettent l'entrée massive de calcium. Les canaux  $\text{K}^+$  dépendants du voltage s'activent également et favorisent la sortie des ions  $\text{K}^+$ . Ces mouvements d'ions de part et d'autre de la membrane permettent la dépolarisation de la membrane et l'activation de nombreuses voies de signalisations post-synaptiques. La fusion de ces vésicules ne se produit pas aléatoirement au niveau de la membrane plasmique mais se déroule au niveau d'un domaine spécialisé appelé zone active

(ZA). Ces zones sont caractérisées par la présence d'une densité importante de protéines qui sont intégrées dans la matrice extracellulaire (Phillips et al., 2001). En apposition directe avec cette ZA, se trouve un troisième domaine, appelé densité post-synaptique (PSD), situé dans la région post-synaptique qui reçoit les informations transmises par le neurone pré-synaptique. La PSD, permet le regroupement des récepteurs aux NT, des canaux dépendants du voltage et de diverses molécules signalétiques (Figure 19) (Garner et al., 2002; Sheng, 2001).



**Figure 19: Représentation schématique de la structure d'une synapse chimique.**

**(A)** Les neurones sont connectés les uns avec les autres grâce à une structure appelée synapse. L'encadré est agrandi en B. **(B)** Les synapses sont composées de différents domaines spécifiques comme le bouton pré-synaptique qui contient les vésicules remplies de neurotransmetteurs (NT), la zone active (ZA, vert) et la zone de la densité post-synaptique (PSD, bleu). Quand l'activité électrique, le potentiel d'action (flèche noire), arrive au niveau de l'extrémité pré-synaptique, les vésicules fusionnent dans la membrane plasmique de la ZA libérant ainsi les NT dans la fente synaptique. Une fois réceptionnés au niveau de la PSD, les signaux chimiques sont reconvertis en signaux électriques.

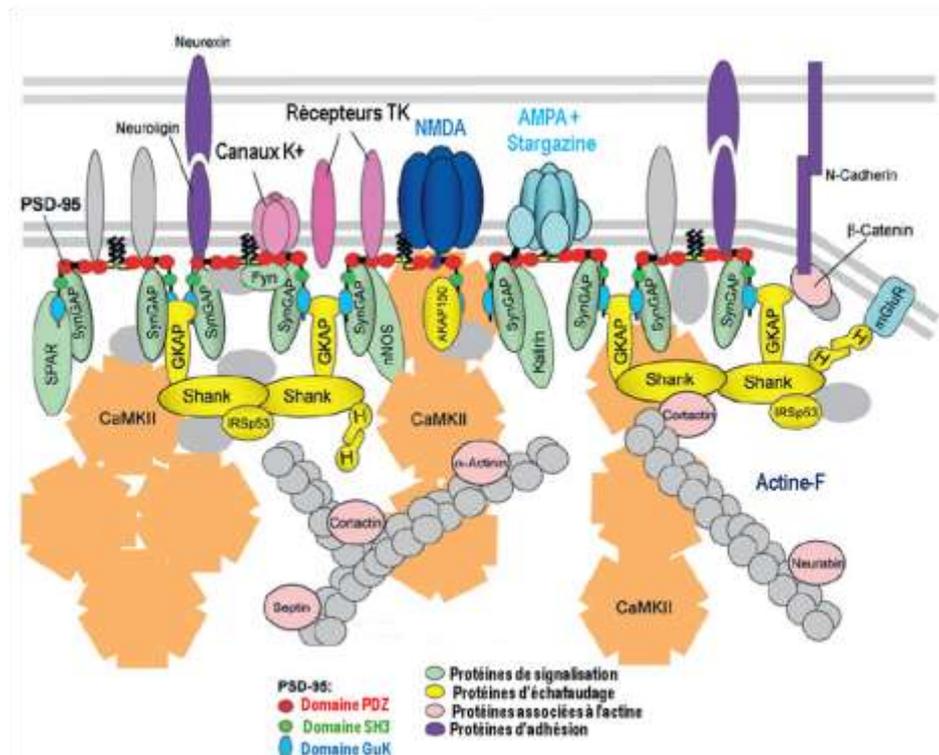
Bien que ces caractéristiques soient partagées par toutes les synapses du SNC, des variations dans la taille et l'organisation des ZA pré-synaptiques mais aussi dans l'épaisseur de la PSD ont été documentées. Elles ont été corrélées avec (1) le type de synapses comme le type de NT libéré par un bouton, (2) la fonction synaptique par exemple si la synapse est inhibitrice ou excitatrice et (3) l'efficacité synaptique.

## 2. La synapse excitatrice

Les synapses chimiques sont capables de stocker les NT dans les vésicules pré-synaptiques. Suivant le type de NT stockés et le type de récepteurs post-synaptiques correspondant, les synapses peuvent être excitatrices ou inhibitrices. Dans le SNC des mammifères, le NT excitateur principal est le glutamate.

La PSD au niveau des synapses excitatrices est plus épaisse et plus complexe que celle des synapses inhibitrices et porte des récepteurs au glutamate (NMDA, AMPA et mGluR), des protéines

d'échafaudage et d'adhésion cellulaires et des protéines kinases et phosphatases (Figure 20) (Sheng et Hoogenraad, 2007). Des études récentes ont analysé l'organisation de la PSD et ont identifié la présence de microdomaines dans cette structure. Les récepteurs de type NMDA sont distribués sur toute la membrane de la PSD tandis que les récepteurs de type AMPA sont localisés dans des petits domaines subsynaptiques dans la PSD (Masugi-Tokita et al., 2007). Parmi les différentes molécules d'adhésion cellulaires synaptiques, les cadhérines sont observées dans les régions périphériques de la PSD où elles apportent, en plus de leur rôle dans la diffusion, des sites de liaison pour les récepteurs (Saglietti et al., 2007).



**Figure 20: Structure d'une synapse excitatrice.**

*H, Homer ; Récepteurs TK, récepteurs tyrosine kinase. Adapté de M. Sheng et C.C Hoogenraad 2007.*

### a) Les récepteurs au glutamate

La grande diversité fonctionnelle des récepteurs au glutamate et leur important niveau d'expression dans l'ensemble des structures du SNC les placent au centre de nombreux processus aussi bien physiologiques que pathologiques. Le glutamate active deux grands groupes de récepteurs : métabotropiques (mGluRs) ou ionotropiques (iGluRs) (Hollmann et Heinemann, 1994; Nakanishi et al., 1994). Il existe trois types de récepteurs ionotropiques (AMPA, NMDA et Kainate) et une famille de récepteurs métabotropiques.

## **(1) Les récepteurs métabotropiques (mGluR)**

Les mGluRs font partie de la superfamille des GPCR (G protein coupled receptor) formés de sept domaines transmembranaires. A ce jour, huit sous-types de récepteurs métabotropiques ont été clonés et caractérisés (mGluR1-8) (Pin et Duvoisin, 1995). Ils sont répertoriés en 3 groupes, en fonction de leur homologie de séquence, des voies de signalisation qu'ils activent et de leur profil pharmacologique (Nakanishi, 1992). Le groupe I contient les mGluR1 et 5, le groupe II mGluR2 et 3 et le groupe III regroupe les mGluR 4, 6, 7 et 8 (Davies et al., 1995; Schoepp et al., 1999; Tamaru et al., 2001). L'activation des mGluRs, leur distribution et la diversité d'actions de leurs seconds messagers, leur confèrent un rôle dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques. Ils participent ainsi par exemple à la modulation pré-synaptique de la libération des NT (groupe II et III) et dans la plasticité synaptique dépendante de l'activation des récepteurs ionotropiques au glutamate de type AMPA ou NMDA (groupe I) (Anwyl, 1999; Farazifard et Wu, 2010; Niswender et Conn, 2010; Harney et al., 2006).

## **(2) Les récepteurs ionotropiques (iGluR)**

Les iGluRs quant à eux sont des récepteurs canaux perméables aux cations qui se différencient par leurs propriétés cinétiques, leur perméabilité au calcium ainsi que par leur modulation par des composés endogènes autre que le glutamate. Ils sont classifiés selon leur agoniste exogène le plus sélectif : i) le récepteur AMPA ; ii) le récepteur kaïnate ; iii) le récepteur NMDA. Seuls les récepteurs AMPA et NMDA seront présentés dans ce chapitre.

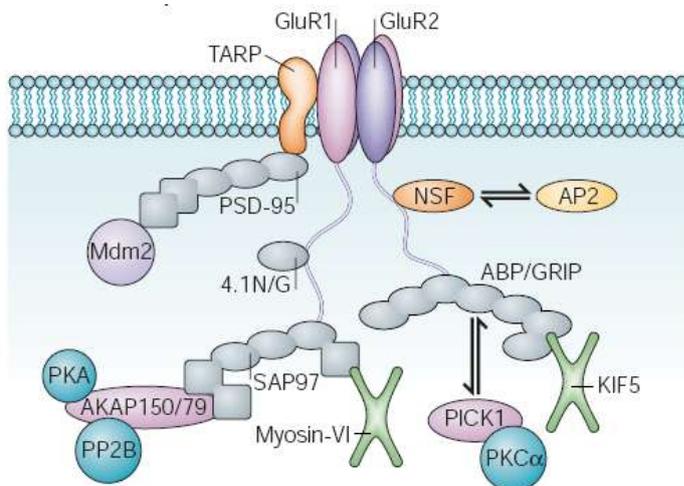
### **(a) Récepteurs de type AMPA**

Les récepteurs AMPA répondent immédiatement à la libération pré-synaptique du glutamate et sont essentiellement perméables aux ions sodium et potassium, permettant la transmission synaptique excitatrice rapide (Rosenmund et al., 1998). Ces récepteurs sont composés d'une combinaison de sous-unités hétérodimériques (GluR1-4) (Hollmann et Heinemann, 1994). La plupart des récepteurs AMPA dans l'hippocampe et le cortex adulte sont composés des sous-unités GluR1/GluR2 et GluR2/GluR3 (Craig et al., 1993). Comme le niveau d'expression de la sous-unité GluR3 est faible, 70% des sous-unités GluR2 s'associent aux sous-unités GluR1 (Wenthold et al., 1996) même si la sous-unité GluR4 est exprimée dans certaines régions matures du cerveau (Zhu et al., 2000).

La sous-unité GluR2 est critique pour la fonction des récepteurs AMPA. En effet, les récepteurs contenant cette sous-unité sont imperméables au  $Ca^{2+}$  alors qu'ils sont perméables en l'absence de celle-ci (Bassani et al., 2009). Le résidu arginine porté à la position 607 dans la boucle du

pore du récepteur AMPA empêche l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette particularité est due à une édition de l'ARNm qui provoque le remplacement de la glutamine (présente dans les autres sous-unités) par l'arginine (Seeburg et Hartner, 2003). L'édition est essentielle pour la fonction cérébrale car des défauts de ce processus induisent la mort prématurée et des dysfonctions neurologiques (Egger et al., 1999; Feldmeyer et al., 1999).

Ces dernières années, plusieurs protéines partenaires des récepteurs AMPA ont été identifiées. La majorité sont cytosoliques et se lient à la queue C-terminale de la sous-unité GluR2 (Figure 21) (Bassani et al., 2009; Garner et al., 2000; Sheng, 2001).



**Figure 21: Représentation schématique du récepteur AMPA et des protéines qui régulent son accumulation au niveau des synapses.**

La sous-unité GluR1 lie la protéine SAP97. La région C-terminale de la sous-unité GluR2 lie directement les protéines NSF ou AP2, ABP/GRIPS ou PICK1. La N-Cadhrin, les protéines TARP et PSD-95 régulent l'accumulation et la rétention des récepteurs AMPA au niveau des synapses. Adapté de G.L Collingridge 2004.

Les protéines ABP (AMPA receptor binding protein), GRIP (glutamate receptor-interacting protein) et PICK1 (protein interacting with C-kinase-1) contiennent des domaines PDZ (PSD-95/Discs-large/Zona Occludens-1) qui interagissent avec la sous-unité GluR2 (Bassani et al., 2009). L'interaction de la sous-unité GluR2 avec les protéines GRIP/ABP favorise l'accumulation des récepteurs AMPA à la synapse. GRIP, en se liant à la protéine KIF2, permet le transport de la sous-unité GluR2 dans les dendrites. De plus, PICK1 semble contrôler le transport des récepteurs AMPA et l'endocytose de la sous-unité GluR2 (Perez et al., 2001). La protéine NSF, une protéine ATPase connue pour son rôle important dans la fusion membranaire, se lie à la sous-unité GluR2 (Nishimune et al., 1998; Osten et al., 1998). Des études montrent que cette interaction est nécessaire pour le transport et le maintien de l'expression des récepteurs AMPA à la synapse (Lee et al., 2002; Nishimune et al., 1998). Cependant, leur rôle n'est pas clairement défini.

La stargazine, protéine transmembranaire contenant des domaines PDZ, s'associe aux protéines SAP102 et PSD-95 et interagit directement avec les récepteurs AMPA (Chen et al., 2000; Dakoji et al., 2003). La mutation de la stargazine provoque des épilepsies et une ataxie cérébelleuse

induites par l'absence de récepteurs AMPA à la surface des cellules granulaires du cervelet (Chen et al., 2000). La stargazine semble avoir un rôle dans le transport et l'agrégation des récepteurs AMPA. La stargazine appartient à la famille des TARPs (transmembrane AMPA regulatory proteins) (Tomita et al., 2003). Les TARPs sont associées rapidement aux récepteurs AMPA au cours de leur synthèse et permettent de contrôler leur assemblage, leur adressage à la membrane et leurs propriétés biophysiques (Nicoll et al., 2006). Elles permettent de stabiliser les complexes et donc de faciliter leur transport dans le réticulum endoplasmique (Tomita et al., 2003; Vandenberghe et al., 2005). La localisation synaptique des récepteurs AMPA dépend de l'interaction de la stargazine avec la PSD-95 (Ziff, 2007). La stargazine peut également se lier à la protéine PSD-93 (Dakoji et al., 2003).

L'interaction de la sous-unité GluR1 avec SAP97 est nécessaire pour la translocation de la sous-unité GluR1 vers la synapse lors de la potentialisation à long terme (LTP) induite par la CaMKII et le calcium (Leonard et al., 1998; Hayashi et al., 2000).

En résumé, les récepteurs AMPA sont concentrés à la synapse où ils permettent la transduction rapide des signaux excitateurs. La localisation de ces récepteurs est fortement dépendante des protéines comme les TARPs. Le transport des récepteurs est régulé par de nombreuses protéines incluant les ABP/GRIP, PICK1 et NSF. Ces récepteurs sont donc au centre de la physiologie et de la plasticité synaptique, même s'ils ne la contrôlent pas directement.

### **(b) Les récepteurs de type NMDA**

Les récepteurs NMDA représentent des récepteurs clés de la transmission glutamatergique synaptique. Ils sont perméables aux ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  et sont responsables de la phase tardive du potentiel post-synaptique excitateur (Lynch et al., 1983). Ils permettent d'initier la plupart des phénomènes de la plasticité synaptique que sont la LTP et la dépression à long terme (LTD) (Malenka et Bear, 2004). Ces récepteurs sont composés d'une combinaison de sous-unités hétérodimériques (NR1, NR2A-D, NR3A-B) et sont activés uniquement après la dépolarisation partielle de la membrane post-synaptique induite par les récepteurs AMPA et par la liaison du glutamate à la sous-unité NR2 et de la glycine à la sous-unité NR1. La dépolarisation est nécessaire pour éliminer le  $\text{Mg}^{2+}$  qui obture le canal du récepteur et permet l'entrée massive de calcium qui déclenche de nombreuses cascades de signalisations intracellulaires. L'action concertée des récepteurs AMPA et NMDA est considérée comme un mécanisme majeur dans l'induction de la plasticité synaptique (Malenka et Nicoll, 1993).

Dans la littérature, il est proposé que les récepteurs NMDA fonctionnels sont constitués de deux sous-unités NR1 et deux sous-unités NR2 c'est-à-dire dimères de dimères (Kutsuwada et al., 1992; Ulbrich et Isacoff, 2007). Les récepteurs NMDA sont bloqués par des ions  $\text{Mg}^{2+}$  et leur perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  dépend d'un résidu asparagine situé dans le pore de la même façon que

l'arginine pour les récepteurs AMPA. L'assemblage de la sous-unité NR3 avec les autres sous-unités n'est pas complètement compris bien qu'il ait été montré que cette sous-unité joue un rôle important dans le contrôle de la signalisation synaptique des récepteurs NMDA au cours du développement (Pérez-Otaño et Ehlers, 2005). Les récepteurs contenant la sous-unité NR3 ont une conductance, une perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  et une sensibilité au  $\text{Mg}^{2+}$  diminuées (Nakanishi et al., 2009; Tong et al., 2008). L'entrée massive de calcium étant une étape cruciale de la neurotoxicité, cette sous-unité est révélée comme neuroprotectrice *in vivo* et *in vitro* (Nakanishi et al., 2009).

La combinaison en sous-unités de ces récepteurs détermine leurs propriétés fonctionnelles (Cull-Candy et Leszkiewicz, 2004). En effet, les récepteurs contenant les sous-unités NR2A et NR2B ont des propriétés cinétiques, des localisations et des partenaires protéiques différents. Les récepteurs composés des sous-unités NR1/NR2A ont une probabilité d'ouverture plus grande et une désactivation plus rapide mais sont moins perméables au calcium que ceux constitués des sous-unités NR1/NR2B (Chen et al., 1999; Erreger et al., 2005; Sobczyk et al., 2005). Les récepteurs NMDA sont exprimés dans des sites extrasynaptiques et synaptiques. Il a été proposé que les récepteurs composés de la sous-unité NR2A sont principalement localisés au niveau des synapses tandis que ceux contenant la sous-unité NR2B sont situés à la périphérie de la synapse et dans les sites extrasynaptiques (Dalby et Mody, 2003). Ces résultats sont controversés par une étude qui démontre que ces deux sous-unités existent dans les sites extrasynaptiques (Mohrmann et al., 2000).

Tous ces récepteurs possèdent dans leur domaine C-terminal des domaines PDZ nécessaires pour l'organisation structurale de la densité post-synaptique *via* leur interaction avec des protéines d'échafaudage. Les protéines interagissant avec les sous-unités des récepteurs NMDA sont importantes car elles déterminent la direction de la plasticité synaptique. La sous-unité NR2B se lie directement à la protéine Ras-GRF1 (Ras guanine nucleotide-releasing factor 1) et à la protéine RasGAP *via* la protéine SAP102 (Krapivinsky et al., 2003; Kim et al., 1998). Ces associations affectent l'induction de la plasticité (Zhu et al., 2002). La CaMKII (calmodulin kinase 2) lie avec une forte affinité la sous-unité NR2B et avec une plus faible affinité NR2A (Strack et al., 2000; Leonard et al., 1999; Gardoni et al., 1999). Le calcium entrant s'associe à la calmoduline qui active la CaMKII et se lie à la sous-unité NR2B permettant l'induction de la LTP (Barria et Malinow, 2005). Il a été également montré que la sous-unité NR2A s'associe préférentiellement avec la protéine PSD-95 et NR2B avec la protéine SAP102 ce qui expliquerait la localisation différente de ces sous-unités (Townsend et al., 2003; Sans et al., 2000). Mais des études biochimiques révèlent que ces deux sous-unités interagissent aussi bien avec la protéine PSD-95 qu'avec la protéine SAP102 (Al-Hallaq et al., 2007).

Le transport des récepteurs NMDA est régulé par la sous-unité NR1 et l'expression et le maintien à la surface de la cellule sont facilités par l'interaction des sous-unités NR2 avec la protéine PSD-95 (Standley et al., 2000; Roche et al., 2001; Li et al., 2003).

## **b) Les protéines d'échafaudage**

Les protéines d'échafaudage sont composées de multiples domaines d'interactions protéines-protéines, qui leur permettent d'interagir avec de nombreux partenaires (en général protéiques mais aussi lipidiques). Elles peuvent définir la spécificité des voies de signalisation en compartimentant certaines molécules de signalisation, ce qui facilite et oriente la transduction du signal. Elles permettent l'adressage et l'ancrage de protéines qui leur sont associées. Ces deux fonctions favorisent la formation de microdomaines, déterminants pour l'initiation de certaines fonctions neuronales. Plusieurs familles de protéines d'échafaudage sont associées à la PSD incluant les protéines MAGUKs, Shank, GKAP (guanylate kinase associated protein/SAP90/PSD-95-associated proteins) et Homer.

### **(1) Les protéines MAGUKs**

L'une des premières protéines de la famille des MAGUKs (membrane associated guanylate kinase) identifiée est la PSD-95 (ou SAP90). Par la suite les protéines SAP97, SAP102 et la chapsyn/PSD-93 ont été mises en évidence. Ces protéines contiennent trois domaines PDZ dans leur domaine N-terminal suivis d'un domaine SH3 et d'un domaine GK (guanylate kinase-like). Ces protéines à l'exception de la protéine SAP97 portent deux résidus cystéines qui, une fois palmitoylés, permettent leur ancrage à la membrane. Leurs domaines PDZ interagissent avec le domaine C-terminal de protéines transmembranaires.

La protéine PSD-95 est distribuée dans toute la PSD, représentant ainsi la protéine centrale au niveau des synapses excitatrices. En revanche la protéine SAP97, jouant un rôle important dans le transport des récepteurs AMPA, est localisée aux bords de la PSD (DeGiorgis et al., 2006). La protéine PSD-95 interagit également avec des protéines de signalisation comme les récepteurs tyrosines kinases, nNOS, des GAP ou des GEF. Les MAGUKs semblent jouer des rôles au sein de la PSD, favorisant à la fois son organisation et son fonctionnement. Elles sont nécessaires pour la formation de la synapse grâce à l'ancrage, le regroupement des récepteurs au glutamate de type AMPA et NMDA et des protéines de la signalisation post-synaptique. Récemment, il a été montré que la surexpression de la protéine SAP97 au cours du développement précoce favorise le transport des récepteurs AMPA et NMDA à la synapse et restaure les altérations de la transmission glutamatergique enregistrées chez les souris déficientes pour les protéines PSD-93/PSD-95. Cependant, la délétion génétique de la protéine SAP97 n'induit pas d'altérations de la transmission synaptique supposant ainsi que d'autres protéines MAGUKs compensent la perte de la protéine SAP97 (Howard et al., 2010).

## **(2) Les protéines Shank**

Les protéines Shank sont composées d'un domaine de répétitions ankyrine, un domaine SH3, un domaine PDZ, un domaine riche en proline et un domaine SAM (sterile alpha helice). Le domaine contenant les répétitions ankyrine interagit préférentiellement avec une protéine membranaire du cytosquelette, l'  $\alpha$ -fodrin, qui se lie à l'actine-F. Le domaine PDZ peut interagir avec la protéine GKAP ou le récepteurs de type 2 de la somatostatine. La région riche en proline contient un site de liaison à la protéine Homer et à la cortactin (régulateur des filaments d'actine). Les protéines Shank sont fortement exprimées au niveau de la PSD et s'associent à la fois à la membrane et au cytosquelette. Elles interagissent également avec les récepteurs de type NMDA et les récepteurs métabotropiques *via* les protéines GKAP et Homer. Elles permettent ainsi de relier les différents types de récepteurs au glutamate avec le cytosquelette. Une étude récente montre que l'accumulation de la protéine Shank par l'intermédiaire d'une de ses protéines partenaires SPIN90 favorise la maturation et l'élargissement des épines dendritiques (Kim et al., 2009; Hung et al., 2008). De plus les souris déficientes pour la protéine Shank ont des altérations de la transmission synaptique induites par la réduction de la taille des épines dendritiques et la diminution de l'épaisseur et de la taille de la PSD (Hung et al., 2008). Ces données supposent donc un rôle majeur des protéines Shank dans la régulation de la structure et de la fonction des synapses.

## **(3) Les protéines Homer**

Les protéines Homer sont composées d'un domaine EVH1 (N-terminal Ena/VASP Homology 1) qui peut se lier aux récepteurs glutamatergiques métabotropiques du groupe 1 et d'un domaine coiled-coil permettant leur oligomérisation. Les protéines Homer interagissent avec les protéines Shank et font un lien entre les protéines de signalisation et les récepteurs métabotropiques présents aux épines dendritiques. Sa liaison avec la protéine Shank régule le transport et l'agrégation des récepteurs glutamatergiques (Usui et al., 2003), le cytosquelette d'actine (Lu et al., 2007) et le remodelage des épines dendritiques (Sala et al., 2001). Ces deux protéines coopèrent afin d'induire la maturation des épines dendritiques et des synapses (Sala et al., 2001). La surexpression de la protéine Homer diminue la taille et la densité des épines dendritiques mais également réduit l'expression des protéines PSD-95, Shank, GluR2 et NR1 (Sala et al., 2003).

En conclusion, les protéines d'échafaudage possèdent de multiples partenaires, permettent de focaliser les protéines de signalisation à la synapse et de faire le lien entre les différents partenaires. Bien qu'elles n'aient pas d'action directe sur la signalisation post-synaptique, elles la régulent finement et rapidement.

### **c) Les protéines kinases et phosphatases**

De nombreuses protéines kinases sont impliquées dans l'induction de la LTP dépendante des récepteurs NMDA. Elles incluent les protéines PKC (protein kinase C), CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependant protein kinase), PKA (protein kinase A), MAPK (p42/44 mitogen-activated protein kinase) et la PI3K. A l'inverse, les protéines phosphatases comme la PP1 (protein phosphatase 1) et la PP2B (protein phosphatase 2B) sont impliquées dans l'induction de la LTD dépendante des récepteurs NMDA (Collingridge et al., 2004). Elles semblent également importantes dans le transport des récepteurs de type AMPA et NMDA. Par exemple l'expression des récepteurs NMDA est régulée par la phosphorylation de la PKC (Lan et al., 2001). Les protéines kinases et phosphatases sont primordiales pour la régulation de l'activité synaptique et la quantité de récepteurs présents à la synapse.

#### **(1) La protéine CaMKII**

La CaMKII, kinase sérine/thréonine, est l'une des protéines les plus abondantes de la PSD (Sheng et Hoogenraad, 2007). Il existe 4 gènes qui codent pour les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . Seul l'ARNm de l'isoforme  $\beta$  subit un épissage alternatif (Takeuchi et Fujisawa, 1998). Elle est ubiquitaire (isoformes  $\gamma$  et  $\delta$ ) et est fortement exprimée dans le SNC (isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ ). En effet, elle peut représenter jusqu'à 2% des protéines totales de l'hippocampe (Erondu et Kennedy, 1985). Elle est composée d'un domaine catalytique, d'un domaine central contenant un domaine d'autorégulation et d'un motif liant la Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline (Ca<sup>2+</sup>/CaM), et d'un domaine d'association (Soderling, 1996). Cette holoenzyme est composée de 12 sous-unités agencées en 2 hexamères qui forment des anneaux. La CaMKII est dans un état inactif en absence du complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM, le domaine d'autorégulation interagissant avec le domaine catalytique. Suite à la fixation du complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM, la kinase change de conformation, s'active et s'autophosphoryle au niveau de la thréonine 286 (Miller et Kennedy, 1986). Cette phosphorylation diminue la dépendance vis-à-vis de la CaM et permet à la kinase de rester active même après dissociation du complexe. Dans le SNC, la CaMKII  $\beta$  est associée au cytosquelette. Dans les neurones de l'hippocampe, l'entrée de calcium par les récepteurs NMDA et les canaux calciques dépendants du voltage libère la kinase du cytosquelette et induit sa translocation au niveau de la PSD (Soderling et al., 2001; Shen et Meyer, 1999a). Ainsi la kinase est plus proche des flux calciques et de ses substrats potentiels. En effet, elle phosphoryle un grand nombre de substrats impliqués dans le métabolisme, l'établissement du potentiel de membrane (canaux calciques, potassiques, chlores), dans la synthèse et la libération des NT, dans l'organisation du cytosquelette, l'homéostasie cellulaire ou la LTP. Des études révèlent que cette protéine phosphoryle la sous-unité GluR1 au niveau de la sérine 831 et potentialise les courants

unitaires des récepteurs AMPA (Derkach et al., 1999; Soderling et Derkach, 2000) et ainsi participe aux mécanismes de potentialisation dans l'hippocampe (Barria et al., 1997).

La CaMKII est une molécule centrale pour l'induction de la LTP (Lisman et al., 2002). En effet, dans l'hippocampe l'induction de la LTP dépendante des récepteurs NMDA provoque l'autophosphorylation de la CaMKII et sa translocation rapide au niveau des synapses (Fukunaga et al., 1995; Hudmon et al., 2005; Shen et Meyer, 1999a). Le maintien de son activité nécessite l'inhibition de la PP1 par la PKA. Il a été montré que l'activation de la CaMKII bloque la diffusion des récepteurs AMPA au niveau des sites synaptiques par la phosphorylation de la Stargazin et sa liaison avec la protéine PSD-95 (Opazo et al., 2010). *In vitro*, sous des conditions en faible concentration de calcium, la protéine CaMKII phosphorylée au niveau de la thréonine 286 devient autosphosphorylée au niveau des thréonines 305 et 306 favorisant ainsi l'induction de la LTD (Lou et Schulman, 1989; Zhang et al., 2005). De plus l'activité de la CaMKII semble nécessaire à l'élargissement des épines dendritiques au cours de la LTP (Matsuzaki et al., 2004). Une étude récente montre que l'activation indépendante des récepteurs NMDA de la protéine CaMKII par phosphorylation de la thréonine 286 induit l'augmentation de la taille et la densité des épines dendritiques (Pi et al., 2010a). Son activité catalytique n'est pas nécessaire à la formation et l'élargissement des épines dendritiques (Pi et al., 2010a). Ces données indiquent que l'état de phosphorylation de cette kinase régule les processus de la LTP, la LTD et la structure des épines dendritiques (Pi et al., 2010b, 2010a).

## **(2) Les protéines kinase PKA et PKC**

La PKA est l'une des kinases les mieux caractérisées. Sous forme inactive, la sous-unité catalytique est associée à la sous-unité régulatrice. Suite à la liaison de l'AMPc sur la sous-unité régulatrice, la PKA est activée (Beebe, 1994). Cette protéine module la perméabilité au calcium des récepteurs de type NMDA et régule la fonction des récepteurs AMPA par la phosphorylation de la sous-unité GluR1 au niveau de la sérine 845 (Roche et al., 1996; Skeberdis et al., 2006). Le blocage de cette kinase diminue la LTP (Otmakhova et al., 2000).

La PKC est activée par l'action synergique du calcium et du DAG (Diacyl glycérol), issu du clivage du PIP2 par la phospholipase C (PLC). Les mGluR du groupe I favorisent la libération de calcium et l'activation de la PLC stimulant ainsi la PKC. Suite à son activation, cette protéine kinase est transloquée à la membrane et phosphoryle les sous-unités GluR1, GluR2 et les récepteurs NMDA. La phosphorylation de la sérine 880 de la sous-unité GluR2 est critique pour l'induction de la LTD dans l'hippocampe (Kim et al., 2001; Chung et al., 2000). Une étude montre que la PKC favorise l'insertion des récepteurs AMPA à la synapse chez le poisson-zèbre (Patten et Ali, 2009) et le transport des récepteurs NMDA à la synapse (Lan et al., 2001; Lin et al., 2006). L'inhibition

pharmacologique de la PKC montre que cette protéine joue un rôle dans la phase d'acquisition et la phase précoce de consolidation de la LTP (Jerusalinsky et al., 1994; Serrano et al., 1995).

### **(3) Les protéines phosphatases PP1 et PP2B (calcineurine)**

Les protéines PP1 et la PP2B sont des phosphatases sérine/thréonine. La protéine PP1 est inhibée quand la LTP est induite (Brown et al., 2000). De plus, l'induction de la LTD dépendante des récepteurs NMDA active la protéine PP1 (Thiels et al., 1998, 2000). La protéine PP2B est une protéine dimérique composée d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. Celle-ci se lie au complexe  $Ca^{2+}$ /Calmoduline induisant l'activation de l'enzyme. Ainsi la déphosphorylation des protéines cibles de la PP2B est dépendante du calcium.

## **3. Molécules du SI impliquées dans la fonction et l'homéostasie des synapses**

En plus de son rôle dans la formation des prolongements neuronaux, les molécules du CMHI sont aussi impliquées dans les fonctions synaptiques. Des études récentes montrent que le CMHI est enrichi dans les fractions synaptiques d'homogénats de cerveaux de souris et est préférentiellement associé aux synapses excitatrices chez l'adulte (Goddard et al., 2007; McConnell et al., 2009). Cependant, dans le cerveau de souris à 7 jours post-natal, le CMHI est exprimé aussi bien dans les synapses excitatrices qu'inhibitrices (Datwani et al., 2009). Dans le SI, la plupart des molécules du CMHI sont exprimées à la surface des cellules si elles sont associées à la  $\beta_2$ -microglobuline ( $\beta_2$ -m) et sont chargées avec un peptide grâce au système TAP (transporter antigenic peptid) (Krangel et al., 1979). Ainsi, des souris déficientes pour la  $\beta_2$ -m et TAP expriment un CMHI non fonctionnel et peuvent donc être considérées, bien que de façon indirecte, comme déficientes pour le CMHI. Des études électrophysiologiques conduites sur des tranches d'hippocampe de ces souris montrent une augmentation de la transmission synaptique excitatrice et du nombre de densités post-synaptiques (Goddard et al., 2007). De plus, une étude récente montre l'implication du CMHI dans la transmission synaptique excitatrice dans les fibres moussues de l'hippocampe chez le singe (Ribic et al., 2010). L'implication du CMHI dans des fonctions synaptiques a par la suite été montré de façon directe, en utilisant une souche de souris déficientes pour les deux isotypes H2-K et H2-D. L'analyse des tranches de cervelet de ces souris montre un seuil d'induction de la LTP plus faible que les souris sauvages. Un récepteur impliqué dans la fonction synaptique du CMHI a été identifié. Il s'agit du récepteur PirB (paired immunoglobulin-like receptor B) exprimé par les neurones du cortex cérébral, du bulbe

olfactif et du cervelet (Takai, 2005; Syken et al., 2006). Le CMHI semble donc intervenir sur la morphologie des synapses et sur la régulation de la plasticité synaptique.

Plusieurs études montrent également un rôle du CMHI dans les processus d'élimination synaptique. Il a été démontré que le raffinement développemental dans le NGL des axones provenant de la rétine est perturbé chez les souris déficientes pour les protéines TAP et  $\beta_2m$ . Les connexions inappropriées qui sont normalement éliminées sont persistantes chez ces souris (Huh et al., 2000). Ainsi, dans le cerveau en développement, le CMHI semble nécessaire à l'élimination des projections inappropriées. Dans un modèle d'axotomie des nerfs périphériques, les souris déficientes pour la  $\beta_2m$  et TAP1 présentent une élimination synaptique plus importante au niveau de la moelle épinière par rapport aux souris sauvages (Oliveira et al., 2004; Thams et al., 2008). De plus, cette élimination synaptique exacerbée est majoritairement observée pour les synapses de types inhibitrices. Le CMHI semble donc être nécessaire pour la maintenance des afférences inhibitrices. Outre son expression au niveau synaptique, le CMHI est également exprimé par les cellules microgliales activées (Streit et al., 1989b, 1989a). L'élimination synaptique peut donc faire intervenir aussi bien le CMHI neuronal que celui présent sur la microglie. De manière intéressante, les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$ , un des composants du complexe protéique du TCR, présentent un phénotype similaire aux souris déficientes pour le CMHI (Huh et al., 2000). La protéine CD3 $\zeta$  étant exprimée dans le NGL au cours du développement et dans l'hippocampe adulte, un lien fonctionnel entre le CMHI et le CD3 $\zeta$  dans le cerveau a donc été proposé.

De manière intéressante, il a été montré que le CMHI est associé à la molécule du complément C1q dans le NGL (Datwani et al., 2009). Or certaines données révèlent que les molécules de l'immunité innée C1q et C3, molécules du complément, ont un rôle essentiel dans l'élimination synaptique *via* la voie classique du complément (Stevens et al., 2007a). En effet, les souris déficientes pour le gène C1q ou C3 présentent un défaut majeur de ségrégation des projections rétino-géniculées dans le NGL. Chez ces souris, le nombre d'afférences (synapses) dans le NGL est augmenté par rapport aux souris sauvages (Stevens et al., 2007b). L'altération de la ségrégation des projections rétino-géniculées observées chez les souris déficientes pour les molécules CMHI, C3 et C1q et la localisation de ces protéines sont similaires. Les deux molécules pourraient donc interagir et fonctionner ensemble au cours du remodelage des synapses excitatrices et inhibitrices.

Certaines études montrent que la microglie exprime des récepteurs du CMHI, comme DAP12 (DNAX activating protein 12), qui a un impact sur la fonction synaptique et la survie des neurones. DAP12 est une protéine transmembranaire dont la structure et la fonction sont similaires à celles de CD3 $\zeta$  (Lanier et al., 1998). Ces deux protéines portent des motifs ITAMs (immunotyrosine-based activation motif) et s'associent avec de nombreux récepteurs cellulaires dont les récepteurs des

cellules NK (natural killer). Les récepteurs associés au DAP12 sont capables de reconnaître les complexes CMHI (Lanier, 2001). Il a été montré que les souris exprimant une forme mutée non fonctionnelle de la protéine DAP12 ont une transmission synaptique glutamatergique altérée et une diminution sélective de l'expression de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA et du récepteur au BDNF TrkB au niveau des densités post-synaptiques de l'hippocampe (Roumier et al., 2004). Ces données suggèrent un lien entre l'expression microgliale de DAP12 et la régulation de la transmission synaptique par le CMHI.

Cependant, l'engagement du CMHI n'est pas conservé dans toutes les structures. Bien que le CMHI soit également exprimé dans le cervelet adulte, le remodelage des projections des fibres des cellules de Purkinje n'est pas dépendant du CMHI (Letellier et al., 2008; McConnell et al., 2009). Les souris déficientes pour le CMHI présentent des anomalies de la plasticité synaptique dans l'hippocampe. En effet, les enregistrements électrophysiologiques montrent que la LTP est facilitée tandis que la LTD est réprimée (Huh et al., 2000; Barco et al., 2005). De plus, les souris transgéniques exprimant le facteur de transcription CREB dans l'hippocampe ont un niveau d'ARNm des molécules H2-K et H2-D élevé supposant que ces molécules sont impliquées dans l'induction de la LTP (Shatz, 2009).

Dans leur ensemble, ces données permettent de proposer un rôle du CMHI dans les mécanismes liés au développement et à la plasticité neuronale. L'identification des récepteurs, des protéines adaptatrices ainsi que les voies de signalisations recrutées permettra à terme de déterminer les mécanismes d'action du CMHI.

## **II. Conséquences de l'expression neuronale des molécules du système immunitaire**

Nous avons vu précédemment que certaines molécules immunitaires exprimées dans le cerveau ont un impact sur la polarisation neuronale, la transmission synaptique et le remodelage des circuits neuronaux. Ainsi, il existe plusieurs situations dans lesquelles des perturbations au niveau du SI peuvent avoir des conséquences au niveau du SNC. Cela peut être lors d'infections virales et au cours de traitements immunosuppresseurs. De plus, certaines mutations des gènes impliqués dans le SI peuvent avoir un impact majeur sur le développement et le fonctionnement cérébral.

### ***A. Neurodéveloppement***

Les maladies neurodéveloppementales les plus connues sont l'autisme et la schizophrénie. L'origine de ces maladies est encore méconnue. Certaines pistes de recherche montrent une forte corrélation entre le SI et ces pathologies.

#### **1. Infections au cours de la grossesse**

De nombreux travaux montrent un lien étroit entre les infections maternelles au cours de la grossesse et certaines maladies neurodéveloppementales dans la descendance comme les retards mentaux, l'autisme et la schizophrénie (Ashwood et al., 2006; Ellman et Susser, 2009). Il est actuellement proposé que ces maladies neurodéveloppementales proviennent de défauts dans la neurogenèse ou dans la formation des réseaux neuronaux (dendritogenèse, synaptogenèse). Certaines données chez l'homme montrent que dans le cerveau du fœtus, la prolifération des CSN et la migration des progéniteurs neuronaux sont altérées par l'activation de cytokines (Cai et al., 2000). Dans le modèle murin de l'activation maternelle du système immunitaire par l'acide polyinosinique:polycytidylique ou par une infection virale maternelle aux stades embryonnaires E9.5-12.5, le nombre de cellules de Purkinje dans le cerveau post-natal du souriceau est diminué (Shi et al., 2009b). De manière intéressante, dans ce modèle mimant l'infection virale maternelle, le blocage de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 empêche le développement des altérations comportementales dans la descendance (Smith et al., 2007). Au cours de l'infection virale, les cytokines proinflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-1 $\beta$  sont sécrétées en grandes quantités et ont alors la capacité de réguler la fonction des CSN et ainsi perturber le développement neuronal. Ces études révèlent l'impact du système immunitaire sur la régulation de la neurogenèse. On sait également que les cytokines inflammatoires induisent l'expression neuronale du CMHI. Compte tenu du rôle du CMHI dans la formation des prolongements neuronaux et la régulation des synapses, une

augmentation de son expression au cours de l'embryogenèse peut avoir des conséquences neurophysiopathologiques.

## **2. Mutation des gènes du système immunitaire**

Certaines mutations des gènes du SI engendrent des désordres immunitaires et des altérations du fonctionnement cérébral. Chez l'homme, la mutation de la protéine adaptatrice DAP12, de manière surprenante ne provoque pas d'altérations de la réponse immunitaire mais induit la maladie de Nasu-Hakola provoquant des démences à l'âge de 30 ans (Kuroda et al., 2007; Paloneva et al., 2000; Lanier, 2009). Les souris adultes déficientes pour la protéine DAP12 sont plus fragiles aux infections virales pourtant leurs cellules dendritiques et leurs macrophages répondent plus fortement lors de ces infections (Sjölin et al., 2002, 2006). De plus, ces souris montrent des déficits cognitifs et comportementaux similaires aux symptômes de la schizophrénie et de l'autisme (Kaifu et al., 2003).

Des études comparatives de gènes entre des patients atteints de schizophrénie et des patients sains révèlent que cette maladie est significativement associée à des SNPs (single nucleotide polymorphisms) dans la région du CMH sur le chromosome 6p21.3-22.1. Cette association montre que les protéines du CMH semblent être des biomarqueurs et que leur mutation prédispose au développement de la schizophrénie (Shi et al., 2009a; Stefansson et al., 2009). Ces observations corrélerent avec les études réalisées chez les souris déficientes pour le CMHI qui montrent des altérations de la plasticité neuronale dans l'hippocampe et le cortex visuel (Boulanger, 2009; Datwani et al., 2009; Huh et al., 2000). Ces défauts de la transmission synaptique glutamatergique ont également été identifiés dans l'hippocampe de singe (Ribic et al., 2010).

### ***B. Thérapie d'immunointervention***

Lors d'une greffe d'organe, la survie à long terme du greffon nécessite l'emploi de traitements immunosuppresseurs. Or ces traitements ciblent des molécules connues du SI afin de diminuer la réponse immunitaire. Compte tenu de l'expression cérébrale de certaines molécules du SI, les immunosuppresseurs peuvent aussi avoir une action sur le SNC.

#### **1. Cyclosporine A**

La cyclosporine A, polypeptide lipophile cyclique, est un immunosuppresseur puissant qui bloque spécifiquement la calcineurine. La calcineurine, activée suite à l'engagement du récepteur des lymphocytes T (LT) par le calcium, permet l'activation de ces cellules *via* le facteur NFAT (Oh-hora, 2009). La cyclosporine A bloque la voie de signalisation dépendante de la calcineurine/NFAT et ainsi

inhibe l'activation des LT empêchant ainsi le rejet de greffe lors de la transplantation d'organes et le développement de nombreuses maladies autoimmunes (Faulds et al., 1993; Rossini et al., 1999). Cependant de nombreuses études montrent que cette molécule provoque une neurotoxicité se caractérisant par des modifications de l'état psychiatrique comme la dépression, anxiété, paranoïa qui apparaissent quelques mois après l'administration de celle-ci (Bird et al., 1990; De Groen et al., 1987; Kahan et al., 1987; Schmitt et al., 2006; Telarović et al., 2007). Des travaux récents démontrent également que cette molécule augmente les symptômes de la schizophrénie paranoïde ; ces symptômes disparaissent suite à l'interruption du traitement (Di Nuzzo et al., 2007; Menter et al., 2008). Bien que le transport de la cyclosporine A à travers la barrière hématoencéphalique (BHE) soit restreint par la glycoprotéine-P (Tsuji et al., 1993), une étude récente montre que la cyclosporine A induit *in vitro* une hyperperméabilité de la BHE en inhibant la voie de signalisation dépendante de l'adrénomédulline, un régulateur autocrine de la fonction de la BHE (Dohgu et al., 2010). De cette manière, la cyclosporine A pourrait pénétrer facilement dans le SNC *in vivo* et avoir un impact sur le fonctionnement de ce système. En effet, la voie de signalisation calcineurine/NFAT dépendante du calcium a été montrée comme importante au cours du développement neuronal notamment pour la régulation de la croissance dendritique et axonale (Graef et al., 2003; Schwartz et al., 2009). Certaines données révèlent que la cyclosporine A inhibe la transmission GABAergique et active la transmission sérotoninergique (Shuto et al., 1998, 1999). De plus, il a été montré que cette molécule augmente la survie des précurseurs neuronaux *in vivo* dans la ZSV et *in vitro* (Hunt et al., 2010) et réduit la complexité de l'arborisation des dendrites des neurones provenant de la ZSG de l'hippocampe (Hwang et al., 2010). L'administration chronique de la cyclosporine A chez des rats diminue significativement le niveau des ARNm du BDNF et de son récepteur TrkB dans l'hippocampe (Chen et al., 2010). Cette altération de l'arborisation dendritique et de l'expression du BDNF pourraient participer à la manifestation des troubles de l'apprentissage et de l'humeur observés chez certains patients traités à la cyclosporine A. Toutes ces observations expliquent les divers symptômes identifiés chez les patients traités avec la cyclosporine A et montrent l'importance du choix du traitement. La calcineurine étant importante pour l'activation des LT du SI mais également pour le développement du SNC, son blocage peut également avoir des conséquences sur le développement du SNC et l'activité neuronale.

## **2. L'anticorps monoclonal de souris : OKT3**

Des anticorps monoclonaux peuvent également être utilisés comme immunosuppresseurs. L'anticorps monoclonal de souris OKT3 ou muromonab-CD3 dirigé contre le complexe CD3 des LT humains et qui reconnaît notamment la sous-unité CD3 $\epsilon$  (Dunstone et al., 2004), est un agent

immunosuppresseur puissant employé pour bloquer le rejet de greffe d'organe chez des patients transplantés. Suite à l'administration de cet anticorps, une faible proportion de patients traités développent des syndrômes neurologiques et neuropsychiatriques sévères révélés par un mutisme akinétique, psychoses aiguës et crises d'épilepsie (Pittock et al., 2003b; Fernández et al., 1993; Ponticelli et Campise, 2005). Ces symptômes disparaissent quelques jours après l'arrêt du traitement.

L'expression de la sous-unité CD3 $\epsilon$  dans les neurones de Purkinje du cervelet et son implication dans le développement du cervelet ont été mis en évidence (Nakamura et al., 2007). Une hypothèse est que le contexte pro-inflammatoire induit par l'anticorps OKT3 favorise le passage de celui-ci à travers la BHE et donc son infiltration dans le SNC. Cet anticorps reconnaît alors sa cible exprimée par les cellules du SNC et provoquerait les altérations neurologiques et neuropsychiatriques observées.

Du fait de l'existence de molécules communes au SI et SNC, l'activation ou la répression de certaines molécules et voies de signalisation ciblant le SI peut avoir un impact majeur sur la fonction du SNC. L'identification du rôle des protéines immunitaires exprimées dans le SNC est donc primordiale afin de développer des stratégies thérapeutiques plus adaptées et mieux contrôlées.

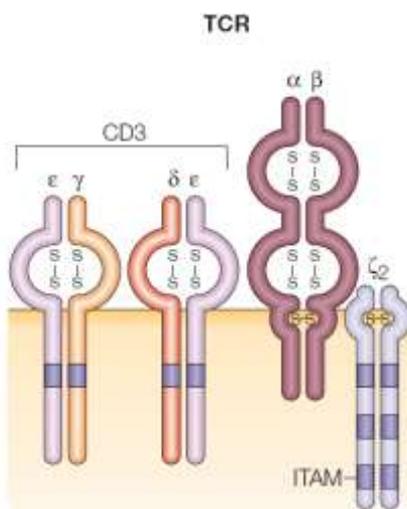
Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à un constituant majeur du complexe CD3 exprimé par les LT, la sous-unité CD3 $\zeta$  et à son rôle dans le développement neuronal.

### III. CD3 $\zeta$ : molécule adaptatrice dans les systèmes immunitaire et nerveux central

Dans le système immunitaire, de nombreux récepteurs ne possèdent qu'une petite partie intracellulaire. Pour transduire les signaux d'activation, ils se lient alors à des molécules adaptatrices *via* des liaisons non covalentes. La sous-unité CD3 $\zeta$ , aussi appelée TCR $\zeta$ , est une protéine adaptatrice signalétique décrite pour la première fois dans les LT associée au TCR où elle joue un rôle central dans la réponse antigénique (Samelson et al., 1985; Weissman et al., 1988).

#### A. Structure du CD3zeta

Egalement exprimée dans d'autres types cellulaires comme les cellules NK (Lanier et al., 1989), ce sont dans les LT que cette protéine est la mieux caractérisée. La chaîne  $\zeta$  est une protéine de 16-kDa (Samelson et al., 1985), exprimée sous forme homodimérique dans les LT (Lanier et al., 1989). Elle fait partie d'un complexe protéique signalétique associé au TCR appelé complexe CD3 formé de 4 sous-unités :  $\zeta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$  (Figure 22). Ces trois dernières présentent des homologies de séquences et leurs gènes correspondants sont tous présents sur le chromosome 11 chez l'homme (9 chez la souris). La sous-unité  $\zeta$  quant à elle est structurellement différente des trois autres et le gène la codant est présent sur le chromosome 1. Malgré ces divergences, toutes ces sous-unités présentent une homologie de fonction due à la présence de domaines spécifiques appelés domaines ITAMs.



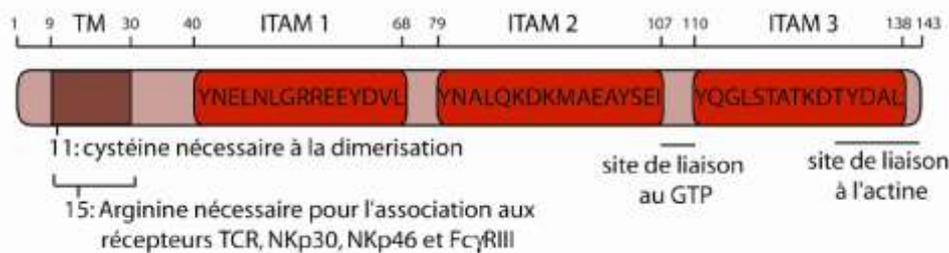
**Figure 22: Représentation de la chaîne  $\zeta$  et de son interaction avec le récepteur des LT, le TCR.**

*La molécule CD3 $\zeta$  s'associe en homodimère avec le TCR et comporte 3 motifs ITAMs essentiels au processus d'activation des LT. Adapté de M. Baniyash 2004.*

Contrairement aux domaines intracellulaires des sous-unités  $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  qui ne comportent qu'un seul ITAM, le domaine intracellulaire de la protéine CD3 $\zeta$  en possède trois. Ces domaines sont

constitués de sites de phosphorylation très conservés et sont caractérisés par une séquence consensus classique (D/E)YxxL/I-(x)<sub>6-8</sub>-YxxL/I(L/I) (D étant l'aspartate, E le glutamate, I l'isoleucine, L la leucine et Y la tyrosine). Ces domaines ITAMs sont phosphorylés sur leurs tyrosines par des kinases de la famille Src, en particulier Lck (leukocyte-specific protein tyrosine kinase) et Fyn. La phosphorylation des tyrosines représente un signal moléculaire permettant le recrutement et la liaison de protéines tyrosine kinases à domaine SH2 incluant Syk (spleen tyrosine kinase) et ZAP70 ( $\zeta$  chain-associated protein kinase 70 kDa) (Iwashima et al., 1994; Chan et al., 1994). De ce complexe ainsi formé naît une cascade d'événements intracellulaires qui sera décrite dans le paragraphe suivant.

En plus des domaines ITAMs, CD3 $\zeta$  par ses fonctions adaptatrices possède des capacités de liaisons multiples, et donc des sites de fixation pour différentes molécules. Il est constitué d'un site de liaison à l'actine, à différents récepteurs comme le TCR et au GTP (Figure 23).



**Figure 23: Structure du CD3 $\zeta$ .**

Le CD3 $\zeta$  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 $\zeta$  porte trois domaines ITAMs, un site de liaison au GTP et un site de liaison à l'actine.

CD3 $\zeta$  peut se lier directement à l'actine dans sa partie C-terminale (Caplan et al., 1995; Rozdzial et al., 1995). Cependant, cette liaison est dépendante de la phosphorylation de la tyrosine présente dans l'ITAM 3 en C-terminal (Pitcher et van Oers, 2003). Cette aptitude à lier l'actine directement n'a jamais fait l'objet d'étude fonctionnelle. On peut cependant supposer qu'elle pourrait faciliter les mécanismes de recrutement moléculaire lors de la formation de la synapse immunologique entre un LT et une cellule présentatrice d'antigène.

L'association de la protéine CD3 $\zeta$  avec le TCR se fait par la liaison entre un résidu arginine du TCR, chargé positivement, et un résidu acide aspartique, chargé négativement situé dans le domaine transmembranaire (Call et al., 2002). Ces résidus sont aussi nécessaires à l'homodimérisation de CD3 $\zeta$ .

L'équipe de Terhorst en 1994 a mis en évidence un site de liaison de la protéine CD3 $\zeta$  au GTP (Franco et al., 1994). Cependant, la fonction spécifique de cette liaison reste à l'heure actuelle

inconnue. On peut imaginer qu'elle pourrait participer à l'activation des petites protéines G induite par CD3 $\zeta$  (Stanners et al., 1995; Zhou et al., 1998).

## ***B. Les récepteurs couplés à CD3 $\zeta$ et les fonctions associées.***

Selon le type cellulaire considéré, la protéine CD3 $\zeta$  peut s'associer à différents récepteurs. Dans les LT il s'associe au TCR mais aussi au récepteur de la chimiokine CXCR4, tandis qu'il se lie aux récepteurs NKp46, NKp30 et Fc $\gamma$ RIII dans les cellules NK (Lanier, 2003).

### **1. Le TCR (T cell receptor)**

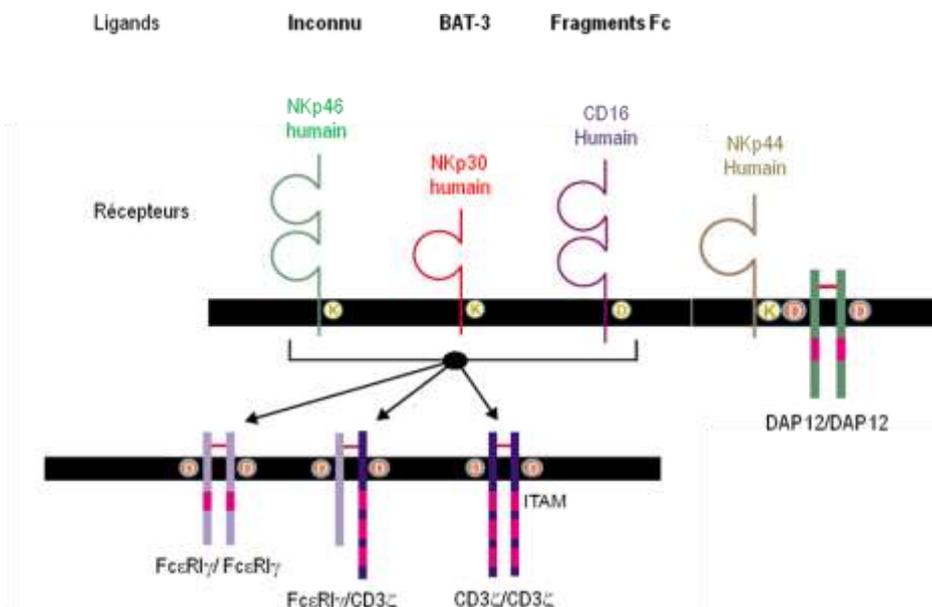
La protéine CD3 $\zeta$  est une molécule centrale dans l'activité du TCR en particulier dans la reconnaissance antigénique médiée par les LT. Deux types de LT sont identifiés : les LT CD8+ dits cytotoxiques qui reconnaissent de manière spécifique les antigènes portés par le CMHI et les LT CD4+ qui reconnaissent les antigènes portés par le CMHII. Alors que le CMHI est présent à la surface de la plupart des cellules nucléées, le CMHII est restreint aux monocytes, aux macrophages, à la microglie, aux cellules dendritiques, aux lymphocytes B et aux LT activés. Dans le cas de la reconnaissance du CMHI, le co-récepteur du TCR est le CD8 tandis que pour le CMHII, le co-récepteur est le CD4. L'antigène ainsi présenté est une véritable signature moléculaire de la cellule le présentant. Le TCR a la capacité de discriminer les peptides provenant du soi et ceux provenant du non soi et d'induire une réponse immunitaire visant spécifiquement les cellules porteuses de peptides du non soi.

Le TCR est composé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  qui s'associent pour former le récepteur. Associées, elles sont exprimées à la surface membranaire du LT. Cette expression n'est possible que si le CD3 $\zeta$  s'associe avec les autres chaînes CD3.

En effet, la séquence d'assemblage du TCR avec le complexe CD3 se fait très tôt dans l'appareil de golgi et commence par la dimérisation des deux chaînes du TCR puis son association avec le CD3 $\zeta$  et les autres sous-unités du complexe CD3 (Minami et al., 1987; Dietrich et al., 1999). La perte de l'une des chaînes CD3 ou des sous-unités CD3 $\zeta$  génère la synthèse de TCR instables, rapidement dégradés dans les lysosomes (Bonifacino et al., 1989). De plus, l'expression du CD3 $\zeta$  à la membrane est nécessaire pour la stabilisation du complexe TCR. Des modèles cellulaires n'exprimant pas le CD3 $\zeta$  montre que la surexpression de CD3 $\zeta$  diminue la vitesse d'internalisation du complexe TCR (D'Oro et al., 2002). L'expression du CD3 $\zeta$  est donc essentielle pour l'expression et la régulation du TCR à la surface des LT mais également importante pour la reconnaissance antigénique.

## 2. Les récepteurs des cellules NK

Les cellules NK, dites Natural killer, font partie du système immunitaire inné et sont caractérisées chez l'humain par le marqueur CD56. Elles ont la capacité de lyser les cellules étrangères à l'organisme indépendamment de l'antigène sans activation préalable par la voie perforine/granzymes et par la voie dépendante de Fas. Contrairement aux lymphocytes T CD8+ qui lysent les cellules qui portent un peptide présenté par les molécules du CMH, les cellules NK sont spontanément lytiques envers toutes les cellules de notre organisme. Cependant, elles possèdent à leur surface de nombreux récepteurs qui permettent de réguler leur activité lytique afin de préserver les cellules saines. Les récepteurs exprimés sur les cellules NK sont de deux types : activateurs s'ils possèdent des motifs ITAMs ou inhibiteurs s'ils possèdent des motifs ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Lorsqu'une cellule NK rencontre une autre cellule, la lyse de celle-ci ne s'effectuera que si les signaux activateurs prédominent sur les signaux inhibiteurs (Vivier et al., 2004). Les cellules NK sont spécialisées dans la destruction des cellules tumorales et infectées par les virus (Vivier et al., 2008). Cette fonction lytique est dépendante de l'activation de récepteurs activateurs membre de la famille des immunoglobulines-like, appelés récepteurs cytotoxiques naturels. Ces récepteurs incluent les molécules NKp30, NKp44, NKp46 et Fc $\gamma$ RIII (ou CD16) (Lanier, 2003). Ces récepteurs s'associent avec des molécules adaptatrices portant des ITAMs dont les molécules CD3 $\zeta$ , DAP12 et Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  (Figure 24).



**Figure 24: Les récepteurs des cellules NK et leurs molécules adaptatrices.**

Les récepteurs CD16, NKp30 et NKp46 peuvent s'associer avec des homodimères ou des hétérodimères des protéines CD3 $\zeta$  et Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ . Le récepteur NKp44 s'associe avec l'homodimère DAP12. Adapté de L.L. Lanier 2003.

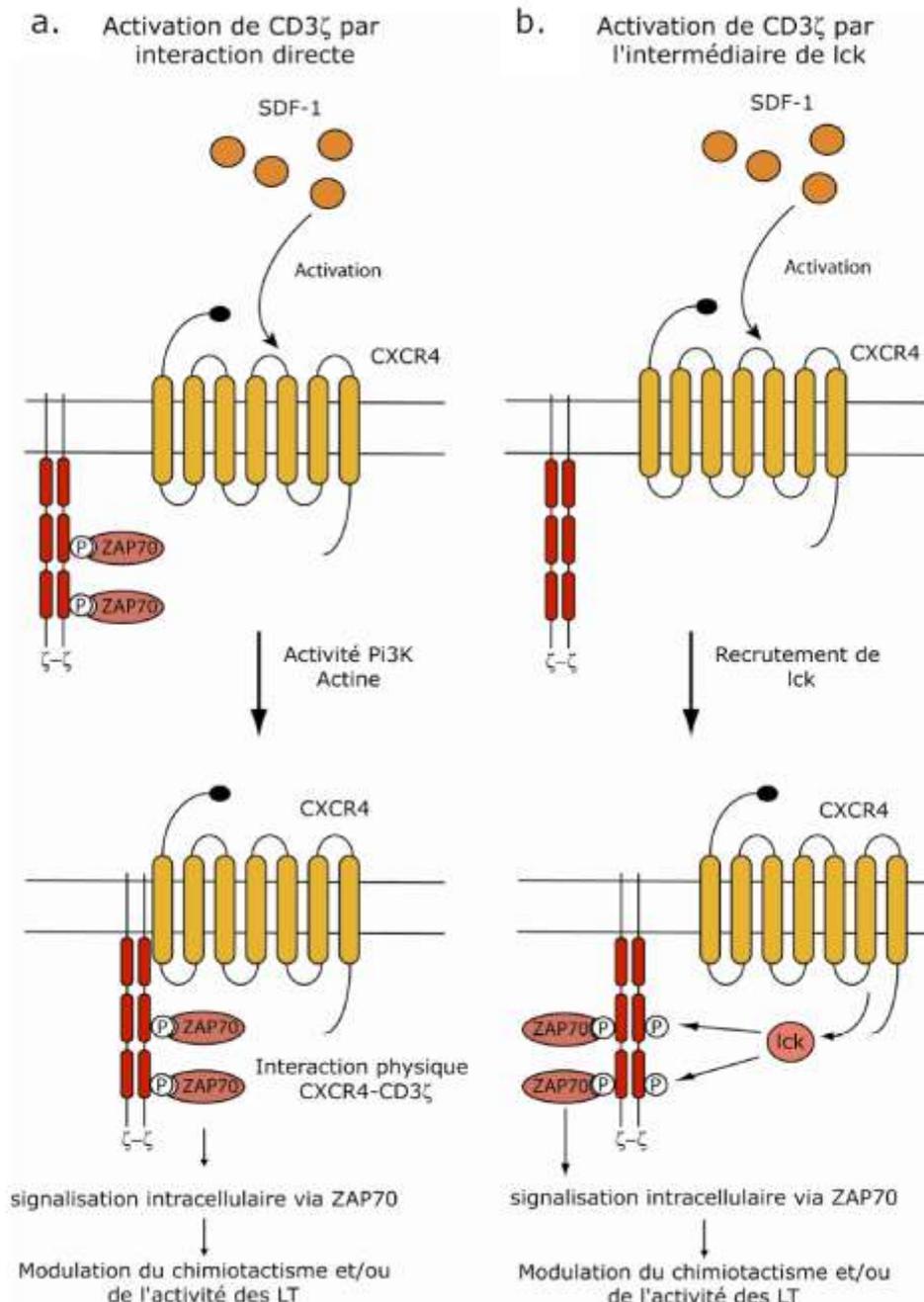
CD3 $\zeta$  et Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  peuvent s'associer en homodimères ou en hétérodimères tandis que DAP12 ne s'associe qu'en homodimères. L'association entre ces récepteurs et ces molécules se fait dans leurs régions transmembranaires par l'interaction d'acides aminés chargés. Chez l'humain, les récepteurs des cellules NK peuvent s'associer aux homodimères CD3 $\zeta$  et Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  mais aussi avec l'hétérodimère CD3 $\zeta$ /Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ . Chez la souris, le CD16 est incapable de se lier au CD3 $\zeta$  et de ce fait utilise la molécule Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ . Très peu de ligands de ces récepteurs sont connus, seul BAT-3 (antigen-B-associated 3) a été montré comme liant le récepteur NKp30 (Pogge von Strandmann et al., 2007). Le CD16 quant à lui est un récepteur aux fragments constants (Fc) des immunoglobulines. L'association moléculaire et fonctionnelle de CD3 $\zeta$  avec de nombreux immunorécepteurs rend sa fonction centrale dans les mécanismes de reconnaissance immunitaire.

### 3. Le récepteur CXCR4

Récemment, deux groupes indépendants ont montré l'importance de CD3 $\zeta$  dans le fonctionnement d'un récepteur couplé aux protéines G, famille de récepteurs qui jusqu'à présent n'était pas connue pour son association avec des molécules portant des domaines ITAMs. Il s'agit du récepteur de chimiokine CXCR4 qui possède un ligand unique, CXCL12 aussi appelé SDF-1 (stromal derived factor-1). Dans les LT, la liaison récepteur/ligand est impliquée dans des fonctions d'adhésion, de chimiotactisme et de co-stimulation. Ce couple CXCR4/SDF-1 est également largement exprimé dans le SNC où il joue un rôle important dans le développement cérébral incluant la prolifération de cellules souches neurales (Tran et al., 2005; Han et al., 2001), la migration cellulaire (Belmadani et al., 2005) et dans la formation des prolongements neuronaux (Arakawa et al., 2003; Pujol et al., 2005).

Ces deux groupes ont montré que la fonction chimiotactique de SDF-1 sur les LT est dépendante de l'activation de CD3 $\zeta$  et de ZAP70 (Kremer et al., 2003; Patrussi et al., 2007). Deux hypothèses différentes expliquant l'interaction fonctionnelle entre la protéine CD3 $\zeta$  et le récepteur CXCR4 suite à l'activation par SDF-1 ont été proposées. La première montre que l'activation de CXCR4 par SDF-1 induit une interaction directe entre CXCR4 et CD3 $\zeta$  (Kumar et al., 2006). Cette étude postule que le complexe de signalisation opérationnel du TCR, ZAP70 associé au CD3 $\zeta$  phosphorylé, est recruté par l'activation du CXCR4 permettant ainsi un renforcement des voies de signalisation qui lui est associé (Figure 25). La seconde étude montre que la liaison de SDF-1 sur le récepteur CXCR4 induit la phosphorylation de Ick, puis de CD3 $\zeta$  et enfin ZAP70 (Patrussi et al., 2007). L'activation de CXCR4 provoque donc l'activation indirecte de CD3 $\zeta$  *via* la kinase Ick (Figure 25). Dans les deux cas, l'activation de ZAP70 permet l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire aboutissant à la modulation de l'activité et du chimiotactisme du LT.

Ces études apportent donc de nouvelles données importantes concernant les molécules à domaines ITAMs. En effet, en plus de leur implication dans la signalisation du TCR elles peuvent intervenir dans celle médiée par les récepteurs couplés aux protéines G. Ces résultats révèlent un nouveau mécanisme dans le SI et l'existence d'une fonction de CD3 $\zeta$  en dehors d'une association avec un immunorécepteur.



**Figure 25: L'activation de CD3 $\zeta$  suite à la liaison de SDF-1 avec CXCR4.**

La fixation de SDF-1 sur son récepteur CXCR4 induit une activation de CD3 $\zeta$  puis de la voie de signalisation médiée par ZAP70. Cette activation pourrait se faire selon deux modes. a) CXCR4 activé pourrait recruter CD3 $\zeta$  par interaction physique. b) cette activation pourrait être dépendante de l'activation intermédiaire de Ick, une

kinase qui phosphoryle CD3 $\zeta$  et permet le recrutement de ZAP70. Dans les deux cas, l'activation de CD3 $\zeta$  aboutit à la modulation du chimiotactisme et de l'activité des LT.

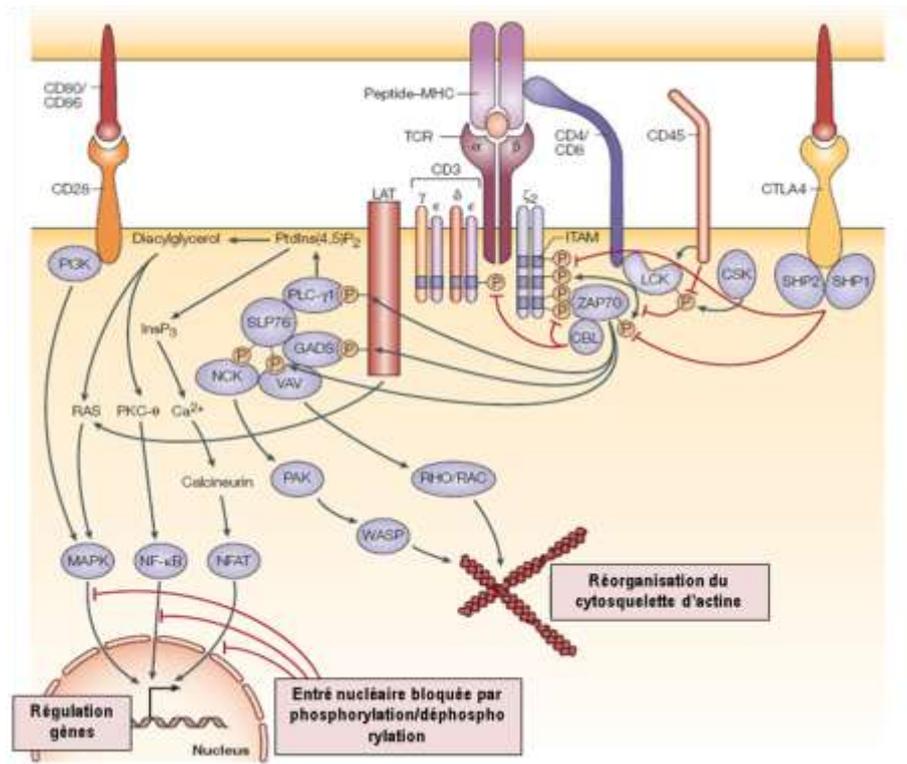
### ***C. Signalisation intracellulaire déclenchée par l'activation de CD3 $\zeta$***

Suite à l'engagement du TCR et de son co-récepteur CD28, les protéines kinases de la famille Src, Lck et Fyn, sont activées et phosphorylent les chaînes  $\zeta$  et  $\epsilon$  du TCR au niveau des tyrosines portées par les ITAMs. Les ITAMs phosphorylés de la chaîne  $\zeta$  fonctionnent comme des sites d'ancrage pour le recrutement de la protéine kinase ZAP70, qui phosphoryle ensuite divers substrats incluant LAT (linker for activation of T cells), SLP76 (Src homology 2 (SH2)-domain-containing leukocyte protein of 76kDa) et PLC- $\gamma$ 1 (phospholipase C- $\gamma$ 1). Ces protéines une fois phosphorylées recrutent de nombreuses protéines catalytiques ou non comme Vav, GADS (growth-factor-receptor-bound protein 2 (GRB2)-related adaptor protein) et NCK (non-catalytic region of tyrosine kinase). Ces protéines génèrent différentes voies de signalisations intracellulaires permettant l'activation de RAS, la mobilisation du calcium, l'activation de la PKC et de la calcineurine ainsi que la polarisation du cytosquelette d'actine. Ces cascades d'évènements facilitent la formation de la synapse immunologique et l'activation des LT. L'activation complète des LT est caractérisée par l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et NFAT.

Suite à cette étape d'activation du LT, des mécanismes d'arrêt du signal se mettent en place, le TCR est internalisé, ubiquitinylé *via* la protéine CBL (casitas B-lineage lymphoma) puis dégradé principalement dans les lysosomes. De plus, la protéine CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) s'exprime à la surface des LT et est activée par la phosphorylation de ses motifs inhibiteurs. Ceci permet le recrutement de certaines protéines phosphatases, SHP1 et SHP2, qui déphosphorylent la chaîne  $\zeta$ , les protéines kinases ainsi que les différents substrats. L'entrée des facteurs de transcription dans le noyau est également bloquée par des phénomènes de phosphorylations/déphosphorylation (Figure 26).

En fonction du niveau de phosphorylation des ITAMs, l'activation de la voie de signalisation pourra être modulée. En effet, il existe une relation directe entre le nombre de résidus tyrosine phosphorylés et le niveau d'activation des voies de transduction dépendantes de CD3 $\zeta$ . Une fois ZAP70 recruté par la phosphorylation d'un résidu tyrosine, un rétrocontrôle positif est déclenché permettant la phosphorylation des autres résidus tyrosines contenus dans les ITAMs. Le système est ainsi amplifié et le recrutement d'autres molécules ZAP70 est alors possible (Steinberg et al., 2004). Contrairement à ZAP70, Syk ne possède pas cette activité de rétrocontrôle positif et ne peut donc pas amplifier l'activité de la voie de signalisation médiée par CD3 $\zeta$  (Steinberg et al., 2004).

Chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$ , l'expression du TCR est significativement diminuée à la surface des LT. De plus, l'absence de la protéine CD3 $\zeta$  perturbe la génération ou la survie des thymocytes double positifs (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) mais également la formation de thymocytes simple positifs (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) (Love et al., 1993; Malissen et al., 1993). Le CD3 $\zeta$  est donc important pour la différenciation intrathymique des LT et son absence provoque des déficits immunitaires sévères (Roberts et al., 2007).



**Figure 26: Les voies de signalisation induites par l'activation de CD3 $\zeta$ .**

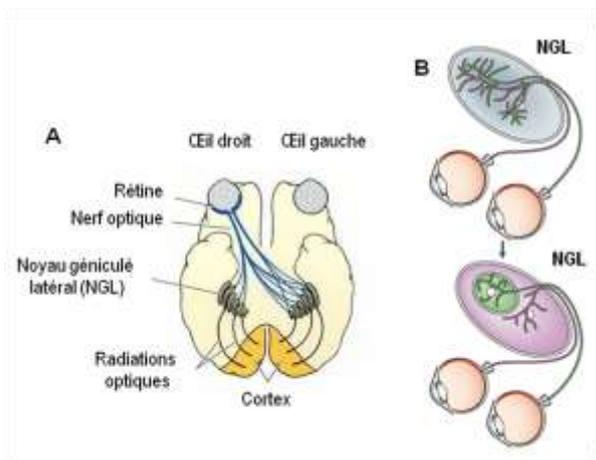
L'interaction entre le TCR et le CMHI induit l'activation des protéines kinases de la famille Src, Lck et Fyn qui phosphoryle CD3 $\zeta$ . Cette phosphorylation permet le recrutement et l'activation des kinases de la famille Syk/ZAP70 qui déclenchent l'activation de différentes voies de signalisation. Ces voies de signalisations induisent la modulation de l'expression génique ou la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine. Adapté de M. Baniyash 2004.

#### **D. Rôle du CD3 $\zeta$ dans le système nerveux central**

Les premières évidences d'une fonction neuronale du CD3 $\zeta$  proviennent d'un criblage différentiel de mRNA visant à rechercher des gènes impliqués dans le développement du système visuel (Corriveau et al., 1998). Au cours de ce criblage, le CMHI a été mis en évidence. Compte tenu des liens fonctionnels entre le CMHI et le CD3 $\zeta$  dans le SI, les auteurs ont recherché la présence de CD3 $\zeta$  dans le cerveau. L'ARNm de la protéine CD3 $\zeta$  a été détecté dans le thalamus, le NGL et

l'hippocampe (Corriveau et al., 1998). La protéine a été identifiée dans le cerveau par western blot au cours du développement post-natal dans l'hippocampe (Sourial-Bassillious et al., 2006) et également par immunohistochimie dans la couche des NGR où elle colocalise avec le marqueur de la densité post-synaptique PSD-95 (Xu et al., 2010). L'étude des souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  permet de mettre en évidence le rôle fonctionnel de celui-ci dans le SNC. L'absence du CD3 $\zeta$  altère la structure dendritique des NGR se manifestant par une augmentation de la complexité de l'arborisation dendritique et induit un développement anormal du système visuel.

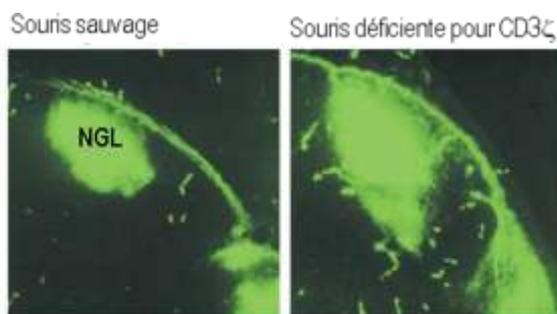
Dans ce système, les neurones ganglionnaires de la rétine projettent leurs axones dans le NGL. Initialement, les afférences provenant des deux yeux se chevauchent dans le NGL à la naissance. Au cours des deux premières semaines post-natales, ces afférences rétiniennes subissent un remodelage dépendant de l'activité neuronale et se ségréguent en régions spécifiques, établissant ainsi des connexions matures nécessaires à la vision binoculaire (Figure 27).



**Figure 27: Représentation de la voie réticulo-géniculée.**

**(A)** Les neurones de la rétine émettent leurs projections au niveau des noyaux géniculés latéraux (NGL) présents dans le thalamus. **(B)** A la naissance, les projections rétino-géniculées se chevauchent dans le NGL (haut). L'activité endogène neuronale provenant des yeux conduit au raffinement de ces projections conduisant à une ségrégation spécifique (bas). Adapté de Scott F Gilbert et L.M. Boulanger et C.J. Shatz 2004.

Chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$ , les afférences provenant de la rétine établissent des connexions dans des zones ectopiques du noyau genouillé latéral (Figure 28) (Huh et al., 2000). De plus, la ségrégation des afférences rétiniennes en des zones spécifiques du NLG est perturbé chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> (Xu et al., 2010).



**Figure 28: Images illustrant le défaut développemental observé dans le noyau genouillé latéral (NGL) chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$ .**

Les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  possèdent une zone de projection des afférences rétiniennes dans le NGL plus importante que chez les souris sauvages (Boulanger et Shatz, 2004).

Cette altération de ségrégation n'est observée qu'à partir de la deuxième semaine post-natale, quand l'activité neuronale est principalement médiée par les récepteurs glutamatergiques.

Aucun défaut n'est détecté au cours de la première semaine post-natale, lorsque l'activité neuronale impliquée dans le remodelage des axones rétiniens est de type cholinergique (Xu et al., 2010). Il semble donc que l'absence de CD3 $\zeta$  perturbe sélectivement la transmission glutamatergique. Appuyant cette interprétation, des analyses électrophysiologiques dans la rétine révèlent que l'absence de CD3 $\zeta$  affecte spécifiquement la transmission synaptique médiée par les récepteurs au glutamate au cours de la seconde semaine post-natale (Xu et al., 2010). Chez ces souris, la motilité dendritique des NGR est réduite et est corrélée à une augmentation de la stabilité des protrusions dendritiques. Ces modifications de la motilité dendritique des NGR affectent la structure dendritique et la connectivité synaptique (Xu et al., 2010). En plus des anomalies développementales observées, ces souris présentent à l'âge adulte des altérations de la plasticité synaptique caractérisées par une augmentation de la LTP et une inhibition LTD (Huh et al., 2000). Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Kandel en 2005 (Barco et al., 2005). Cependant, il est possible que les effets centraux identifiés chez ces souris aient une origine périphérique. Il serait donc essentiel de produire des souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> conditionnelles dans lesquelles l'expression de CD3 $\zeta$  serait sélectivement supprimée dans le SNC afin de clarifier ce point. Néanmoins, ces résultats restent intéressants car ils présentent l'implication d'une nouvelle molécule dans des mécanismes cérébraux. En effet, ils permettent d'identifier un rôle nouveau de CD3 $\zeta$  dans des mécanismes indépendants du SI ouvrant ainsi la voie à de nouveaux champs d'investigation.

## Objectifs de la thèse

Au cours de cette introduction, nous avons vu l'implication de certaines molécules que l'on pensait restreintes au SI dans le développement neuronal. C'est le cas de la protéine adaptatrice CD3 $\zeta$ , connue principalement pour son rôle dans l'activation des LT. Au cours de ces dernières années, il a été suggéré son implication dans les fonctions cérébrales. En effet, cette protéine est importante au cours du développement du système visuel mais également pour la régulation de la transmission glutamatergique dans la rétine. Malgré les altérations de la plasticité synaptique enregistrées dans l'hippocampe et dans le cortex cérébral, l'expression cérébrale de la protéine CD3 $\zeta$  et sa fonction au sein du SNC restent encore inconnues. Nos analyses immunohistochimiques montrent que la protéine CD3 $\zeta$  est sélectivement exprimée par les neurones chez le rat *in vivo* (E15 et adulte). Ces observations supposent que cette protéine puisse avoir une fonction dans la polarisation neuronale. Afin d'identifier son rôle au cours du développement neuronal, nous nous sommes focalisés principalement sur deux étapes clé du développement que sont l'émergence des premiers neurites (Article I) et la différenciation dendritique (Article II).

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier les sous populations du SNC exprimant le CD3 $\zeta$  et caractériser l'expression de cette protéine au cours de la différenciation neuronale *in vitro* en utilisant la culture de cellules souches neurales. A l'aide de la vidéomicroscopie, nous avons analysé dans des neuroblastes transfectés avec la protéine CD3 $\zeta$  fusionnée à la GFP l'impact de cette protéine sur l'émergence des premiers filopodes et neurites. Enfin, une analyse morphologique des neurones issus de souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  a également été réalisée au cours du premier stade de la différenciation neuronale en utilisant le modèle de culture de G. Banker.

Dans une seconde partie, nous avons étudié le rôle de CD3 $\zeta$  pendant la différenciation dendritique. Pour ce faire, nous avons analysé à l'échelle cellulaire sa distribution dans un modèle de neurones d'hippocampe de rat (G. Banker), dont les stades développementaux ont bien été décrits. Grâce à ce modèle, nous avons examiné les conséquences de la surexpression, de l'activation ou de l'inhibition de la protéine CD3 $\zeta$  sur le développement dendritique.

Dans une troisième partie, nous avons examiné l'impact de la protéine CD3 $\zeta$  sur la composition en protéines synaptiques en comparant le niveau d'expression des protéines de synapses excitatrices et inhibitrices chez les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  et souris CD3 $\zeta^{+/+}$  adultes. Enfin, une série de tests comportementaux afin de déterminer le rôle de la protéine CD3 $\zeta$  sur certains comportements liés à

l'anxiété et la dépression mais également sur la fonction olfactive a été réalisé au cours du développement post-natal.

L'ensemble de cette étude permettra de caractériser le rôle de la molécule immune CD3 $\zeta$  à différentes étapes du développement neuronal. Une meilleure connaissance du rôle de certains facteurs immuns sur la physiologie des cellules du SNC et le fonctionnement cérébral est particulièrement importante pour appréhender les effets neuropathologiques potentiellement induits par des thérapies ciblant le SI.

# RESULTATS

---

# **Article I : The immune signaling molecule CD3 $\zeta$ prevents neuronal cell-fate decision from neural progenitor cells and restrains neuritogenesis in newly-born neurons through a Rho-GEF Vav2 pathway**

Julie Angibaud<sup>123</sup>, Stéphane J. Baudouin<sup>123</sup>, Antoine Louveau<sup>123</sup>, Véronique Daguin<sup>123</sup>, Philippe Hulin<sup>36</sup>, Virginie Bonnamain<sup>123</sup>, Reynald Thinaré<sup>123</sup>, Zsolt Csaba<sup>4</sup>, Pascal Dournaud<sup>4</sup>, Philippe Naveilhan<sup>123</sup>, Nelly Noraz<sup>5</sup>, Véronique Pellier-Monnin<sup>5</sup>, and Hélène Boudin<sup>123</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR 643, Nantes, F44000 France

<sup>2</sup>CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes F44000 France

<sup>3</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France

<sup>4</sup>INSERM, UMR 676, Paris, France

<sup>5</sup>INSERM, U842, Lyon F-69372 France ; Université Lyon 1, UMR-S842 Lyon, F-69003 France

<sup>6</sup>IFR26, Plateforme PiCell, Nantes, F4400 France

*Nos travaux préliminaires avaient montré une expression très précoce de CD3 $\zeta$  par les précurseurs neuronaux, suggérant un rôle potentiel de CD3 $\zeta$  dans la neurogenèse ou dans les premières étapes de la différenciation neuronale. Nous avons testé cette hypothèse. Nous avons montré que le CD3 $\zeta$  n'est que très faiblement exprimé par cellules souches neurales in vitro et in vivo. Son expression dans les CSN induite par transfection empêche la neurogenèse. Ces résultats montrent que l'expression précoce de CD3 $\zeta$  dans le cerveau embryonnaire n'est pas liée à un rôle dans la neurogenèse. Cependant, la protéine CD3 $\zeta$  est détectée dans les neurones post-mitotiques nouvellement générés par les cellules souches neurales. Avant la différenciation morphologique, quand les neurones nouvellement générés sont encore de formes sphériques, le CD3 $\zeta$  s'accumule à la périphérie de la cellule dans des régions riches en actine. L'analyse par vidéomicroscopie de neurones transfectés avec le CD3 $\zeta$ -EGFP révèle que les régions riches en CD3 $\zeta$  corrélaient avec le site d'émergence d'un futur neurite. La surexpression du CD3 $\zeta$  dans les neurones immatures 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 $\zeta$ <sup>-/-</sup> ont une diminution du nombre de filopode et une augmentation du nombre de neurites. Nos résultats suggèrent que le CD3 $\zeta$  régule la polarisation neuronale en agissant comme une molécule « frein » favorisant ainsi l'extension des filopodes qui en retour retarde l'émergence des neurites.*

Manuscrit soumis

**The immune signaling molecule CD3 $\zeta$  prevents neuronal cell-fate decision from neural progenitors and restrains neuritogenesis in newly-born neurons.**

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

<sup>1</sup>INSERM, UMR 643, Nantes, F44000 France; <sup>2</sup> CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITUN, Nantes, F44000 France; <sup>3</sup> Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France ; <sup>4</sup>Inserm, UMR 676, Paris, France; <sup>5</sup> INSERM, U842, Lyon F-69372 France; Université Lyon 1, UMR-S842 Lyon, F-69003 France

Corresponding author:

Dr. Hélène Boudin

INSERM U643 - ITUN

30 Bld Jean Monnet

44093 Nantes cedex 01

France

Tel: + 33 (0) 2 40 08 49 79

Fax : + 33 (0) 2 40 08 74 11

Email: [helene.boudin@univ-nantes.fr](mailto:helene.boudin@univ-nantes.fr)

**Running title:** CD3 $\zeta$  regulates neuronal differentiation

## ABSTRACT

Recent studies have highlighted the key role of CD3 $\zeta$  in the activity-dependent maturation of neuronal circuit in the brain by directly regulating dendritic arbor. Here we show that this immune protein also exhibits an early function on the first stages of neuronal differentiation. Our data show that proliferative multipotent neural progenitors lacked CD3 $\zeta$  and that its ectopic expression prevented neurogenesis. However, CD3 $\zeta$  was readily detected in postmitotic newly-born neurons generated from neural stem cells. Before the morphological differentiation, when newly-born neurons were still spherical, CD3 $\zeta$  formed aggregates at the cell periphery, delimitating actin-rich subdomains. Time-lapse imaging of cultured neurons transfected with CD3 $\zeta$ -EGFP revealed that the CD3 $\zeta$  hot spots correlated to the initiation site of the upcoming neurite. Overexpression of CD3 $\zeta$  in immature neurons promoted the formation of filopodia extending from the cell body via a Rho-GEF Vav2 pathway, at the expense of neurite emergence. Conversely, neuronal culture from CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> mice repressed filopodial extension along nascent neurite and enhanced neurite emergence. Our data suggest that CD3 $\zeta$  influences the early specification of neuron morphology by acting as a molecular brake promoting filopodia extension, which in turn would delay neurite emergence. This study unravels a novel mechanism for early neuronal shaping by the immune adaptor protein CD3 $\zeta$ .

**Keywords:** neurite sprouting, filopodia, actin cytoskeleton, differentiation, neurosphere, neuroblast, Rho GTPase.

**Abbreviations:** NPC: neural precursor cell, DIV: day in vitro, TCR: T-cell receptor,

## INTRODUCTION

Recent evidence indicate 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 <sup>1,2</sup>. While the action of this class of molecules has been mostly studied during neuroinflammation in response to pathogens, injury or during autoimmune and neurodegenerative diseases, their role in normal brain have recently emerged. 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 <sup>3,4</sup>. Genetic invalidation or functional knock-down of MHC I molecules result in impaired hippocampal and cerebellar synaptic plasticity <sup>5,6,7</sup>, and in altered activity-dependent eye-specific remodeling of retino-geniculate projections at critical developmental periods <sup>6,8</sup>. Potential neuronal MHC I receptor include PirB, an Ig-like transmembrane receptor <sup>9</sup>, members of the NK family of innate immune receptors, Ly49 and Kir1 <sup>10,11</sup>, and immunoreceptors associated to the signaling adaptor protein CD3 $\zeta$  <sup>6,12</sup>. Mice lacking CD3 $\zeta$  phenocopied the abnormalities in synaptic plasticity and in the axonal refinement of retinal ganglion cells observed in mice functionally deficient for MHC I, suggesting that these MHC I-induced effects are mediated through CD3 $\zeta$  signaling <sup>6</sup>. The regulation of neuronal connectivity achieved by CD3 $\zeta$  is associated to a prominent action on neuronal morphology, particularly in dendrite shaping. In the retina of CD3 $\zeta$ -deficient mice, retinal ganglion cells have a reduced dendritic motility and an increased dendritic arborization complexity <sup>13</sup>. In hippocampal cultured neurons, activation or knock-down of CD3 $\zeta$  respectively inhibits or promotes dendritic growth and branching <sup>12</sup>. While the aforementioned studies indicate that neuronal CD3 $\zeta$  regulate dendrite formation and maturation, the early expression of CD3 $\zeta$  in immature neurons, before dendrite development, and even before the emergence of the first neurites <sup>12</sup> suggested a potential role of CD3 $\zeta$  in early steps of neuronal differentiation. Yet, this possibility has not been examined. Considering that the immune and nervous system share molecular mechanisms

underlying developmental processes, including cell migration and differentiation <sup>1</sup>, the reported involvement of CD3 $\zeta$  in intrathymic T cell differentiation <sup>14</sup> supports the hypothesis of a mirrored function of CD3 $\zeta$  in neural cell differentiation. Furthermore, neural precursor cell (NPC) proliferation and neurogenesis are markedly altered in immune deficient-mice <sup>15-17</sup> strongly suggesting that immune-mediated mechanisms might regulate various aspect of neuronal differentiation and maturation in the CNS.

In this study, we tested the hypothesis that CD3 $\zeta$  might be involved in the early steps of neuronal specification and differentiation. Our results ruled out for a role of CD3 $\zeta$  in neurogenesis but showed its involvement in the initial steps of filopodia and neurite sprouting through a Rho-GEF Vav2 pathway. This study unravels a novel mechanism for early neuronal shaping by the immune adaptor protein CD3 $\zeta$ .

## RESULTS

**In embryonic rat brain, CD3 $\zeta$  is absent from proliferative zones, but conspicuously expressed in postmitotic neurons.**

The distribution of CD3 $\zeta$  immunoreactivity was studied in embryonic rat brain sections by immunofluorescence during the neurogenic period E15-E16. A widespread CD3 $\zeta$  immunoreactivity was observed throughout brain axis with high level in the anlage of the olfactory bulb, cerebral cortex, hippocampal formation, hypothalamus, midbrain, pons and medulla. Moderate to weak CD3 $\zeta$  staining was also detected in the cerebellum and basal ganglia. Sections from the cerebral cortex and hippocampus of E16 animals costained for CD3 $\zeta$  and Ki67, a marker of dividing cells, indicated that CD3 $\zeta$  was excluded from the proliferative ventricular zone (VZ), demonstrating the lack of CD3 $\zeta$  expression in proliferative NPCs (Fig. 1A,B). By contrast, extensive colocalization of CD3 $\zeta$  immunoreactivity with the neuronal nuclear antigen A60 (Neun) or  $\beta$ 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), the mesencephalon and the anlage of the olfactory bulb (Fig. 1E) indicating that CD3 $\zeta$ -expressing cells were mostly postmitotic neurons. Interestingly, CD3 $\zeta$  staining was not only observed in postmitotic neurons that have arrested their migration, such as those located in the cortical plate, corresponding to the outer layer of the cerebral cortex. CD3 $\zeta$ -immunoreactive cells were also detected in the intermediate zone which contains neuronal cells in the course of their migration outward the VZ toward the cortical plate (Fig. 1A). These cells are produced shortly after the last mitotic divisions of precursor cells suggesting that CD3 $\zeta$  expression started either during or shortly after neuronal commitment. To discriminate between these two possibilities, we set out an in vitro model of neurosphere-derived neural cells to precisely study CD3 $\zeta$  expression during neurogenesis and to determine the effect of CD3 $\zeta$  expression on NPCs differentiation.

**Selective expression of CD3 $\zeta$  in newly-born neurons derived from NPCs.**

Rat NPCs were grown as neurospheres, a free-floating cellular aggregate formed of proliferative multipotent cells that produce neuronal and glial cells under appropriate differentiating conditions<sup>18</sup>. The phenotype of CD3 $\zeta$ -expressing cells was analyzed in dissociated neurospheres at 2h of differentiation, the earliest time point for which newly-generated neurons and glia were detected. Cells were double immunolabeled for CD3 $\zeta$  and nestin (undifferentiated NPCs), GFAP (astrocytes), RIP (oligodendrocytes) or Tuj1 (neurons). We found that 90.3  $\pm$  3.3% of CD3 $\zeta$ -expressing cells were immunopositive for Tuj1 while the remaining 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 $\zeta$ . Thus, as observed in vivo in E15-E16 rat brain, CD3 $\zeta$  was mainly expressed by newly-born neurons. At this precocious stage of NPCs 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 a first sign of morphological polarization exemplified by a short lamellipodial protrusion (Fig. 2A, 3C). To determine whether one of those two classes of Tuj1-positive cells preferentially expressed CD3 $\zeta$ , the number of Tuj1<sup>+</sup>/CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> and Tuj1<sup>+</sup>/CD3 $\zeta$ <sup>-</sup> cells that exhibited or not a short emerging extension was quantified (Fig. 2B). Among the Tuj1-positive round cells, 82.5  $\pm$  4.8% of them were immunopositive for CD3 $\zeta$  while 17.5  $\pm$  4.8% were devoid of CD3 $\zeta$ . The presence of this latter population suggests that Tuj1 expression, and therefore neuronal commitment, shortly preceded CD3 $\zeta$  expression. Among the Tuj1-positive cells exhibiting a short protrusion, almost all of them were also immunopositive for CD3 $\zeta$  (98.4  $\pm$  1.5%), suggesting that CD3 $\zeta$  expression started as soon as neurons entered the morphological polarization program. To further study the relationships between CD3 $\zeta$  expression and neuronal cell-fate decision, CD3 $\zeta$  overexpression was induced in NPCs to analyze the effect on neurogenesis. Neurospheres cultures were prepared from mouse instead of rat embryos because higher transfection efficiency was obtained in mouse cells. Forced CD3 $\zeta$  expression was achieved in mouse dissociated neurospheres by transfection with CD3 $\zeta$ -EGFP and the number of

Tuj1-positive neurons was quantified at 3 days of differentiation. Control conditions consisted in neurospheres transfected with a membrane-associated form of GFP (mGFP). Transfection of NPCs with CD3 $\zeta$ -EGFP severely impaired neuron production as compared to control mGFP-transfected cells (Fig. 2C). Nontransfected cells grown on the same coverslips were not affected and developed normally in neurons, indicating a cell autonomous effect of CD3 $\zeta$ -EGFP expression (Fig. 2C). The lack of neuronal cells observed upon CD3 $\zeta$  expression in NPCs might result from the inability of NPC-expressing CD3 $\zeta$  to produce neurons. Alternatively, it could also result from either a failure in maintaining a Tuj1 phenotype up to 3 days in vitro (DIV) or a delay in triggering the neuronal differentiation program. To respectively test these two hypotheses, the number CD3 $\zeta$ -expressing NPCs-derived neurons were analyzed at shorter (1 day) and longer time of differentiation (5 days). Similarly as observed at 3 days of differentiation, the amount of Tuj1<sup>+</sup> neurons was strongly reduced at 1 and 5 days of differentiation (Fig. 2D), suggesting that the deficiency of CD3 $\zeta$ -expressing NPCs to generate neuronal cells was independent on the duration of culture. We next assessed whether expression of CD3 $\zeta$ -EGFP would affect neuronal survival. To address this possibility, we used a neuronal culture model prepared from E18 rat brain. This model, constituted of postmitotic neurons, enabled to overcome the potential influence of CD3 $\zeta$  on neurogenesis and therefore to accurately study the effect of CD3 $\zeta$  on neuronal survival. Neurons freshly dissociated were transfected with mGFP or CD3 $\zeta$ -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 $\zeta$ -transfected neurons whatever the time of culture, suggesting that overexpression of CD3 $\zeta$  had no significant effect on neuronal survival (Fig. 2E). Altogether, these data showed that CD3 $\zeta$  was rarely expressed by NPCs and that its forced expression inhibits neuronal cell-fate decision.

### **CD3 $\zeta$ accumulation correlates with neurite emergence from the neuronal cell body**

We found a predominant expression of CD3 $\zeta$  in postmitotic newly-born neurons. To analyze the cellular distribution of endogenous CD3 $\zeta$  shortly after neuron birth, we used cultures of rat NPCs to achieve in vitro neuronal differentiation. Soon after NPCs plating, CD3 $\zeta$  immunoreactivity was associated to round and smooth Tuj1-positive cells. In these cells, CD3 $\zeta$  was distributed in hot spots and stretches at the cell periphery, delimitating at the cell surface several zones highly enriched in CD3 $\zeta$  proteins (Fig. 3A). When a bud appeared at one site of the cell, CD3 $\zeta$  immunoreactivity was frequently polarized toward this nascent protrusion (Fig. 3B,C). Few hours later, at 6h post-differentiation, many neurons emitted between 2 and 5 neurites that were highly labeled at their tips for CD3 $\zeta$  immunoreactivity similarly as described for neuronal cultures derived from rat neuroblasts (Fig. 3D) <sup>12</sup>. Interestingly, CD3 $\zeta$  accumulation overlapped with cytoskeleton actin-rich region as revealed by Alexa 568-phalloidin labeling, even when none process had yet formed (Fig. 3E,F). One hypothesis that arises from these observations is that CD3 $\zeta$  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 brain transfected with CD3 $\zeta$ -EGFP to simultaneously follow the distribution of the fluorescent proteins and neurite extension. Control experiments consisted in cells transfected with mGFP or EGFP. Sixty minutes after plating, cells were imaged every 5 minutes for 6 hours (Fig. 4). We quantified the number of newly-formed neurites for which a CD3 $\zeta$ -EGFP aggregation was noted or not at the site of emergence, prior neurite outgrowth. We found a transient clustering of CD3 $\zeta$ -EGFP matching the site of neurite emergence for  $64.6 \pm 10.3\%$  of neurites formed during the recording (Fig. 4A,B,E). CD3 $\zeta$ -EGFP aggregation first appeared  $42.4 \pm 6.8$  min before neurite extension, lasted for  $31.5 \pm 5.8$  min and was no more detected as a large cluster bordering the cell body  $10.3 \pm 2.8$  min before process outgrowth. During these last ten minutes, CD3 $\zeta$ -EGFP was frequently associated with filopodia extending and retracting rapidly before the initiation of

neurite outgrowth. As soon as the neurite was formed, CD3 $\zeta$ -EGFP rapidly concentrated at the tip of the neurite, as observed for endogenous CD3 $\zeta$  (Fig. 4A) <sup>12</sup>. 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 emergence ( $5.7 \pm 3.2\%$ ; Fig. 4C,D,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. 4 E).

### **CD3 $\zeta$ -EGFP stimulates filopodia formation through a Vav2 pathway**

To study the impact of CD3 $\zeta$ -EGFP aggregation on the first steps of neurite outgrowth, neurons freshly dissociated from E18 rat brain embryos were transfected with CD3 $\zeta$ -EGFP or the control EGFP vector, plated and fixed 24h latter for morphology analysis. Classically at this stage of culture, hippocampal neurons have developed 1 to 5 minor neurites that displayed fine filopodial protrusions <sup>19</sup> as we observed in the present study. Neurites are defined as processes that are more than 0.5  $\mu\text{m}$  in width and are usually tipped by a growth cone. Filopodia are less developed protrusions with a thinner width than neurites ( $<0.5 \mu\text{m}$ ), and show no growth cone at their tip. The most striking effect induced by CD3 $\zeta$ -EGFP was the presence of numerous neurons exhibited an unusual high density of filopodia directly emerging from the cell body, a pattern that was infrequently observed in control EGFP-expressing cells at this stage of culture (Fig. 5 A,B). Quantification indicated that  $10.4 \pm 2.1\%$  of EGFP-transfected cells and  $41.5 \pm 4.1\%$  of CD3 $\zeta$ -EGFP-transfected cells exhibited this filopodial pattern (Fig. 5 E). In addition, CD3 $\zeta$ -EGFP expression increased the proportion of neurons containing only one neurite at the expense of those containing 4 to 5 neurites as compared to EGFP-expressing neurons (Fig. 5 F). This finding suggests that CD3 $\zeta$  promoted a profuse filopodia formation in young hippocampal neurons that delayed neurite emergence. Both filopodia and neurite emergence typically require actin cytoskeleton rearrangements

that are highly regulated by small GTPases of the Rho superfamily<sup>20</sup>. Functional interactions between CD3 $\zeta$  and Rho activity mediated-actin cytoskeleton reorganization have been reported in T cells. Upon binding of MHC-peptide complex to the T Cell Receptor TCR, CD3 $\zeta$  activation induces the phosphorylation of the protein tyrosine kinases Syk/ZAP-70 which in turn serve as a docking protein to recruit signaling molecules, including the Vav family of the guanine-nucleotide exchange factor (GEF) for Rho GTPases<sup>21</sup>. Vav activation in T cells participates to the cytoskeletal reorganization at the immunological synapse and to the clustering of adhesion molecules and receptors<sup>22,23</sup>. While Vav1 was restricted to the hematopoietic system, Vav2 and 3 were more ubiquitously expressed, with Vav2 being notably expressed in neurons<sup>24,25</sup>. We thus examined whether Vav2 participates in the formation of filopodia induced by CD3 $\zeta$ . Freshly dissociated neuroblasts were cotransfected with CD3 $\zeta$ -EGFP and either wild-type Vav2 (Vav2-WT) or a dominant-negative mutant of Vav2 (Vav2-DN), in which Leu212 was replaced by Gln<sup>26</sup>. Forced expression of Vav2-DN, but not that of Vav2-WT, prevented the increase of filopodia formation (Fig.5 C-C', D-D', E). By contrast, Vav2-DN did not prevent the CD3 $\zeta$ -EGFP-dependent effect on primary neurite number (not shown). Thus Vav2 likely acted downstream of CD3 $\zeta$  to regulate filopodia formation but was not required in the control of the number of primary neurite appearance from the cell body.

To directly assess the role of CD3 $\zeta$  in neurite emergence, we examined the morphology of cultured hippocampal neurons lacking functional CD3 $\zeta$ . Hippocampal neurons were isolated from E17 mice bearing a targeted mutation in the CD3 $\zeta$  gene encoding for a nonfunctional truncated CD3 $\zeta$ <sup>14</sup> or wild-type (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. While WT and CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> neurons were both competent to form neurites, their morphological profile was different. Neurites from CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> neurons displayed

less filopodial extension along their length than WT neurons (Fig. 5 G,H). In addition, the proportion of neurons with 4 to 5 neurites was enhanced in CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> as compared to WT neurons (Fig. 5 G,H). These data suggest that the lack of CD3 $\zeta$  in hippocampal neurons limits the sprouting of filopodia along neurite shaft causing an acceleration of neurite emergence.

## DISCUSSION

Recent studies have highlighted the key role of CD3 $\zeta$  in the activity-dependent maturation of neuronal circuit in the CNS by regulating dendritic arbor<sup>12,6,13</sup>. Here we show that this immune protein also exhibits an early function on the first stages of neuronal differentiation, upstream of axonal and dendritic formation. Specifically, our data show that CD3 $\zeta$  is absent from multipotent progenitor cells but readily detected in newly-born neurons. In these latter, before neurite extension, CD3 $\zeta$  is distributed in actin-rich hot spots at the cell periphery, matching the initiation site of the future neurite. Overexpression of CD3 $\zeta$  stimulated the formation of filopodia extending from the cell body via a Rho-GEF Vav2 pathway, and restrained neurite emergence. Conversely, cultured neurons lacking CD3 $\zeta$  isolated from CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> mice resulted in a decreased number of filopodia and an enhanced neurite number. Altogether, our data suggest that CD3 $\zeta$  acts as a brake signal in neurite emergence and that an underlying mechanism may involve the activating Rho GEF Vav2 to influence the early specification of neuron morphology.

### **Lack of CD3 $\zeta$ expression in neural progenitor cells but early expression in newly-born neurons**

Our study showed a lack of CD3 $\zeta$  protein expression in proliferative areas of E15-E16 embryonic rat brain but an abundant and selective expression in postmitotic neurons located in the intermediate and marginal zone of the cerebral cortex, hippocampus and the anlage of olfactory bulbs. The presence of CD3 $\zeta$  immunoreactivity in the intermediate zone, lining the surface of the ventricular zone, raised the possibility that CD3 $\zeta$  expression might start during the last mitotic divisions of the precursor cells and could therefore contribute to the engagement of NPCs toward the neuronal lineage. Several compelling evidences argued against this hypothesis. First, in the neurosphere culture model, CD3 $\zeta$  immunoreactivity was mostly absent in undifferentiated nestin-positive cells but largely detected in newly-born neurons, as shown by the concomitant expression of CD3 $\zeta$  with the early neuronal marker

Tuj1. Second, if CD3 $\zeta$  expression would occur at proliferative stages to support neuronal commitment, then increasing the level of CD3 $\zeta$  expression in NPCs would favor their engagement toward a neuronal phenotype. Forced expression of CD3 $\zeta$ -EGFP by transfection of NPC-derived neurospheres induced exactly the opposite, i.e. a robust blockade of neuronal commitment. These data are in line with the observation that CD3 $\zeta$  was not endogenously expressed by NPCs but only after their engagement to the neuronal lineage.

#### **Role of CD3 $\zeta$ in early steps of neuritogenesis**

We found in the neurosphere culture model that CD3 $\zeta$  was detected as soon as neural progenitor cells had differentiated into neurons, defined for their Tuj1 phenotype. At this stage, a large proportion of newly-born neurons were still spherical and showed no sign of morphological polarization. However, the distribution of CD3 $\zeta$  was already highly polarized, distributed in several hot spots which 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<sup>20</sup>. Time-lapse imaging of CD3 $\zeta$ -EGFP-expressing neurons indicated that CD3 $\zeta$  accumulation at one site of the cell preceded the subsequent neurite emergence at the same site, suggesting the involvement of CD3 $\zeta$  in neurite initiation. The fact that CD3 $\zeta$ -EGFP aggregates dispersed a few minutes before neurite extension to accumulate at the tips of nearby newly formed filopodia indicated that CD3 $\zeta$  did not represent the neuritogenesis start signal per se, but likely contributed to the initial recruitment of signaling molecules required for filopodia formation, a process that would subsequently impact on neurite initiation. Accordingly, we found that overexpression of CD3 $\zeta$ -EGFP at early developmental stages of hippocampal neurons promoted filopodia formation while the lack of CD3 $\zeta$  in CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> cultured neurons reduced filopodia extension from neurite shaft. 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<sup>26,27</sup>. We found that inhibition of the GEF Vav2 prevented the promotion of filopodial formation induced by CD3 $\zeta$ . Vav2 activates Rho, Rac and Cdc42 as a result of tyrosine phosphorylation by the protein tyrosine kinases Syk/Zap-70 or c-Src<sup>26,28</sup>. In the CNS, Vav2 has been shown to be expressed in differentiating neuroblasts of the rostral migratory stream<sup>24</sup> and to be involved in several developmental processes such as axon guidance and dendritic development<sup>25,29</sup>. Our results suggest that Vav2 participates in the stimulatory effect of CD3 $\zeta$  on filopodia formation in young hippocampal neurons. The colocalization of CD3 $\zeta$  with F-actin staining supports the notion that CD3 $\zeta$  may couple extracellular signal with actin cytoskeleton rearrangement through a Vav2 pathway to regulate filopodia formation.

We observed that overexpression of CD3 $\zeta$  promoted filopodia formation but repressed neurite emergence. Conversely, CD3 $\zeta$ -/- hippocampal neurons showed a reduced filopodia extension and an increased neurite number. Thus, CD3 $\zeta$ -induced facilitation of filopodia formation coincided with a reduction in neurite emergence. In more mature neurons, WT and CD3 $\zeta$ -deficient neurons showed similar number of primary dendrites<sup>12,13</sup>, suggesting that CD3 $\zeta$  delayed neurite emergence in young neurons without affecting the final number of dendrites. During the critical stage of filopodia to dendritic spine transition, both accelerator and brake molecules physiologically regulate this process. While accelerators such as Syndecan-2 enhance filopodia formation and further accelerate spine maturation<sup>30,31</sup>, molecular brakes, such as Telencephalin, not only induce but also maintain dendritic filopodia, thus slowing spine maturation<sup>32</sup>. Similarly, though at an earlier differentiation stage, CD3 $\zeta$  might operate as a molecular brake in newly-born neurons by promoting filopodia extension that in turn would delay neurite elongation and maturation. Altogether, our findings provide evidences for an unrecognized contribution of immune-molecule-mediated signalling pathway in early neuronal morphogenesis.

## **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 St 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, pH 7.4 (PB) overnight à 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, 10% sucrose in PB for 1h at 37°C. They were then embedded in a block of the same solution for 1h at 4°C. Brains were frozen in liquid isopentane at -70°C and stored at -80°C until sectioning. Coronal sections (10µm of thickness) were cut on a cryostat, collected on Superfrost plus slides (Microm Microtech, Francheville, France) and processed for immunofluorescence.

### **Plasmid constructs**

The plasmid encoding rat CD3ζ fused at the C terminus with EGFP (Invitrogen) was produced as previously described<sup>12</sup>. A membrane-associated form of GFP (mGFP) was produced by addition of the GAP43 membrane anchoring signal as previously described<sup>33</sup>. 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<sup>26</sup>.

### **Cell cultures**

Culture of NPCs and transfection. Cultures of NPCs from E15 Sprague-Dawley rat brain were established as previously described <sup>34</sup>. 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 10µg/ml of DNase I prior to mechanical trituration. Agregates 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, 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, 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  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> on poly-L-ornithine-coated coverslips (50µg/ml, Sigma) in serum-supplemented medium for 2h. 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=200-1000 cells following specific immunolabelings for each cell type (see below). For transfection experiments, NPCs 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,  $5 \times 10^6$  cells were transfected by nucleofection using 100µl of the nucleofactor solution (Amaxa Biosystems) with 4µg of plasmid encoding CD3ζ-EGFP, mGFP or EGFP. Cells were subsequently plated at  $2.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> on poly-L-ornithine-coated coverslips in serum-supplemented medium o/n and remained for 1, 3 or 5 days in the serum-free medium

supplemented with N2. Cells were then fixed with 4% PFA for 15 min at room temperature (RT) and labeled by immunofluorescence.

*Culture of hippocampal neurons and transfection.* 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  $35 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 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 24h before the neuron culture. Rat hippocampal culture was prepared from 18-day-old rat embryos by previously described methods<sup>35</sup>. Hippocampi were dissected and enzymatically dissociated with trypsin and mechanical trituration. Cells were plated at  $4 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> on glass coverslips coated with poly-L-lysine (1mg/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 1mM sodium pyruvate. Cells were transferred 3h 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 nonfunctional truncated CD3ζ gene (CD3ζ<sup>-/-</sup> mice)<sup>14</sup> or wild-type (WT) littermate mice. Animals were maintained as heterozygotes on a C57BL/6 background and embryos were genotyped by PCR amplification as described previously<sup>14</sup>. For transfection of rat neurons, dissociated cells ( $3.5 \times 10^5$ ) were mixed with 3µg of either CD3ζ-EGFP, mGFP or EGFP and 3µl 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  $40 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> on glass coverslips as described above. Neurons were fixed at the indicated time in 4% PFA, 4% sucrose in phosphate buffered saline (PBS) for 15 min.

## **Immunostaining**

Brain sections. Sections were permeabilized for 30 min at 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 CD3 $\zeta$  antibody (Spring Bioscience, 0.2  $\mu$ g/ml) and either  $\beta$ III-tubulin (Tuj1, clone SDL.3D10, Sigma, 2.1 $\mu$ g/ml), neuronal nuclear antigen A60 (NeuN, clone A60, Chemicon, 5 $\mu$ g/ml) or Ki67 antigen (Ki67, clone B56, Pharmingen, 0.5 $\mu$ g/ml) antibodies diluted in PBS containing 5% NGS. After 3 washes in PBS, appropriate FITC- or Alexa Fluor568-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) diluted in blocking solution were applied for 90 min at RT. Sections were washed 3 times and nuclear staining was performed with DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 1.6  $\mu$ 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 washings, NPCs were incubated for 30 min at 37°C in PBS containing 10% BSA and then overnight at 4°C with CD3 $\zeta$  antibody (1  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml) for astrocytes, anti-RIP (Developmental Studies Hybridoma Bank, 7.6  $\mu$ g/ml) for oligodendrocytes, Tuj1 (clone SDL.3D10, Sigma, 2.1  $\mu$ g/ml) for neurons or nestin (clone rat 401, Pharmingen, 1  $\mu$ g/ml) for undifferentiated cells. After washing, cells were incubated for 45 min at 37°C with FITC-conjugated donkey anti-rabbit (7.5  $\mu$ g/ml) and/or Alexa Fluor568-goat anti-mouse (2  $\mu$ g/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 63x 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: myc (clone 9E10, 1 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) and tau (1.7 µg/ml; Dako). 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.

### **Time-lapse fluorescence imaging**

Neuron suspension, transfected with either CD3ζ-EGFP, mGFP or EGFP, was plated at a density of  $80 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in Lab-Tek dishes (Nunc, USA) coated with poly-L-lysine. After 2h 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 CaCl<sub>2</sub> and 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4. Dishes were put in a humid chamber at 32°C placed on an inverted microscope leica DMI6000B (Nanterre). Pictures were acquired for 6 hours every 5 minutes with 40x and 20x objectives using a camera CoolSnap HQ2 (Roper Evry) driven by Metamorph version 7.56 software (Roper Evry). 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.

### **Phenotype analysis of cells derived from NPC cultures**

To determine the proportion of undifferentiated cells, astrocytes, oligodendrocytes, neurons and CD3ζ-expressing cells generated from NPCs at 2 of differentiation, 5 fields of each coverslip were randomly analyzed with a 20X objective. A total of 200-1000 cells were counted from 4 independent experiments and expressed as a percentage of total cells determined by DAPI staining. To analyze the morphology of Tuj1<sup>+</sup>/CD3ζ<sup>-</sup> and Tuj1<sup>+</sup>/CD3ζ<sup>+</sup> 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 150 cells were analyzed from 3 independent experiments and the results were presented as percentage ± SEM. To

determine the number of neurons generated from NPCs transfected with mGFP or CD3 $\zeta$ -EGFP, each coverslip immunostained for Tuj1 was systematically scanned with a 10X lens and each transfected cells (green) was scored as Tuj1-positive or -negative cell. Results were presented as percentage  $\pm$  SEM from 3 to 5 experiments. Data analysis was performed using Excel and GraphPad Prism 4 and statistical analysis were done by Student's *t* test.

#### **Quantification of neuronal survival upon transfection**

To determine the effect of CD3 $\zeta$ -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 2 coverslips from 2 experiments. In each coverslip, the number of cells was recorded in 8 fields randomly chosen with a 20X objective. The same procedure was achieved with mGFP-transfected neurons as control. Results were presented as percentage  $\pm$  SEM. Data analysis was performed using Excel and GraphPad Prism 4 and statistical analysis were done by Student's *t* test.

#### **Neuronal morphology analysis**

The number of primary neurites emerging from the cell body and the number of cells with a high density of filopodia were quantified. Neurites were defined as processes that are more than 0.5  $\mu$ m in width and are usually tipped by a growth cone. Filopodia are less developed protrusions with a thinner width than neurites (<0.5  $\mu$ m), and show no growth cone at their tip<sup>36</sup>. For experiments involving transfection, 20 transfected neurons per coverslip were randomly acquired with a 63x lens and the number of neurites was determined for each cell. Neurons were also scored for their density of filopodia: neurons exhibiting more than 5 filopodia emerging from the cell body were classified as "neurons with high density of filopodia". Analyses were performed in 2 coverslips from 2 to 4 experiments. For WT and CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> mouse cultured neurons, 10 fields per coverslips were randomly chosen with a 40X

objective, and all the neurons present in the selected field were analyzed for their number of neurites exhibiting or not at least 5 filopodia along their length. Data are presented as average  $\pm$  sem from 2 to 3 cultures prepared from different embryos (2 coverslips per culture). Data analysis was performed using Excel and GraphPad Prism 4 and statistical analysis were done by Mann Whitney and Student's *t* test. Images were processed and prepared for printing using Adobe Photoshop.

## TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

**Fig. 1. Distribution of CD3 $\zeta$  immunoreactivity in embryonic rat brain.** In the cerebral cortex (A-A'') and hippocampus (B-B'') of E16 rat embryo, CD3 $\zeta$  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 brain with CD3 $\zeta$  antibody and the neuronal markers Tuj1 (C-C'') and NeuN (D-D'') indicated that CD3 $\zeta$  is restricted to postmitotic neurons. In the anlage of the olfactory bulbs, CD3 $\zeta$  immunoreactivity largely overlaps with Tuj1-labeled neuronal cell bodies (E-E''). Cell nuclei are labeled with DAPI (blue). CP: cortical plate, IZ: intermediate zone, MZ: marginal zone, SP: subplate, VZ: ventricular zone. Scale bar, 150  $\mu$ m.

**Fig. 2. CD3 $\zeta$  is selectively expressed by newly-born neurons and prevents neurogenesis when overexpressed in NPCs.**

(A) Phenotype analysis of CD3 $\zeta$ -expressing cells derived from rat NPCs. Dissociated neurospheres plated on glass coverslips were fixed after 2h of differentiation for double immunolabelings of CD3 $\zeta$  (green) with the markers (red) of undifferentiated cells (nestin), neurons (Tuj1), oligodendrocytes (RIP) and astrocytes (GFAP). Cell nuclei are labeled with DAPI. The histogram shows the distribution of CD3 $\zeta$ -expressing cells among the different cell types. Data are presented as percentage of total CD3 $\zeta$ -expressing cells  $\pm$  SEM of 193 cells from 4 experiments. (B) Quantification of the number of CD3 $\zeta$ <sup>+</sup> and CD3 $\zeta$ <sup>-</sup> cells among the Tuj1<sup>+</sup> cell population exhibiting either a round shape or a protrusion at 2h of NPCs differentiation. For each group, data are presented as percentage of total Tuj1<sup>+</sup> cells  $\pm$  SEM of 50-105 cells analyzed from 3 independent experiments. (C) Mouse dissociated NPCs transfected with mGFP or CD3 $\zeta$ -EGFP (green) were allowed to differentiate for 3 days and immunolabeled for Tuj1 (red). While numerous mGFP-transfected NPCs produced neurons (small arrow and left histogram), almost none CD3 $\zeta$ -EGFP-transfected NPCs developed in

neurons. Nontransfected cells grown on the same coverslips were not affected and developed normally in neurons (large arrows and right histogram). Data are presented as percentage of Tuj1<sup>+</sup> cells relative to control mGFP transfection  $\pm$  SEM from 2 coverslips analyzed from 3 to 4 experiments. \*\* $p < 0.01$  (Student's t test) compared to NPCs mGFP transfection. (D) Mouse dissociated NPCs transfected with mGFP or CD3 $\zeta$ -EGFP (green) were allowed to differentiate for 1, 3 and 5 days and were immunolabeled for Tuj1. The number of Tuj1-positive cells was quantified at each timepoint. Data are presented as percentage of Tuj1<sup>+</sup> cells at 1 day of differentiation relative to control mGFP transfection  $\pm$  SEM from 2 coverslips analyzed from 3 experiments. \*\* $p < 0.01$  (Student's t test) compared to NPCs mGFP transfection. (E) 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 $\zeta$ -EGFP-transfected neurons. Data are presented as percentage of total mGFP transfected neurons at 0 DIV  $\pm$  SEM of 40-100 cells analyzed from 2 experiments.

Scale bar, 30  $\mu$ m.

**Fig. 3. Distribution of CD3 $\zeta$  immunoreactivity in newly-born neurons derived from rat NPCs.** (A-D'') Double immunolabeling of CD3 $\zeta$  (green) and the neuronal marker Tuj1 (red) after 2h (A-C'') and 6h (D-D'') of differentiation. Cell nuclei are labeled with DAPI. (a, b, c,d) Magnification of the boxed area in A'', B'', C'' and D''. In spherical newly-born neurons, CD3 $\zeta$  immunoreactivity is distributed in hot spots and patches at the cell periphery (A-A'', a). When the neuronal sphere is broken, CD3 $\zeta$  immunoreactivity is concentrated at initial budding (B-B'', b) and protrusions (C-C'', c). During neurite growth, CD3 $\zeta$  immunoreactivity redistributes to concentrate at or close to the neurite tip (D-D'',d). (E,F) Cells derived from cultured NPCs were labeled after 2h of differentiation for CD3 $\zeta$  (green) and with Alexa Fluor-568-conjugated phalloidin (red) to visualize F-actin-rich regions. Colocalization between

CD3 $\zeta$  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, 10  $\mu$ m .

**Fig. 4. CD3 $\zeta$  accumulation correlates with neurite emergence from neuronal cell body.**

Time-lapse recording performed immediately after plating of CD3 $\zeta$ -EGFP-transfected (A, B) or mGFP-transfected neurons as control (C, D). (A) CD3 $\zeta$ -EGFP selectively accumulates in a pole of the cell from which a neurite subsequently emerges (arrow). (B) Quantification of the fluorescence intensity of CD3 $\zeta$ -EGFP measured at sites with (black line) and without (grey line) neurite emergence in 3 representative cells. The fluorescence intensity of CD3 $\zeta$ -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). (D) Quantification of the fluorescence intensity of mGFP measured at sites with (black line) and without (grey line) neurite emergence in 2 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 12-16 cells analyzed from 2 experiments. \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t test) for CD3 $\zeta$ -EGFP vs mGFP-transfected neurons. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Fig. 5. CD3 $\zeta$  promotes filopodia formation via a Vav2 signaling but repressed neurite extension.**

(A-D') Dissociated neuroblasts were transfected with either EGFP (A), CD3 $\zeta$ -EGFP (B), EGFP and myc-Vav2-DN (C,C') or CD3 $\zeta$ -EGFP and myc-Vav2-DN (D,D'). Neurons were fixed 24h after the transfection and stained with a myc antibody to visualize myc-Vav2 proteins. (E) Quantification of the number of transfected cells with a high density of filopodia. Data were expressed as a percentage of total transfected cells  $\pm$  SEM of 100-200 cells from

2 to 3 experiments. ###  $p < 0.001$  (Student's t test) for CD3 $\zeta$ -EGFP vs EGFP; \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  for Vav2-DN vs control or Vav2-WT. (F) Quantification of the number of cells with 1, 2-3 or 4-5 neurites expressed as percentage total transfected cells with neurites  $\pm$  SEM of 86-114 cells from 2 to 3 experiments. \* $p < 0.05$  (Student's t test) compared to control EGFP-transfected neurons. (G) Cultured hippocampal neurons from WT or CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> mouse at 1 DIV immunostained for tau showed a decreased in filopodia extension along neurite length and an increase in neurite number emerging from the cell body in CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> neurons. (H) Quantification of the number of neurites with >5 filopodia expressed as percentage of total neurites (61-102 neurites), and of the number of cells containing 1, 2-3 or 4-5 neurites expressed as percentage of total cells (80-170 cells) from 2 to 3 experiments. \* $p < 0.05$  (Student's t test) compared to control WT neurons. Scale bar, 7 $\mu$ m

**Fig. 6: Schematic representation showing how CD3 $\zeta$  may impact on neuronal commitment and neurite initiation.**

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Pr. JP Souillou and Dr. I Anegon for their support. We thank R. Thnard for expert technical assistance and P. Hulin (PiCell, IFR26, Nantes) for expert assistance in live cell imaging. We also thank Drs. K. Moriyoshi and Y Takai for kindly providing cDNAs. This work was supported by INSERM, Fondation Progreffe, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (to HB, PD and CB), Association pour la Recherche sur le Cancer (to PD and ZC) and by a INSERM/Région Pays de la Loire doctoral fellowship (to SJB).

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Kioussis, D and Pachnis, V, (2009) Immune and nervous systems: more than just a superficial similarity? *Immunity* 31: 705-10.
2. McAllister, AK and van de Water, J, (2009) Breaking boundaries in neural-immune interactions. *Neuron* 64: 9-12.
3. Boulanger, LM and Shatz, CJ, (2004) Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 5: 521-31.
4. Thams, S, Oliveira, A and Cullheim, S, (2008) MHC class I expression and synaptic plasticity after nerve lesion. *Brain Res Rev* 57: 265-9.
5. Goddard, CA, Butts, DA and Shatz, CJ, (2007) Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6828-33.
6. Huh, GS, Boulanger, LM, Du, H, Riquelme, PA, Brotz, TM and Shatz, CJ, (2000) Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290: 2155-9.
7. McConnell, MJ, Huang, YH, Datwani, A and Shatz, CJ, (2009) H2-K(b) and H2-D(b) regulate cerebellar long-term depression and limit motor learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6784-9.
8. Datwani, A, McConnell, MJ, Kanold, PO, Micheva, KD, Busse, B, Shamloo, M et al., (2009) Classical MHCI molecules regulate retinogeniculate refinement and limit ocular dominance plasticity. *Neuron* 64: 463-70.
9. Syken, J, Grandpre, T, Kanold, PO and Shatz, CJ, (2006) PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science* 313: 1795-800.
10. Bryceson, YT, Foster, JA, Kuppusamy, SP, Herkenham, M and Long, EO, (2005) Expression of a killer cell receptor-like gene in plastic regions of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 161: 177-82.
11. Zohar, O, Reiter, Y, Bennink, JR, Lev, A, Cavallaro, S, Paratore, S et al., (2008) Cutting edge: MHC class I-Ly49 interaction regulates neuronal function. *J Immunol* 180: 6447-51.
12. Baudouin, SJ, Angibaud, J, Loussouarn, G, Bonnamain, V, Matsuura, A, Kinebuchi, M et al., (2008) The signaling adaptor protein CD3zeta is a negative regulator of dendrite development in young neurons. *Mol Biol Cell* 19: 2444-56.
13. Xu, HP, Chen, H, Ding, Q, Xie, ZH, Chen, L, Diao, L et al., (2008) The immune protein CD3zeta is required for normal development of neural circuits in the retina. *Neuron* 65: 503-15.
14. Malissen, M, Gillet, A, Rocha, B, Trucy, J, Vivier, E, Boyer, C et al., (1993) T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *Embo J* 12: 4347-55.
15. Lathia, JD, Okun, E, Tang, SC, Griffioen, K, Cheng, A, Mughal, MR et al., (2008) Toll-like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurosci* 28: 13978-84.
16. Rolls, A, Shechter, R, London, A, Ziv, Y, Ronen, A, Levy, R et al., (2007) Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 9: 1081-8.
17. Ziv, Y, Ron, N, Butovsky, O, Landa, G, Sudai, E, Greenberg, N et al., (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9: 268-75.
18. Reynolds, BA and Weiss, S, (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-10.
19. Dotti, CG, Sullivan, CA and Banker, GA, (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8: 1454-68.
20. da Silva, JS and Dotti, CG, (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci* 3: 694-704.

21. Raab, M, da Silva, AJ, Findell, PR and Rudd, CE, (1997) Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* 6: 155-64.
22. Fischer, KD, Kong, YY, Nishina, H, Tedford, K, Marengere, LE, Kozieradzki, I et al., (1998) Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* 8: 554-62.
23. Tybulewicz, VL, (2005) Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* 17: 267-74.
24. Chauvet, N, Prieto, M, Fabre, C, Noren, NK 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: 467-86.
25. Cowan, CW, Shao, YR, Sahin, M, Shamah, SM, Lin, MZ, Greer, PL et al., (2005) Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron* 46: 205-17.
26. Kawakatsu, T, Ogita, H, Fukuhara, T, Fukuyama, T, Minami, Y, Shimizu, K et al., (2005) Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *J Biol Chem* 280: 4940-7.
27. Van Aelst, L and Cline, HT, (2004) Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr Opin Neurobiol* 14: 297-304.
28. Abe, K, Rossman, KL, Liu, B, Ritola, KD, Chiang, D, Campbell, SL et al., (2000) Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J Biol Chem* 275: 10141-9.
29. Murata, T, Ohnishi, H, Okazawa, H, Murata, Y, Kusakari, S, Hayashi, Y et al., (2006) CD47 promotes neuronal development through Src- and FRG/Vav2-mediated activation of Rac and Cdc42. *J Neurosci* 26: 12397-407.
30. Ethell, IM and Yamaguchi, Y, (1999) Cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 induces the maturation of dendritic spines in rat hippocampal neurons. *J Cell Biol* 144: 575-86.
31. Lin, YL, Lei, YT, Hong, CJ and Hsueh, YP, (2007) Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *J Cell Biol* 177: 829-41.
32. Matsuno, H, Okabe, S, Mishina, M, Yanagida, T, Mori, K and Yoshihara, Y, (2006) Telencephalin slows spine maturation. *J Neurosci* 26: 1776-86.
33. Moriyoshi, K, Richards, LJ, Akazawa, C, O'Leary, DD and Nakanishi, S, (1996) Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron* 16: 255-60.
34. Sergent-Tanguy, S, Chagneau, C, Neveu, I and Naveilhan, P, (2003) Fluorescent activated cell sorting (FACS): a rapid and reliable method to estimate the number of neurons in a mixed population. *J Neurosci Methods* 129: 73-9.
35. Kaech, S and Banker, G, (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1: 2406-15.
36. Dehmelt, L and Halpain, S, (2004) Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol* 58: 18-33.

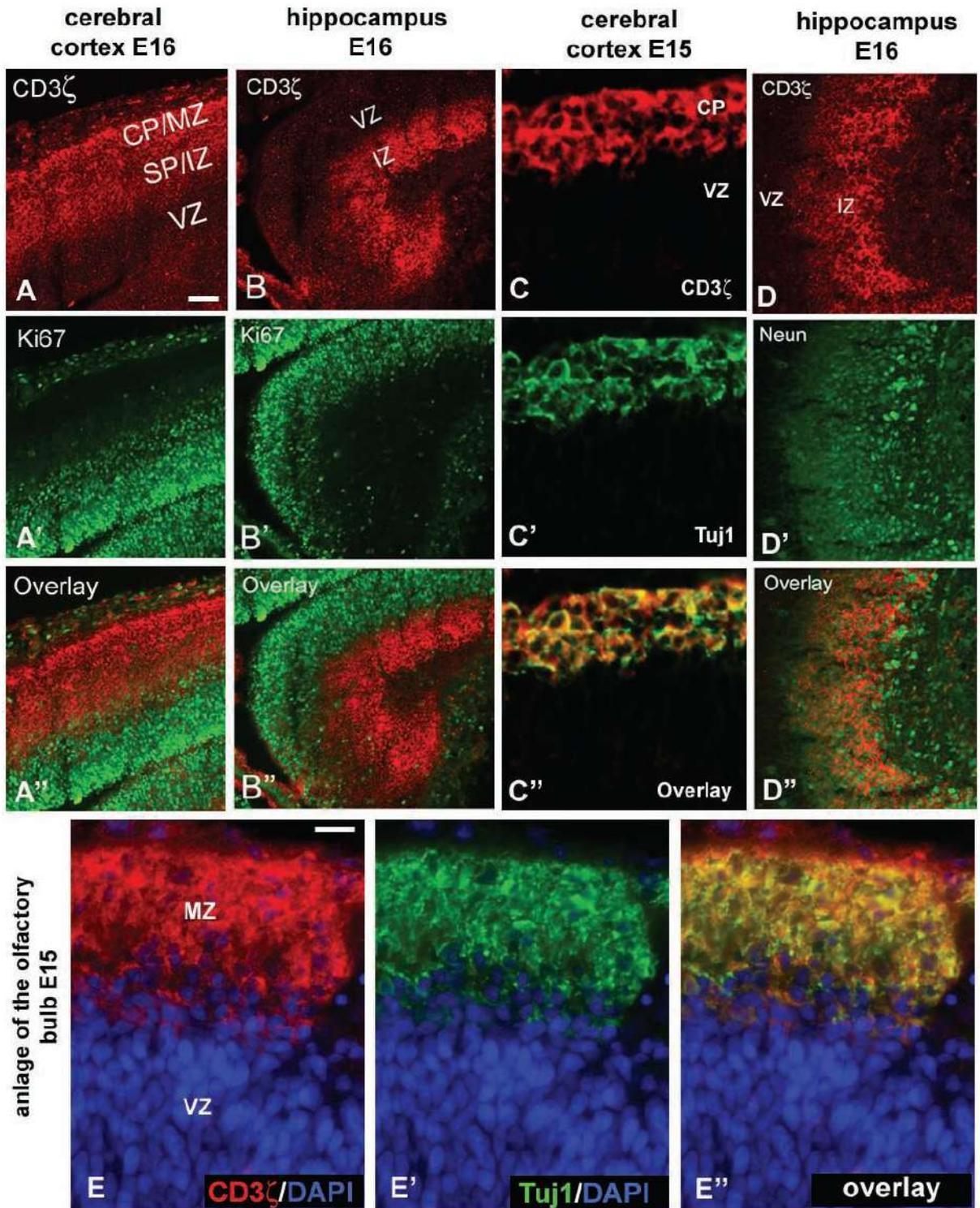
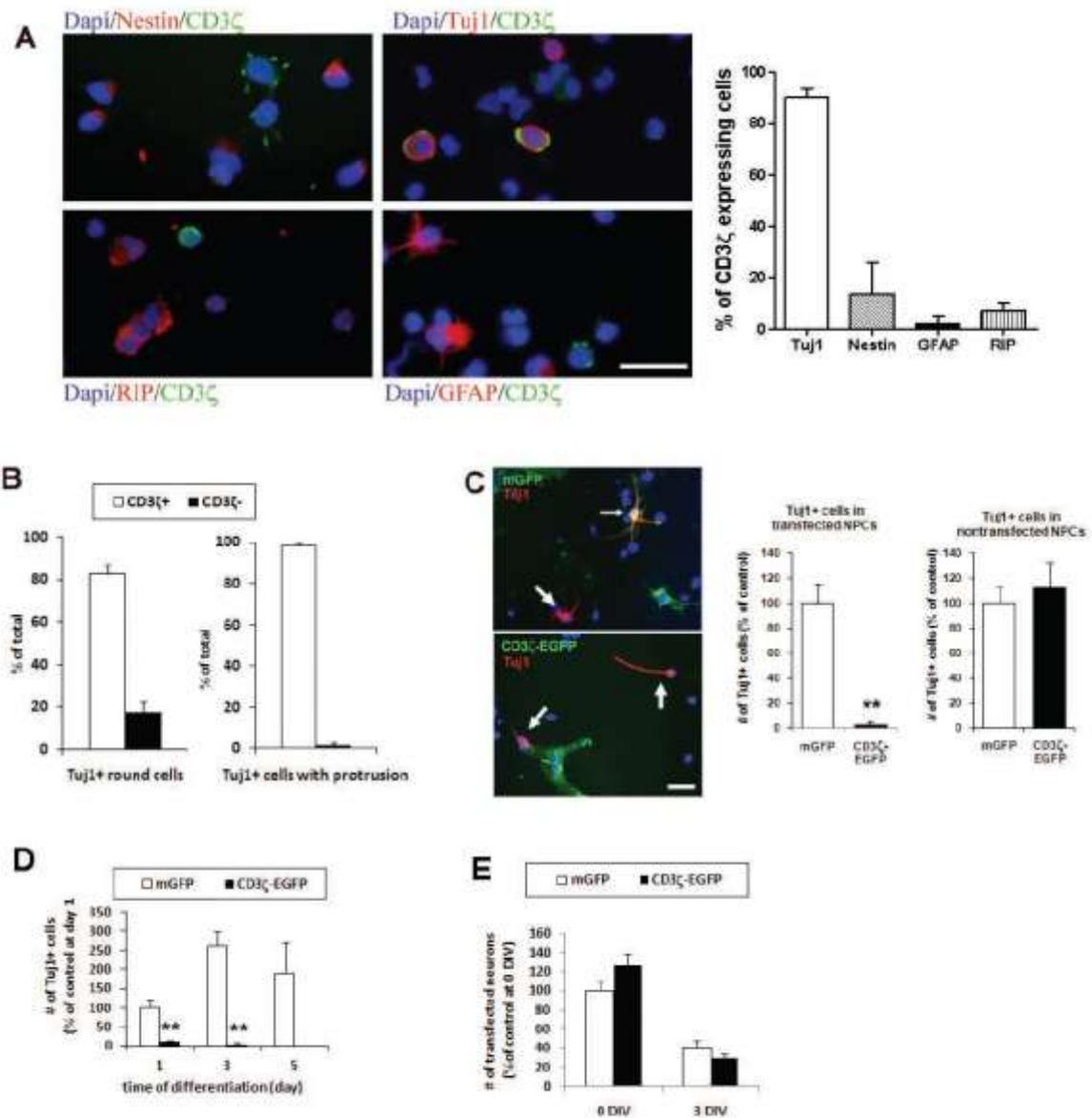
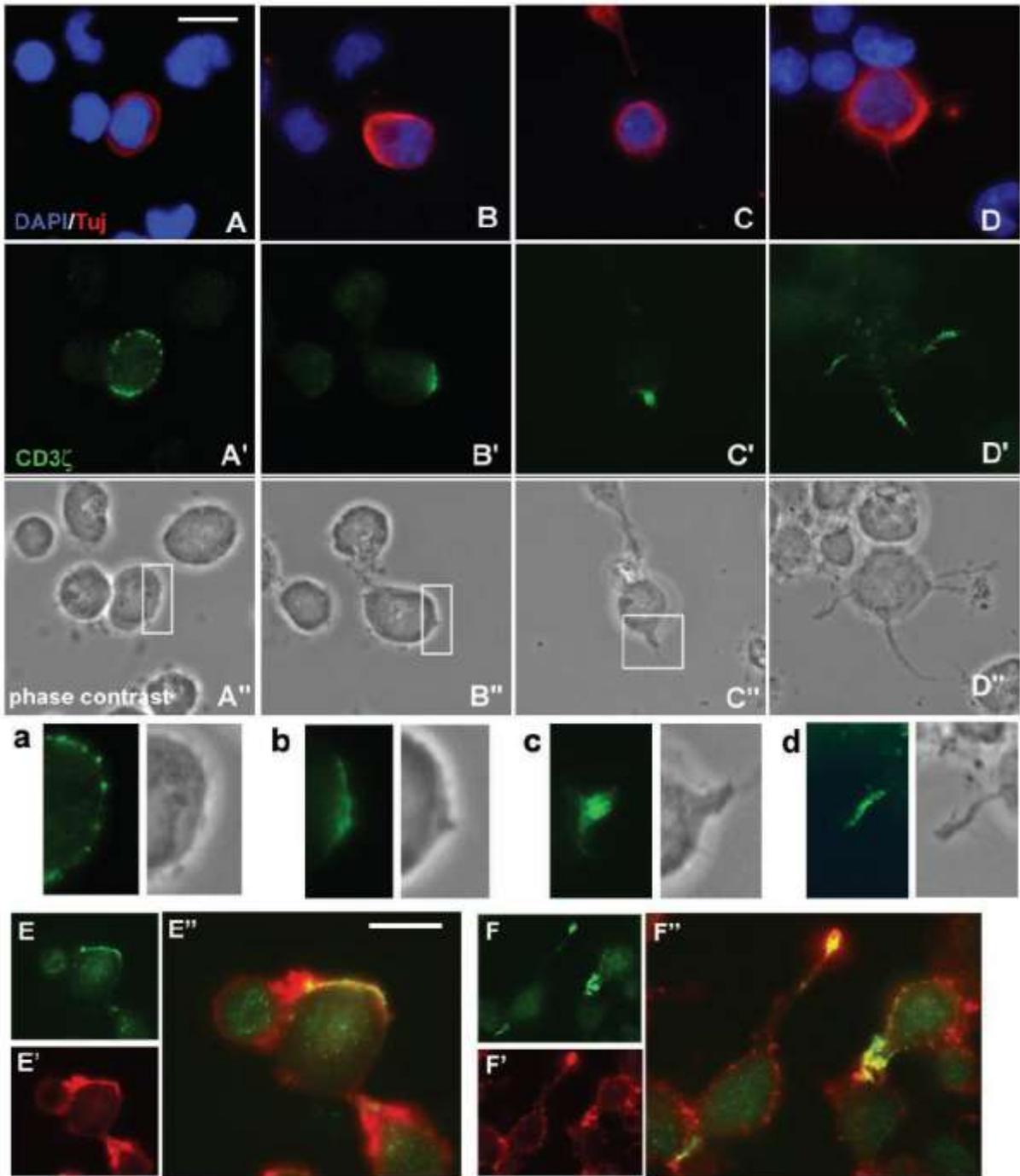


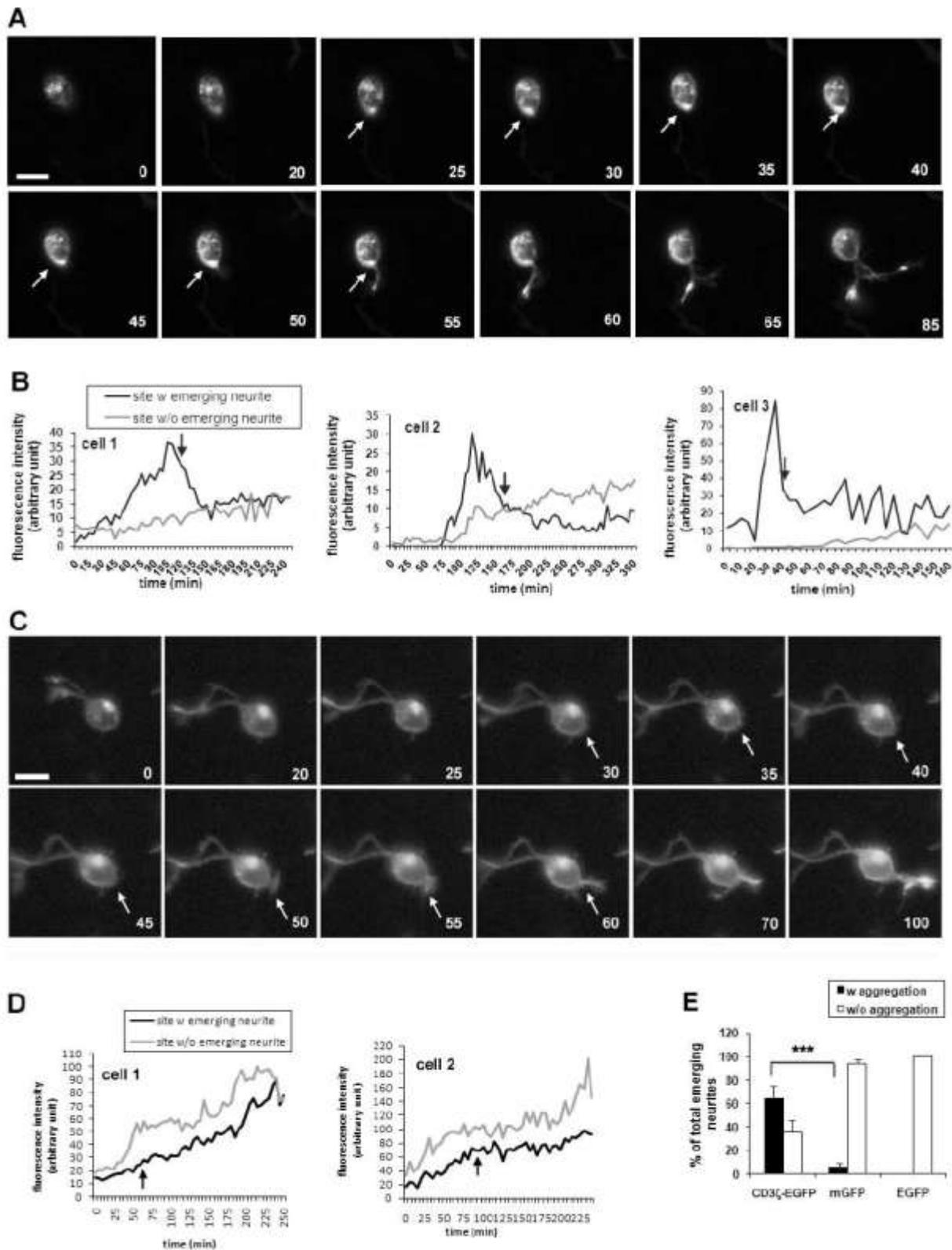
Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

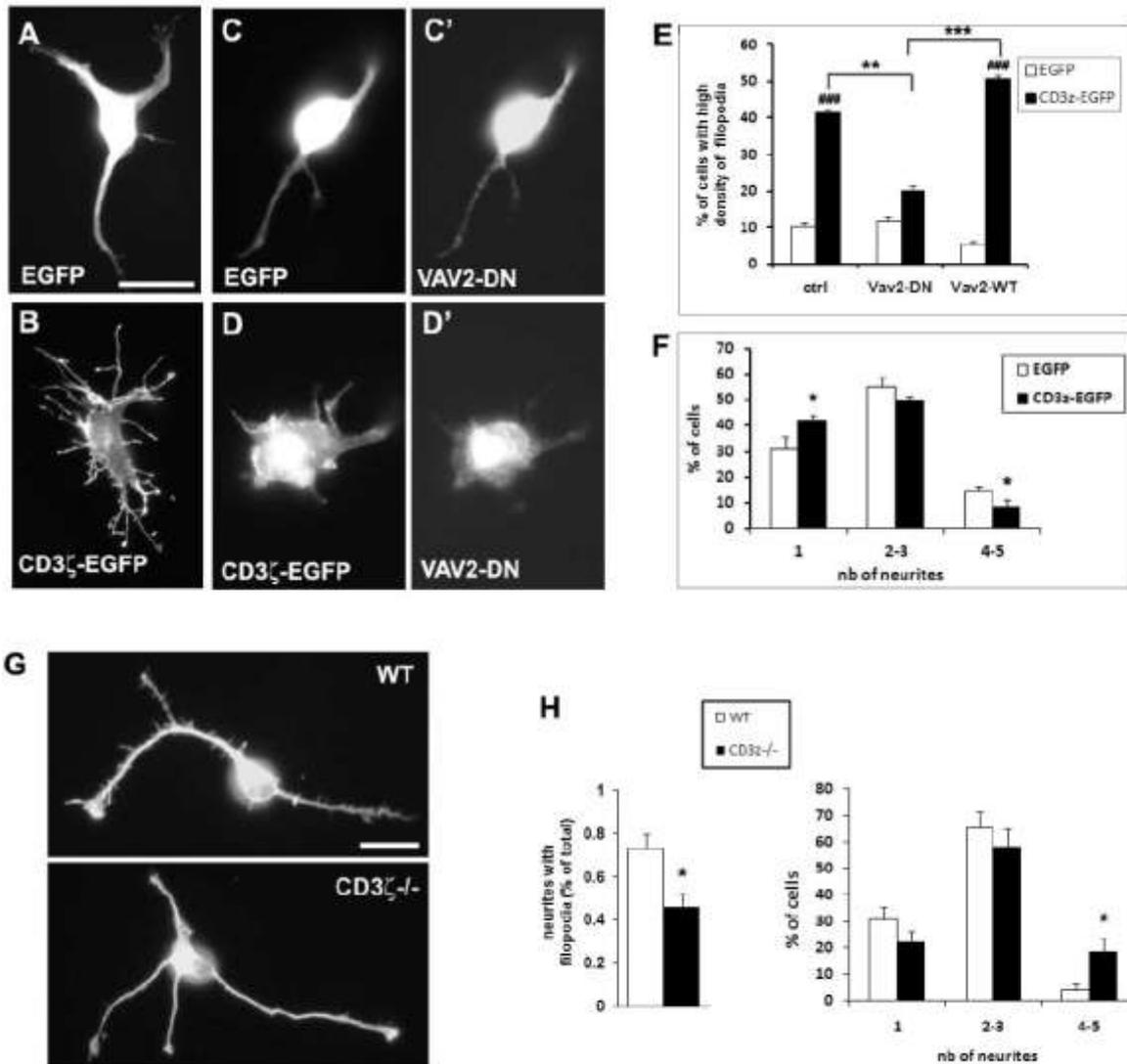


Figure 5

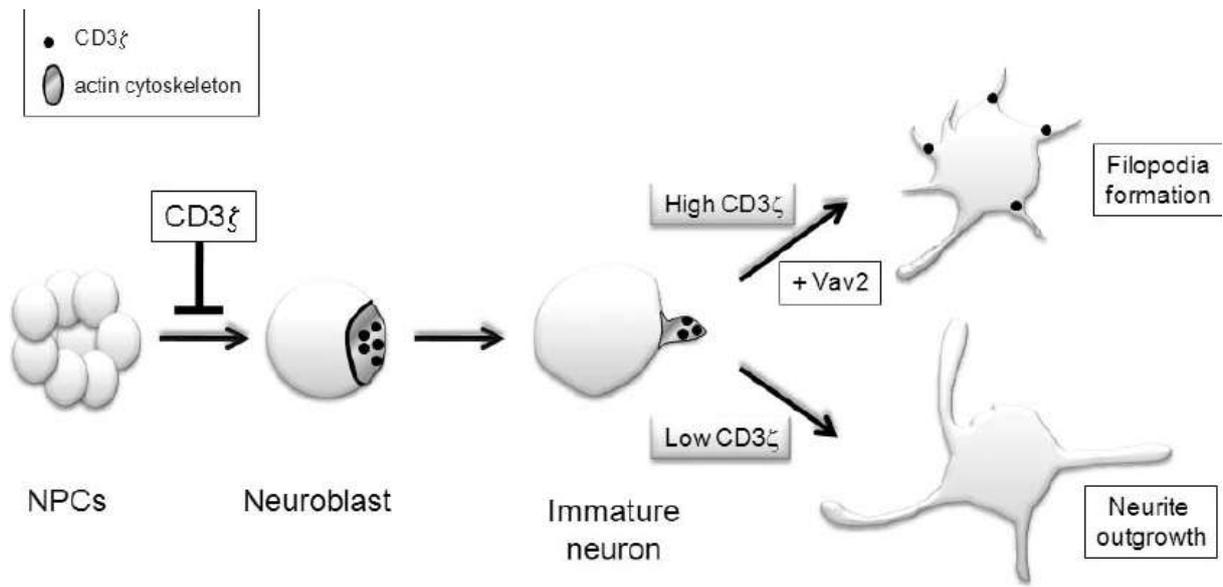


Figure 6

## Article II : The signaling adaptor protein CD3 $\zeta$ is a negative regulator of dendrite development in young neurons

Stéphane J. Baudouin<sup>123</sup>, Julie Angibaud<sup>123</sup>, Gildas Loussouarn<sup>345</sup>, Virginie Bonnamain<sup>123</sup>, Akihiro Matsuura<sup>6</sup>, Miyuki Kinebuchi<sup>6</sup>, Philippe Naveilhan<sup>123</sup>, and Hélène Boudin<sup>123</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR 643 et <sup>4</sup>U915 Nantes, F44000 France

<sup>2</sup>CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes F44000 France

<sup>3</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France

<sup>5</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, ERL3147, F-44000, France

<sup>6</sup>Department of pathology, Fujita Health University School of Medicine, Aichi, 470-1192, Japan

*Dans cette étude, nous avons examiné le rôle de CD3 $\zeta$  au stade de la dendritogenèse. Des analyses biochimiques et immunohistochimiques dans le cerveau de rat adulte et dans des neurones d'hippocampe en culture montrent que le CD3 $\zeta$  est principalement exprimé par les neurones et associé au compartiment somatodendritique dès que les dendrites débutent leur différenciation. Au cours de cette étape, la protéine CD3 $\zeta$  est sélectivement concentrée dans les filopodes et les cônes de croissance des dendrites, structures riches en actine impliquées dans la croissance des neurites. Le blocage de la traduction de la protéine CD3 $\zeta$  ou la surexpression de la forme mutante du CD3 $\zeta$  dont les sites de phosphorylation dans les domaines ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) ont été inactivés induisent une augmentation de la complexité de l'arborisation dendritique. A l'inverse, l'activation du CD3 $\zeta$  endogène à l'aide d'un anticorps extracellulaire dirigé contre le CD3 $\zeta$  réduit la taille et l'arborisation dendritique. Ces résultats révèlent un nouveau rôle de la protéine CD3 $\zeta$  dans le SNC, notamment son implication dans le développement dendritique via des mécanismes dépendant de ses domaines ITAMs.*

## The Signaling Adaptor Protein CD3 $\zeta$ Is a Negative Regulator of Dendrite Development in Young Neurons

Stéphane J. Baudouin,<sup>\*,†‡</sup> Julie Angibaud,<sup>\*,†‡</sup> Gildas Loussouarn,<sup>‡§||</sup>  
Virginie Bonnamain,<sup>\*,†‡</sup> Akihiro Matsuura,<sup>||</sup> Miyuki Kinebuchi,<sup>||</sup>  
Philippe Naveilhan,<sup>\*,†‡</sup> and H el ene Boudin<sup>\*,†‡</sup>

INSERM, <sup>\*</sup>U643 and <sup>§</sup>U915, Nantes, F44000 France; <sup>†</sup>CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes, F44000 France; <sup>‡</sup>Universit e de Nantes, Facult e de M edecine, Nantes, F44000 France; <sup>§</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, ERL3147, F-44000, France; and <sup>||</sup>Department of Pathology, Fujita Health University School of Medicine, Aichi, 470-1192, Japan

Submitted September 20, 2007; Revised March 17, 2008; Accepted March 19, 2008  
Monitoring Editor: Erika Holzbaur

A novel idea is emerging that a large molecular repertoire is common to the nervous and immune systems, which might reflect the existence of novel neuronal functions for immune molecules in the brain. Here, we show that the transmembrane adaptor signaling protein CD3 $\zeta$ , first described in the immune system, has a previously uncharacterized role in regulating neuronal development. Biochemical and immunohistochemical analyses of the rat brain and cultured neurons showed that CD3 $\zeta$  is mainly expressed in neurons. Distribution of CD3 $\zeta$  in developing cultured hippocampal neurons, as determined by immunofluorescence, indicates that CD3 $\zeta$  is preferentially associated with the somatodendritic compartment as soon as the dendrites initiate their differentiation. At this stage, CD3 $\zeta$  was selectively concentrated at dendritic filopodia and growth cones, actin-rich structures involved in neurite growth and patterning. siRNA-mediated knockdown of CD3 $\zeta$  in cultured neurons or overexpression of a loss-of-function CD3 $\zeta$  mutant lacking the tyrosine phosphorylation sites in the immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) increased dendritic arborization. Conversely, activation of endogenous CD3 $\zeta$  by a CD3 $\zeta$  antibody reduced the size of the dendritic arbor. Altogether, our findings reveal a novel role for CD3 $\zeta$  in the nervous system, suggesting its contribution to dendrite development through ITAM-based mechanisms.

### INTRODUCTION

Neuronal communication requires the formation of neuronal circuitry, achieved by a coordinated development of axons and dendrites. The ability of dendrites to receive and process neuronal signals is greatly determined by the dendritic architecture elaborated during development. It is now well established that dendrite formation is regulated by multiple factors that precisely control the extent of dendritic outgrowth and branching. Neuronal activity (Lohmann *et al.*, 2002), diffusible cues such as semaphorins and Slits (Polleux *et al.*, 2000; Whitford *et al.*, 2002), and intracellular signaling molecules (Fink *et al.*, 2003) have all been shown to regulate various steps of dendrite development. Interestingly, a large number of the aforementioned factors are also involved in the differentiation and function of other cell types in the immune system. For example, semaphorins and Slits are required for the maturation, migration, and activation of T lymphocytes and dendritic cells (Wu *et al.*, 2001; Kumano-goh and Kikutani, 2003). This common molecular repertoire

shared by different biological systems emphasizes the existence of similar mechanisms underlying fundamental functions in cell differentiation, maturation and activation. Conversely, the expression and the role of several proteins thought to be specific for the immune system have recently been extended to the CNS (Boulanger and Shatz, 2004). This is the case for the CD3 subunit CD3 $\zeta$ , a transmembrane adaptor signaling protein only characterized to date in T lymphocytes and natural killer (NK) cells, which associates to different cell surface receptors depending on the cell type (Lanier, 2001; Pitcher and van Oers, 2003). In T-cells, CD3 $\zeta$  is a component of the CD3 complex, the signaling module of the T-cell receptor (TCR) that recognizes peptide fragments presented by major histocompatibility complex (MHC) molecules and is thus responsible for antigenic recognition (Samelson *et al.*, 1985). CD3 $\zeta$  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). Moreover, CD3 $\zeta$  also participates in intrathymic T-cell differentiation, which is arrested in mice lacking CD3 $\zeta$  (Malissen *et al.*, 1993). Brain analysis of these CD3 $\zeta$ -deficient mice showed a striking abnormal development of the retinogeniculate projections in the visual system (Huh *et al.*, 2000). Defects in synaptic plasticity recorded in the hippocampus were also observed with an enhanced LTP and a lack of LTD (Huh *et al.*, 2000; Barco *et al.*, 2005). These findings suggest a novel role for CD3 $\zeta$  in the development of the nervous system as well as in synaptic functions. How-

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E07-09-0947>) on March 26, 2008.

Address correspondence to: H el ene Boudin ([helene.boudin@univ-nantes.fr](mailto:helene.boudin@univ-nantes.fr)).

Abbreviations used: ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; TCR, T-cell receptor; DIV, day in vitro.

ever, the cerebral expression of CD3 $\zeta$  proteins and the identity of CD3 $\zeta$ -expressing cells have yet to be elucidated. In this study, we show that CD3 $\zeta$  is predominantly expressed in neurons where it selectively localized at dendritic growth cones and filopodia. CD3 $\zeta$  loss-of-function experiments in cultured neurons increased dendritic arborization, whereas activating endogenous CD3 $\zeta$  inhibited dendritic branching. Altogether, our findings reveal a novel role for CD3 $\zeta$  in the nervous system, highlighting its contribution to neuronal development.

## MATERIALS AND METHODS

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

### Antibodies

Two commercially available anti-CD3 $\zeta$  affinity-purified rabbit polyclonal antibodies were used for CD3 $\zeta$  immunodepletion. The first antibody (Ab36) was raised against aa 36–54, corresponding to an intracellular sequence of the protein (Spring Bioscience, Fremont, CA). The second antibody (Ab22) was raised against aa 22–30, a sequence corresponding to the N-terminus extracellular region of the protein (Alexis Bioscience, San Diego, CA). The mouse monoclonal antibodies to tau (antibody tau-1, clone PC1C6), microtubule-associated protein 2 (MAP2, clone AP20), neuronal nuclei (NeuN), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; clone 6C5) were purchased from Chemicon (Billerica, MA). The mouse monoclonal  $\beta$ -tubulin isotype III antibody (Tuj1, clone SCL3D10) and the mouse monoclonal anti-fibrillary acidic protein (GFAP) were obtained from Sigma (St. Louis, MO) and the rabbit polyclonal tau from Dako (Glostrup, Denmark). The mouse monoclonal anti-oligodendrocyte (RIP) was purchased from Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Iowa City, IA) and anti-CD90 (clone OX7) was purchased from Bioatlantic (Nantes, France). The mouse anti-CD11b/c (clone OX42) and anti-CD161 (clone 3.2.3) were produced in our laboratory from hybridomas obtained from the European Collection of Animal Cell Culture (Salisbury, United Kingdom). The mouse mAb anti-CD45 receptor (CD45R, clone HIS24) was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and biotinylated- and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The aminomethylcoumarin acetate (AMCA)-conjugated streptavidin was obtained from Beckman Coulter (Fullerton, CA) and the Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit and goat anti-mouse were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA).

### PCR Analysis

Total RNA was extracted from 50 to 100 mg of rat brain and spleen by homogenization in 1 ml of Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 5 min at room temperature followed by chloroform extraction and isopropanol precipitation. After centrifugation and washing in ethanol, RNA was resuspended in water and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. After Turbo DNase treatment (Invitrogen), 2  $\mu\text{g}$  of RNA were reverse-transcribed with a MMLV-reverse transcriptase system (Invitrogen). The synthesized cDNA was denatured for 2 min at  $92^{\circ}\text{C}$ , and 100 ng was subjected to 35 cycles of PCR amplification ( $92^{\circ}\text{C}$  for 30s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 30s,  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min, and a final extension step at  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 min) in a total volume of 25  $\mu\text{l}$  containing 0.4  $\mu\text{M}$  of sense and antisense primers, 0.5 U of Taq polymerase (Invitrogen), and 200  $\mu\text{M}$  of dNTP. For the amplification of CD3 $\zeta$  mRNA, the sense oligonucleotide primer was 5'-TCGAGGAATCCACCATGAAGTGGACGGCAGTC-3' and the antisense oligonucleotide primer was 5'-TGACGACCGTGGCGGAGGGGGCAGGGTCTG-3', giving rise to a 152-base pair fragment. Internal standards were generated by amplifying the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA using the following set of primers: sense, 5'-TTCCTCCTCAGACCGCTTTT-3' and antisense, 3'-CTTATAGCCCCCTC-CAGCA-5', giving rise to a 262-base pair amplification product. PCR products were loaded on a 2% agarose gel.

### Slice Preparation

Adult male Sprague-Dawley rats weighing 200 g were deeply anesthetized with Rompun-ketamine (1:4) at 1 ml/kg (i.p.). They were then perfused transcardially with 250 ml of 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS). Brains were dissected and postfixed in the same solution for 1 h at room temperature and then were cryoprotected overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in a solution of 15% sucrose in PBS and then 48 h at  $4^{\circ}\text{C}$  in 30% sucrose in PBS. Coronal sections (30  $\mu\text{m}$  thick) were cut on a cryostat and collected in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4.

### Cell Cultures

CO6-7 cells were grown in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, and 100 U/ml penicillin.

Neural stem cell cultures were prepared from whole brains of E15 rat embryos as previously described (Sergent-Tanguy et al., 2006). Briefly, tissues freed of meninges were incubated with 0.25% trypsin for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , and after addition of 10% FCS and 10 mg/ml DNase I, were dissociated by mechanical trituration. Aggregates were removed by decantation and cells were further purified from small debris by centrifugation. The cell suspension was then incubated for 12 h in basal culture medium composed of DMEM containing Hams' F12 (1/1, vol/vol), 3 mM glucose, 5 mM HEPES (pH 7.2), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, and 100 U/ml penicillin (basal medium) and supplemented with 10% FCS (complete medium), and the uncoated cells were transferred to basal medium supplemented with N2 (Invitrogen) and 10 ng/ml FGF-2 to allow for the formation of neurospheres. After 5 d of culture, neurospheres were dissociated by trypsin and mechanical trituration to give a single-cell suspension. This was then plated on poly-L-ornithine-coated glass coverslips at a density of  $3 \times 10^4$  cells/cm $^2$  for 2 h in complete medium and subsequently fixed in 4% PFA and 4% sucrose in PBS.

Glia cultures were prepared from newborn rat forebrains. Briefly, cortices were dissected and dissociated by trypsin and DNase and the cells were plated at a density of  $35 \times 10^3$  cells/cm $^2$  in MEM containing 10% FCS, 0.6% D-glucose, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, and 100 U/ml penicillin. The medium was replaced with serum-free MEM containing N2 supplements 24 h before the neuron culture.

Rat hippocampal and cortical cultures were prepared from 18-d-old rat embryos by previously described methods (Goslin et al., 1998; Pujol et al., 2005). Briefly, hippocampi were dissected and dissociated by trypsin and trituration and plated on glass coverslips coated with poly-L-lysine. For calcium imaging assays and transfection, cells were plated at a density of  $18 \times 10^3$  cells/cm $^2$ . For all other uses, cells were plated at  $4 \times 10^3$  cells/cm $^2$ . The cells were allowed to attach on coverslips before being transferred to a dish containing a glial feeder layer, prepared as described above, and maintained for up to 21 d in serum-free MEM with N2 supplements. Neurons were used for immunocytochemical staining and morphology analysis 3 h after plating or after 1, 2, 4, 7, 10, and 21 d in vitro (DIV). For Western blot analysis, cells were collected at 7 DIV.

### Western Blot Analysis

For Western blot analysis, homogenates from CD3 $\zeta$ -transfected CO6-7 cells, 7 DIV cultured neurons, T lymphocytes, and rat forebrain and spleen were prepared. Briefly, cultured neurons and CO6-7 cells were scraped into PBS containing a cocktail of protease inhibitors and were then pelleted and resuspended in Laemmli buffer. T lymphocytes were isolated from total splenocytes after nylon wool adherence and depletion of CD161 (NK cells), CD11b/c (monocytes), and CD45R (B lymphocytes) positive cells using magnetic beads (Invitrogen/Dynal, Carlsbad, CA). For tissue preparation, rat forebrains and spleens were homogenized using a glass Teflon homogenizer in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 320 mM sucrose and a cocktail of protease inhibitors. The resulting suspension was centrifuged at  $700 \times g$  for 10 min. The supernatant was collected and centrifuged at  $150,000 \times g$  for 30 min, and the pellet was resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. The membrane preparation was solubilized in Laemmli buffer.

Cell suspensions ( $\sim 500,000$  cells) and tissue homogenates (30  $\mu\text{g}$  of protein) were loaded on an SDS-PAGE (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 in Ab36 CD3 $\zeta$  antibody (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or with anti-GAPDH antibody (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), diluted in TBST containing 5% dehydrated milk, washed with TBST, incubated for 1 h in peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:3000) or in peroxidase-conjugated donkey anti-mouse antibody (1:2000), respectively, and visualized using a chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL) and exposure to x-ray films.

### Immunostaining

For immunohistochemistry on rat brain sections, sections were first incubated in 0.3% H $_2$ O $_2$  in 0.1 M PB for 30 min and, after two washes in PB, were additionally incubated for 30 min in 3% normal donkey serum (NDS) in PB. After two washes in PB, sections were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with Ab36 (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or Ab22 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) CD3 $\zeta$  antibodies diluted in PB containing 3% NDS and 0.05% Triton X-100. The following day, sections were washed twice in PB and incubated for 45 min in biotinylated goat anti-rabbit IgG diluted at 1:200 in PB containing 0.5% NDS, followed by 45 min in streptavidin-biotin peroxidase solution (ABC Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA). After several rinses in PB, sections were further incubated in 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories) for 10 min at room temperature and were then mounted on gelatin-coated slides, dehydrated in graded ethanol, delipidated in xylene, cover-slipped with Eukit, and examined with a Zeiss microscope (Thornwood, NY). For control experiments, the primary antibodies were omitted during the procedure. For double immunofluorescence labeling, sections were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with Ab36 CD3 $\zeta$  antibody and either anti-GFAP (1:500), anti-NeuN (1:200), anti-CD11b/c (1:500), or

anti-RIP (1:500) antibodies diluted in PB containing 3% NDS and 0.05% Triton X-100. Slices were then incubated for 1 h with the appropriate FITC- or Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibodies (1:200 and 1:1000, respectively) and mounted with Vectashield (Vector Laboratories) on glass slides for analysis on an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss). Pictures were acquired with 10 $\times$  and 20 $\times$  objectives using a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss) driven by AxioVision Release 4.2 software. Two animals were analyzed to determine the phenotype of CD3 $\zeta$ -expressing cells in the brain. For each animal, the number of CD3 $\zeta$ -positive cells was recorded in the neocortex from two slices (300 CD3 $\zeta$ -positive cells per slice), and the number of CD3 $\zeta$ -positive cells that were also immunoreactive for GFAP (astrocyte), NeuN (neuron), CD11b/c (microglia), or RIP (oligodendrocytes) was counted. Images for presentation were prepared for printing with Adobe Photoshop (San Jose, CA). For neural stem cells and cultured neurons, cells were fixed in 4% PFA for 15 min, permeabilized for 5 min in 0.25% Triton X-100 in PBS, and incubated for 30 min in 10% bovine serum albumin (BSA) in PBS at 37°C. Cells were then incubated overnight in Ab36 CD3 $\zeta$  antibody (2.5  $\mu$ g/ml) or CD90 antibody (3  $\mu$ g/ml) diluted in PBS containing 3% BSA. For double labeling, Ab36 CD3 $\zeta$  antibody was mixed with either MAP2 (1:200), tau-1 (1:500), or TauJ (1:1000) antibodies. F-actin was labeled with TRITC-phalloidin (1:10000, Sigma Aldrich) for 1 h at 37°C before immunostaining. Cells were then incubated with the appropriate secondary antibodies conjugated to FITC, biotin (1:200), or Alexa Fluor 568 (1:1000). When the biotin-conjugated antibody was used, cells were subsequently incubated in AMCA-conjugated streptavidin (1:200). For double labeling on brain sections or cultured cells, control experiments achieved by omitting one of the primary antibodies showed the lack of cross-reactivity between the secondary antibodies and the absence of signal spillover between the two channels. The coverslips were mounted with Vectashield on glass slides for analysis on an Axioskop 2 plus microscope (Zeiss). Pictures were acquired with 20 $\times$  and 63 $\times$  objectives using a digital camera as described above.

#### DNA Constructs and Small Interfering RNA

A plasmid encoding rat CD3 $\zeta$  fused at the C terminus with enhanced green fluorescent protein (EGFP) was produced. The coding sequence of CD3 $\zeta$  containing a Kozak sequence at the 5' end was obtained by PCR amplification and subcloned in frame into the EcoRI-AgeI sites of pEGFP-N1 to generate the CD3 $\zeta$ -GFP expression plasmid.

To generate a mutant form of CD3 $\zeta$  with the six tyrosine residues substituted by phenylalanine in the three ITAMs, 100 ng of the following three primers bearing the mutations—5'-AACCAGCTCTTAAACGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATTGATGTTTGT-3', (5'-AAGCGGTGTTCAATGCACTGCAGAAAGACAAGATGGCAGAGGGCTTCAGTGAGATT-3'), and (5'-ACGGCTTTTCCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTTGAGCCCTG-3')—were mixed with 100 ng of CD3 $\zeta$ -GFP DNA template. The reaction was performed using the QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's instructions. All the CD3 $\zeta$  cDNA constructs were confirmed by sequencing.

For small interfering RNA (siRNA) experiments, four sense and antisense oligonucleotides corresponding to the following cDNA sequences were purchased from Ambion (Austin, TX): 5'-GCAAAAUUCAGCAGGAGUGG-3' and 5'-CACUCUCUGUGAAUUUGGTC-3', siRNA1, nucleotides 276–294; 5'-GCUCUAUAACGAGGCUCAAUit-3' and 5'-AUUGAGCUCGUUAUAAGAGC-3'; siRNA2, nucleotides 329–347; 5'-GGUAAACUUAUUUAGGUCit-3' and 5'-GACCUAAUUACAUGLUACit-3'; siRNA3, nucleotides 1066–1084; and 5'-GGCGUGUACAAUGCACUGCt and 5'-GCACUGCAUUGUACACGGCt; siRNA4, nucleotides 444–462. A control siRNA (Ambion), which showed no homology to any known gene sequences from rat, mouse, or human, was used as a negative control.

#### Transfections and Pharmacological Treatments

Transfection of COS-7 cells with the CD3 $\zeta$ -expressing plasmid pRZ-3 (Itoh et al., 1993) was performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) as previously described (Baudouin et al., 2006). To determine which siRNA was the most effective in reducing CD3 $\zeta$  protein expression, COS-7 cells were cotransfected with 3  $\mu$ g of pRZ-3 and 50 nM of either siRNA1, 2, 3, or 4 or negative control using the Lipofectamine 2000 reagent. One day after transfection, cells were collected to analyze CD3 $\zeta$  protein expression by Western blot.

Neuron transfection was performed at 3 DIV with 3  $\mu$ g of either CD3 $\zeta$ -GFP cDNA or 3  $\mu$ g of CD3 $\zeta$ -6Y6F-GFP or 3  $\mu$ g of membrane-targeted GFP (mGFP) cDNA [CAP-GFP(S6ST), a gift from Dr. K. Moriyoshi, Kyoto University, Japan; Moriyoshi et al., 1996], using 3  $\mu$ l of the Lipofectamine 2000 reagent. The cells were fixed in 4% PFA and 4% sucrose in PBS at 5 DIV for MAP2 and tau double labeling.

For siRNA assays, neurons were cotransfected at 3 DIV with 3  $\mu$ g of mGFP cDNA and 50 nM of siRNA1 or siRNA3 using 3  $\mu$ l of the Lipofectamine 2000 reagent. The cells were fixed in 4% PFA and 4% sucrose in PBS at 5 DIV for MAP2 and CD3 $\zeta$  double immunolabeling.

For antibody treatments, either 5  $\mu$ g/ml Ab22 CD3 $\zeta$  antibody or 5  $\mu$ g/ml control antibody to human CD16 (3g8) were added to neuron cultures at 1 and 3 DIV. In control cultures the same volume of vehicle was added. Cells

were fixed in 4% PFA and 4% sucrose in PBS at 5 DIV and were immunolabeled for MAP2 morphological analysis.

To assess the effects of inhibiting protein kinases on CD3 $\zeta$  distribution, neurons were treated at 7 DIV for 5, 15, 30, 60, and 120 min with 10  $\mu$ M piceatannol (Sigma) an inhibitor of the Syk/ZAP70 family of the protein tyrosine kinases, 100 nM damnacanthal (Calbiochem, San Diego, CA) a specific inhibitor of Ick, a protein tyrosine kinase of the Src family, 1  $\mu$ M PP2 (Sigma), a broad inhibitor of the Src-family protein tyrosine kinases (Sigma), or 50 nM wortmannin (Sigma), an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase. All the kinases inhibitors were added directly to the culture medium from a concentrated DMSO stock. To test the role of the actin cytoskeleton on CD3 $\zeta$  localization, neurons were treated for 30 min and 3 and 24 h with 1  $\mu$ M cytochalasin D (Sigma) added to the culture medium from a concentrated DMSO stock.

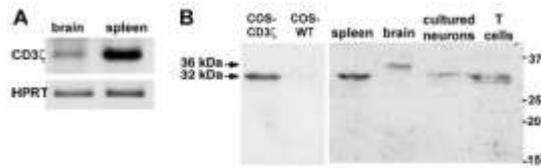
#### Quantification of CD3 $\zeta$ Expression and Neuronal Morphology Analysis

To quantify CD3 $\zeta$  or GAPDH expression in CD3 $\zeta$ -expressing COS-7 cells after siRNA transfection, the signal intensity obtained on Western blot membranes was measured from four experiments using Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and expressed as a percentage of the intensity obtained from control cells without siRNA. To quantify CD3 $\zeta$  immunoreactivity in neurons after siRNA transfections, coverslips were scanned on the microscope with a 10 $\times$  lens and pictures of transfected cell were acquired with a 40 $\times$  objective. The intensity of CD3 $\zeta$  immunofluorescence was measured with the Image J software in well-isolated GFP-positive neurons cotransfected with either control or CD3 $\zeta$  siRNAs and in nontransfected neurons located nearby the transfected cells. The intensity of CD3 $\zeta$  immunoreactivity was measured in the dendritic field, but excluding the cell body, because CD3 $\zeta$  was mainly targeted to dendrites and because the thickness of the cell body is a frequent source of nonspecific labeling compared with the nerve processes. A total of 16–34 cells per experimental condition were analyzed from two independent experiments. For each individual experiment, 3–7 cells were scored from at least two coverslips. Results are presented as average  $\pm$  SEM of the ratio of anti-CD3 $\zeta$  fluorescence intensity in GFP-positive neurons relative to nearby nontransfected neurons.

To analyze the morphology of neurons transfected with control siRNA, siRNA1, siRNA3, mGFP, CD3 $\zeta$ -GFP, or CD3 $\zeta$ -6Y6F-GFP, each coverslip was systematically scanned with a 10 $\times$  lens and acquired with a 40 $\times$  or 63 $\times$  objective. Images from mGFP-labeled neurons were projected on the computer screen, all primary dendritic branches were traced with the mouse using the ImageJ software program, and the number and length of dendritic branches were scored. As defined in previous studies using a model of hippocampal neuron culture, protrusions with a length <10  $\mu$ m likely corresponded to filopodia and dendritic spines, whereas protrusions with a length >10  $\mu$ m were defined as dendritic branches (Jaworski et al., 2005; Terry-Lorenzo et al., 2005). Consequently, only the protrusions with a length >10  $\mu$ m were taken into account to quantify the number and length of dendritic branches. Between 10 and 15 cells were scored from at least two coverslips for each experimental condition. A total of 29–63 cells were analyzed for each experimental condition from two to four independent experiments, and the data were presented as average  $\pm$  SEM. To analyze experiments involving neuron cultures treated with either 3g8 or CD3 $\zeta$  antibody, images from MAP2-labeled neurons were randomly acquired with a 20 $\times$  and 40 $\times$  lens, and the number and length of dendritic branches was measured as above. Data are presented as average  $\pm$  SEM of a total of 40–52 cells per experimental condition recorded from two to four coverslips (5–10 cells per coverslip) obtained from two to three independent neuron cultures. Data analysis was performed using Excel (Microsoft, Redmond, WA) and GraphPad Prism 4 (San Diego, CA), and statistical analyses were done by Student's *t* test. Images were processed and prepared for printing using Adobe Photoshop.

#### Fluorescence Measurements of Intracellular Calcium

The effects of Ab22 CD3 $\zeta$  antibody on intracellular calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in 7 DIV cultured neurons were assessed using the calcium-sensitive fluorescent probe Fluo-3 AM (Molecular Probes). Neurons were loaded with 4  $\mu$ M Fluo-3 AM in Tyrode (145 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, and 5 mM glucose) and 0.02% Pluronic at 37°C for 30 min. The coverslips were mounted on the stage of an inverted microscope (Nikon Diaphot, Tokyo, Japan) equipped for fluorescence and illuminated at 450–490 nm. The emitted light (>515 nm) was collected by a high-resolution image intensifier coupled to a video camera (Extended ISIS camera system; Photonic Science, Roberts-bridge, United Kingdom) and connected to a digital image processing board controlled by FLUO software (Imstar, Paris, France). Cells were maintained at 37°C and continuously superfused with Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode. A microperfusion system allowed for local application and rapid change of the different experimental media. Microperfusion solutions were identical to the Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode except that they contained 20 mM mannitol for efficient local perfusion of the neurons under analysis. Single-cell fluorescence intensity was measured from digital image processing and displayed against time. Fluorescence intensity was normalized to the intensity measured



**Figure 1.** Expression of CD3 $\zeta$  in the rat brain and in cultured neurons. (A) Expression of CD3 $\zeta$  mRNA in the rat brain. PCR amplification of CD3 $\zeta$  mRNA extracted from adult rat brain and spleen (positive control). HPRT amplification products indicated that PCR was performed on comparable levels of RNA. (B) Identification of heterologously expressed and endogenous CD3 $\zeta$  by Western blot. Cell homogenates of nontransfected (COS-WT) and CD3 $\zeta$ -transfected (COS-CD3 $\zeta$ ) COS-7 cells, as well as membrane homogenates prepared from rat spleen, brain, 7 DIV cultured neurons, and T-cells were resolved on a 12% SDS-PAGE and immunoblotted with Ab36 CD3 $\zeta$  antibody. An immunoreactive band can be observed at 32 kDa in CD3 $\zeta$ -transfected COS-7 cells, spleen, cultured neurons, and T-cells and at 36 kDa in brain homogenates. Molecular weight markers are indicated on the right.

before antibody application. Calcium variations were quantified by a linear regression of the first 10 points of the fluorescence curve after antibody application ( $\Delta F/F/t$  in  $s^{-1}$ ).

## RESULTS

### Expression of CD3 $\zeta$ in the Rat Brain and in Cultured Neurons

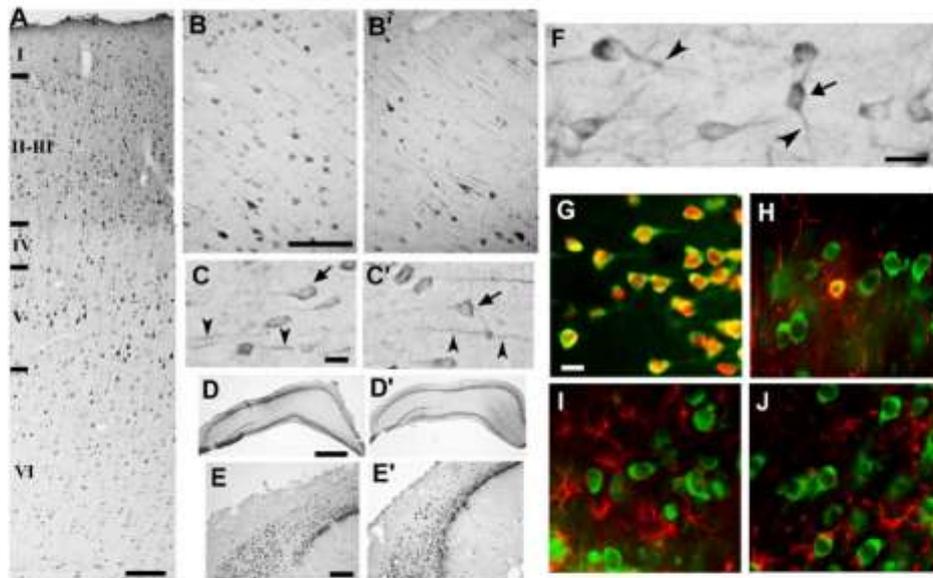
To examine whether CD3 $\zeta$  mRNA was expressed in the brain, RT-PCR amplifications of CD3 $\zeta$  was performed on total RNA extracted from rat forebrain and compared with the spleen. Amplification of HPRT transcripts served as an internal control to confirm RNA integrity for each preparation. In brain samples, a band of the expected size of 152 base pairs was detected, although exhibiting a lower intensity than in spleen preparations (Figure 1A). The expression of CD3 $\zeta$  at the protein level was investigated by Western blot experiments under nonreducing conditions to preserve the disulfide bridge of the homodimer forms of CD3 $\zeta$  known to be prevalent in immune cells (Baniyash, 2004). Western blots of COS-7 cells transfected with rat CD3 $\zeta$  cDNA showed that the Ab36 CD3 $\zeta$  antibody yielded a single band of 32 kDa, whereas no signal was apparent in nontransfected cells (Figure 1B). In the spleen, T-cells and cultured neurons, the 32-kDa form was also detected, whereas a 36-kDa band was present in rat brain homogenates (Figure 1B), a molecular weight in agreement with the 37-kDa form of CD3 $\zeta$  reported in hippocampus preparations (Sourial-Bassillious *et al.*, 2006). The characterization of the molecular forms of CD3 $\zeta$  expressed in heterologous COS-7 cell systems, splenocytes, and peripheral T-cells have been well established, which showed that the nonphosphorylated CD3 $\zeta$  homodimer exhibited an apparent molecular weight of 32 kDa and that activation-induced tyrosine phosphorylation of the ITAMs resulted in the appearance of multiple forms with molecular weights ranging from 36 to 45 kDa depending on the number of phosphorylated tyrosine residues (Sancho *et al.*, 1993; Furukawa *et al.*, 1994; Garcia and Miller, 1997; van Oers *et al.*, 2000). Although the 32-kDa form of CD3 $\zeta$  detected in CD3 $\zeta$ -transfected COS-7 cells, spleen, T-cells, and cultured neurons likely corresponds to a nonphosphorylated CD3 $\zeta$  homodimer, the 36-kDa band detected in the brain might reflect the existence of a constitutively phosphorylated form of CD3 $\zeta$  in cerebral tissue.

We next examined the expression pattern of CD3 $\zeta$  protein in rat brain slices by immunohistochemistry with the anti-CD3 $\zeta$  antibodies Ab36 and Ab22. Using both antibodies, CD3 $\zeta$  immunoreactivity was widely distributed in numerous brain areas, including the cerebral cortex and hippocampus (Figure 2, A–F). Importantly, the distribution of CD3 $\zeta$  immunoreactivity displayed by Ab36 strongly paralleled that obtained with Ab22, both at regional and cellular levels, supporting the specificity of the immunolabeling produced by both antibodies (compare Figure 2, B–E, with Figure 2, B'–E'). CD3 $\zeta$  immunolabeling was extensively associated with neurons, as assessed by double labeling with the neuronal marker NeuN (Figure 2G) and was shown to outline the periphery of cell bodies and to be associated with dendritic processes (Figure 2, C, C', and F). The phenotype of CD3 $\zeta$ -expressing cells in brain slices was further analyzed in the neocortex by counting the number of CD3 $\zeta$ -positive cells that were also immunoreactive for NeuN (neuron), RIP (oligodendrocyte), or GFAP (astrocyte), or CD11b/c (microglia). The quantification indicated that  $91 \pm 2$  and  $4 \pm 1\%$  of the total CD3 $\zeta$ -expressing cells ( $n = 1200$  from two rats) were associated with neurons or oligodendrocytes, respectively (Figure 2, G and H). The remaining was associated with unidentified profiles. Conversely,  $88 \pm 5\%$  of neurons ( $n = 1300$ ) and  $44 \pm 6\%$  of oligodendrocytes ( $n = 117$ ) were immunopositive for CD3 $\zeta$ . No labeling was observed within astrocytes and microglia (Figure 2, I and J). Altogether, the biochemical and immunostaining data obtained with the Ab36 and Ab22 antibodies are consistent with a prominent constitutive neuronal expression of CD3 $\zeta$  in the brain and in cultured neurons.

### CD3 $\zeta$ Is Selectively Enriched at Growth Cones and Filopodia during Neuronal Development

All of the following immunostaining experiments were performed with Ab36 CD3 $\zeta$  antibody. To determine at which stage of neuronal development CD3 $\zeta$  started to be expressed, we first used primary cultures of neural precursor cells grown as neurospheres, a free-floating cellular aggregate formed of neural stem cells (Reynolds *et al.*, 1992). After dissociation of the neurospheres into a single cell suspension and plating onto glass coverslips, neural stem cells initiated their differentiation to generate neuronal and glial cells. This culture system allowed to obtain neuroblasts at a very immature stage, only a few hours after the initiation of their differentiation from neural stem cells. Two hours after plating, cells were double-labeled with Ab36 CD3 $\zeta$  antibody and a tubulin  $\beta$  III (Tuj1) antibody used as a neuronal marker (Figure 3A). At this stage,  $12 \pm 1\%$  of total cells ( $n = 346$  cells) were immunopositive for Tuj1, and  $72.5 \pm 6.4\%$  of Tuj1-positive cells ( $n = 43$ ) were also immunolabeled for CD3 $\zeta$ . Conversely, all of the CD3 $\zeta$ -immunopositive cells were additionally immunopositive for Tuj1, indicating that CD3 $\zeta$  was specifically expressed in newly differentiated neurons. Within these cells, CD3 $\zeta$  immunoreactivity was mostly associated with the periphery of the cell, suggestive of a plasma membrane localization (Figure 3A).

To study the developmental pattern of CD3 $\zeta$  distribution in neurons, we chose a low-density hippocampal neuron culture model for which the critical developmental stages have been well characterized (Dotti *et al.*, 1988). At 1 DIV, a stage corresponding to the emergence of few minor neurites and preceding the axonal polarization (stage 2; Dotti *et al.*, 1988), CD3 $\zeta$  immunoreactivity was highly concentrated at the tip of growing neurites, closely associated with growth cones (Figure 3B). We found that  $92 \pm 3\%$  of the neurites exhibited CD3 $\zeta$  immunoreactivity at their tips (74 neurites



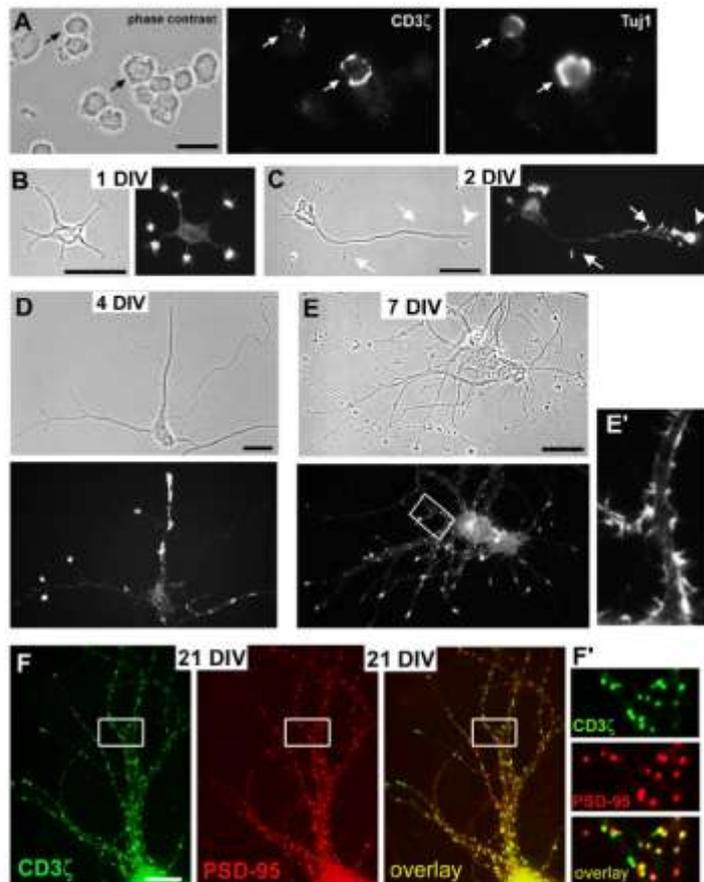
**Figure 2.** Distribution of CD3 $\zeta$  immunoreactivity in the rat brain. (A) In the parietal cortex, CD3 $\zeta$ -immunoreactive cells are detected throughout the six layers, but immunolabeled neuronal processes predominate in layers V and VI (B–E). The comparison between the distribution of CD3 $\zeta$  immunoreactivity in rat brain slices as revealed by Ab36 (B–E) and Ab22 (B'–E') antibodies. Both antibodies give rise to a virtually identical labeling pattern, as shown here in the cerebral cortex (B, B', C, and C') and hippocampus (D, D', E, and E'). At high magnification in the cerebral cortex (C and C') and in the dentate gyrus of the hippocampus immunolabeled with Ab36 (F), most CD3 $\zeta$ -expressing cells exhibit a neuronal morphology and are immunolabeled within both perikarya (arrows in C, C', and F) and dendritic processes (arrowheads in C, C', and F). (G–J) Double immunolabeling of hippocampal sections with Ab36 CD3 $\zeta$  antibody (green) and the markers (red) NeuN for neurons (G), RIP for oligodendrocytes (H), GFAP for astrocytes (I), and CD11b/c for microglia (J). Scale bars, (A) 300  $\mu$ m; (B and E) 75  $\mu$ m; (C, F, and G–J) 15  $\mu$ m; (D) 1 mm.

analyzed from 18 cells). At 2 DIV, a stage of selective axon elongation in which the longest neurite corresponds to the growing axon (stage 3; Dotti *et al.*, 1988), CD3 $\zeta$  was still accumulated at the tip of the processes, with equal distribution observed for axons and minor neurites (Figure 3C). In addition, high CD3 $\zeta$  immunoreactivity was also detected within small nascent protrusions localized along neurites, corresponding to potential future ramifications (Figure 3C). At 4–5 DIV, characterized by continuing axonal growth and differentiation of minor neurites into dendrites (stage 4; Dotti *et al.*, 1988), CD3 $\zeta$  distribution was similar to that observed at 2 DIV, with a further specific enrichment of CD3 $\zeta$  immunoreactivity at the tips of processes. Nevertheless, unlike at 2 DIV, at 4–5 DIV CD3 $\zeta$  showed a marked preferential localization with dendrites than with axons (Figure 3D), as confirmed by double-labeling experiments of CD3 $\zeta$  with the dendritic marker MAP2 and the axonal marker tau-1 (Figure 4, A and B). Although CD3 $\zeta$  immunoreactivity was observed in the somatodendritic domain of virtually all neurons, only a few immunopositive axons were detected. By 7–10 DIV (stage 5; Dotti *et al.*, 1988), which is marked by continued maturation of axonal and dendritic arbors, CD3 $\zeta$  immunoreactivity was still highly compartmentalized at the tips of dendrites, and profusely associated with filopodia and spine-like protrusions of the somatodendritic domain (Figure 3, E and E'). At 21 DIV, when neurons have reached a mature stage characterized by the formation of synaptic contacts, CD3 $\zeta$  immunoreactivity was distributed in clusters that largely overlapped with the postsynaptic marker PSD-95 (Figure 3, F and F'). However, not all, but

a subset of PSD95-expressing synapses was immunopositive for CD3 $\zeta$ , and conversely a fraction of CD3 $\zeta$  clusters were colocalized with PSD-95 (Figure 3F'). To examine in detail the CD3 $\zeta$  cellular distribution within growth cones in young neurons, double-staining experiments on 3 DIV neurons were performed with Ab36 CD3 $\zeta$  antibody and either TRITC-phalloidin or anti-tubulin  $\beta$  III antibody, to visualize the respective F-actin- and microtubule-rich regions of the growth cone (Figure 4, C and D). CD3 $\zeta$  immunoreactivity largely overlapped with the actin meshwork concentrated in the peripheral region of the growth cone, but was only rarely associated with the extending filopodia (Figure 4C). The central region, characterized by bundles of microtubules was mostly devoid of CD3 $\zeta$  labeling (Figure 4D). Altogether, analysis of the developmental pattern of CD3 $\zeta$  immunoreactivity in cultured neurons showed that it is expressed early during neuron differentiation and is associated with growth cones and filopodial protrusions throughout development. As the neurons mature, CD3 $\zeta$  immunoreactivity becomes mainly restricted to the somatodendritic compartment where it is enriched at synaptic sites.

#### *CD3 $\zeta$ Clustering at the Tips of Neurites Is Dependent on Filamentous Actin and Protein Tyrosine Kinases of the Syk/ZAP-70 Family*

Because CD3 $\zeta$  was associated with F-actin-rich regions, we tested the role of actin filaments in localizing CD3 $\zeta$  at growth cones and filopodia. Neurons were treated with 1  $\mu$ M cytochalasin D for 24 h to disrupt actin microfilaments and were subsequently immunostained for CD3 $\zeta$ . This ma-

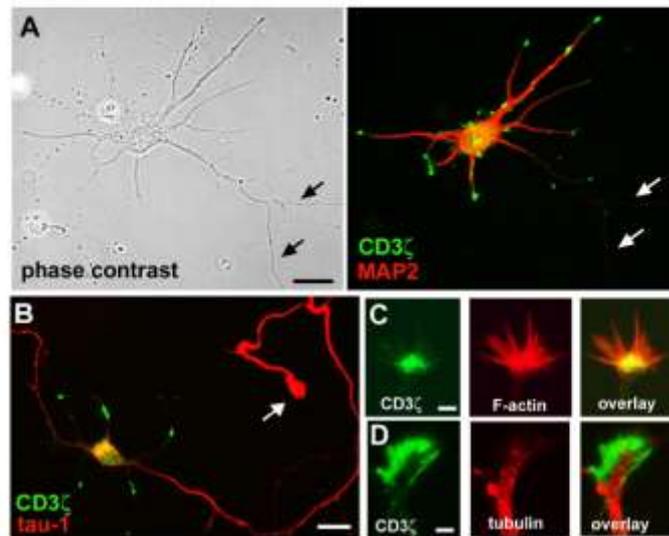


**Figure 3.** Developmental distribution of CD3 $\zeta$  in neurons derived from neural stem cells and in hippocampal neurons in culture from 1 to 21 DIV. (A) Neural stem cells cultured as neurospheres were dissociated, plated on glass coverslips, and fixed 2 h later in PFA for the immunodetection of CD3 $\zeta$  and Tuj1 (Tubulin  $\beta$  III), used as a neuronal marker. The immunopositive CD3 $\zeta$  cells are all immunoreactive for Tuj1 (arrows), corresponding to newly differentiated neurons. (B–E) Hippocampal neuron cultures were fixed at 1 (B), 2 (C), 4 (D), 7 (E), and 21 (F) DIV and were immunolabeled for CD3 $\zeta$ . From 1–7 DIV, the paired phase-contrast image is shown to visualize cell morphology. At 1 and 2 DIV (B and C), CD3 $\zeta$  immunoreactivity is selectively associated with minor neurite endings, axonal growth cones (arrowhead in C), and protrusions emerging along the growing axon (arrows in C). At 4 DIV (D), CD3 $\zeta$  immunoreactivity is highly enriched at the tips of dendrites and short branches. At 7 DIV (E) CD3 $\zeta$  immunoreactivity is still observed at the tip of dendrites and branches and is also abundantly associated with filopodia and spine-like protrusions distributed along dendritic processes, as shown at higher magnification of the boxed region (E'). (F) Neurons at 21 DIV were fixed and immunolabeled for CD3 $\zeta$  (green) and the postsynaptic marker PSD-95 (red). Numerous CD3 $\zeta$  clusters are distributed along dendritic processes that partially colocalized with PSD-95 at synaptic sites as shown at higher magnification of the boxed region (F'). Scale bars, (A and B) 5  $\mu$ m; (C) 10  $\mu$ m; (D–F) 15  $\mu$ m.

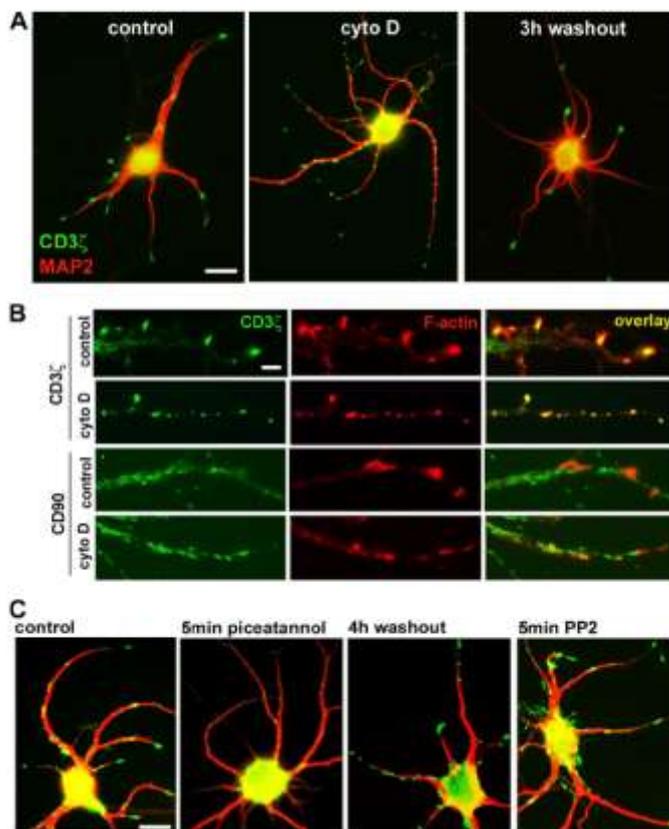
nipulation caused a pronounced redistribution of CD3 $\zeta$  in numerous small puncta dispersed along dendrites but no longer concentrated at dendritic tips or filopodia (Figure 5A). Interestingly, the dispersed CD3 $\zeta$  clusters remained highly associated with the translocated F-actin puncta, suggesting a close molecular interaction between CD3 $\zeta$  and actin filaments (Figure 5B). Cytochalasin D treatment did not affect the distribution of Thy-1 (other name CD90), a GPI-linked membrane protein expressed on neurons in the nervous system (Morris, 1985; Mahanthappa and Patterson, 1992), suggesting that cytochalasin D did not cause a general remodeling of the neuronal plasma membrane that would affect the distribution of all membrane-associated proteins (Figure 5B). The cytochalasin D-induced redistribution of CD3 $\zeta$  was significantly reversed after 3 h of cytochalasin D washout (Figure 5A), supporting a major role of actin in the dynamic regulation of CD3 $\zeta$  clustering in and out of neurite endings and filopodia.

In immune cells, protein tyrosine kinases of the Syk/ZAP-70 family play a crucial role in the function of CD3 $\zeta$  by regulating its association with effector molecules (Chan *et al.*, 1994). Considering the close relationships between the phosphorylation-regulated activation of signaling molecules and their subcellular distribution, we investigated whether inhi-

bition of Syk/ZAP-70 kinases would affect CD3 $\zeta$  accumulation at growth cones and filopodia. Neurons at 7 DIV were treated from 5 min to 2 h with 10  $\mu$ M piceatannol to inhibit Syk/ZAP-70, and CD3 $\zeta$  distribution was studied by immunofluorescence. As of 5 min of piceatannol treatment, the CD3 $\zeta$  immunoreactive clusters were completely dispersed, and a decrease in the overall staining intensity of CD3 $\zeta$  was observed (Figure 5C). The piceatannol-induced CD3 $\zeta$  dispersal was significantly reversible after 4 h of washout. Although the main action attributed to piceatannol is to inhibit Syk/ZAP-70 kinases, a few studies have reported that piceatannol might also inhibit the Src protein tyrosine kinase lck (Geahlen and McLaughlin, 1989). We thus tested whether a global inhibition of the Src protein tyrosine kinases family (including lck) with 1  $\mu$ M PP2 (Figure 5C) or a selective inhibition of lck with 100 nM damnacanthal, would affect CD3 $\zeta$  distribution similarly as piceatannol. As another control, neurons were also treated with the phosphoinositide 3-kinase inhibitor wortmannin (50 nM). No modification of CD3 $\zeta$  distribution was noticed upon PP2, damnacanthal, or wortmannin treatments compared with untreated neurons at any of the time points examined (from 5 min to 2 h). These data suggest that phosphorylation events medi-



**Figure 4.** CD3 $\zeta$  is concentrated at dendritic tips and filopodia and is selectively associated with the peripheral region of the growth cone. (A) Neurons at 7 DIV were fixed and immunolabeled for CD3 $\zeta$  (green) and the dendritic marker MAP2 (red). CD3 $\zeta$ -immunoreactivity is mostly confined to the somato-dendritic compartment and is not detected in the axon, defined as a MAP2-negative process (arrows). (B) Double labeling of CD3 $\zeta$  (green) and the axonal marker tau-1 (red) of 7 DIV neurons show that the axonal trunk and growth cone (arrow) are devoid of CD3 $\zeta$  immunoreactivity. (C) At growth cones of 2–3 DIV neurons, CD3 $\zeta$  immunoreactivity (green) is localized to the peripheral actin-rich region labeled with TRITC-phalloidin (red), but is mostly excluded from the extending filopodia. (D) The central region of the growth cone, defined as a microtubule-rich region immunolabeled with TuJ1 antibody (red), is devoid of CD3 $\zeta$  immunoreactivity. Scale bars, (A and B) 20  $\mu$ m; (C and D) 2.5  $\mu$ m.



**Figure 5.** The selective concentration of CD3 $\zeta$  at dendritic tips depends on filamentous actin and on protein tyrosine kinases of the Syk/ZAP-70 family. (A) Neurons at 7 DIV were either left untreated (control) or were exposed for 24 h to 1  $\mu$ M of cytochalasin D to depolymerize actin (cyto D), and fixed and immunolabeled for CD3 $\zeta$  (green) and MAP2 (red). Cytochalasin D treatment induced a redistribution of the large CD3 $\zeta$  clusters localized at dendritic tips to small puncta dispersed along dendrites, whereas MAP2 immunostaining was unaffected. A 3-h washout after cytochalasin D treatment resulted in significant reversal that shows reaccumulation of CD3 $\zeta$  at dendritic tips (3-h washout). (B) Control neurons and cytochalasin D-treated neurons are double-labeled for either CD3 $\zeta$  or CD90 (green) and for F-actin with TRITC-phalloidin (red). In control neurons CD3 $\zeta$  strictly colocalizes to F-actin-rich subdomains identified as filopodia and dendritic tips. In cytochalasin-treated neurons, CD3 $\zeta$  remains associated to the dispersed F-actin puncta, which become evenly distributed within dendrites. The distribution of CD90 shows no relationship with F-actin labeling in control neurons and is unaffected by the cytochalasin D treatment. (C) Neurons at 7 DIV were either left untreated (control) or treated for 5 min with 10  $\mu$ M piceatannol, an inhibitor of the protein tyrosine kinases of the Syk/ZAP-70 family, and were then immunolabeled for CD3 $\zeta$  (green) and MAP2 (red). Blockade of the Syk/ZAP-70 kinases induces a rapid loss of CD3 $\zeta$  aggregates, an effect reversed after 4 h of washout. By contrast, CD3 $\zeta$  distribution was unaffected by 1  $\mu$ M PP2, an inhibitor of the Src-family of protein tyrosine kinases. Scale bars, (A and C) 20  $\mu$ m; (B) 2  $\mu$ m.

ated by protein tyrosine kinases of the Syk/ZAP-70 family play a major role in regulating CD3 $\zeta$  distribution in neurons.

#### CD3 $\zeta$ siRNA and a CD3 $\zeta$ Mutant Lacking the Sites of Tyr Phosphorylation Impairs Dendrite Formation

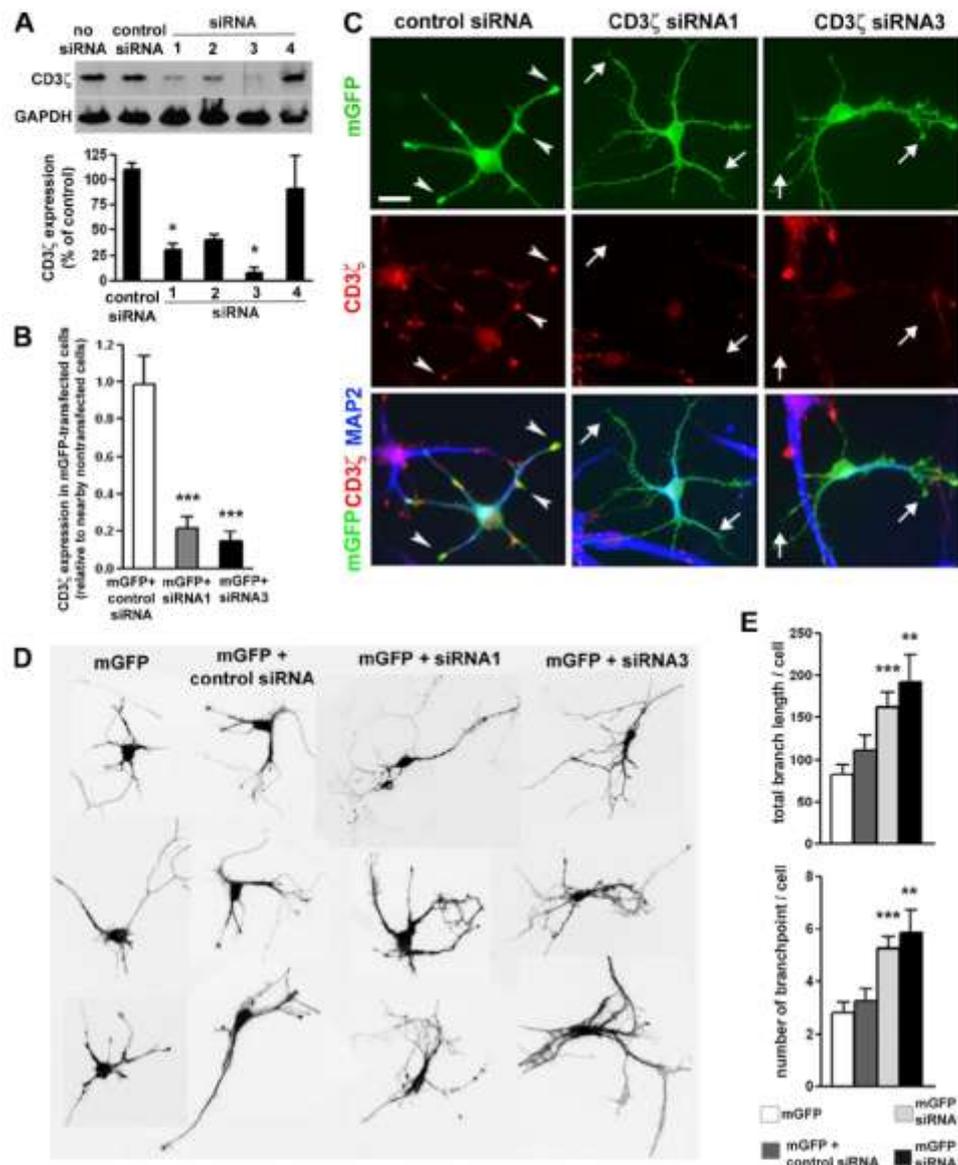
On the basis of our finding that CD3 $\zeta$  proteins are specifically enriched at dendritic tips and protrusions during the stage of dendrite elaboration and maturation, we examined whether CD3 $\zeta$  might play a role in dendrite development. For this purpose, we used an siRNA approach to knock-down CD3 $\zeta$  protein expression in cortical neurons culture. Four CD3 $\zeta$  siRNA sequences against different regions of CD3 $\zeta$  were tested for their efficacy and specificity in suppressing CD3 $\zeta$  expression in CD3 $\zeta$ -transfected COS-7 cells (Figure 6A). We found by immunoblot analysis that two of them, siRNA1 and siRNA3, caused a marked reduction of the CD3 $\zeta$  protein expression reaching  $30.7 \pm 6.1$  and  $7.5 \pm 5.2\%$ , respectively, of the signal intensity of CD3 $\zeta$ -expressing cells transfected with a control siRNA (Figure 6A). To test whether these siRNAs can decrease the expression level of endogenous CD3 $\zeta$  in neurons, cultured neurons at 3 DIV were cotransfected with either siRNA1 or siRNA3 and mGFP as a marker of transfection, and CD3 $\zeta$  immunoreactivity was quantified in the dendritic arbor at 5 DIV. The addition of siRNA1 or siRNA3 induced a severe reduction of endogenous CD3 $\zeta$  level that dropped to  $21.7 \pm 6.0\%$  ( $n = 23$ ) and  $14.5 \pm 5.1\%$  ( $n = 16$ ), respectively, of the averaged CD3 $\zeta$  signal intensity measured in nearby untransfected neurons (Figure 6, B and C). The control siRNA did not affect CD3 $\zeta$  immunostaining as compared with neighboring untransfected cells ( $98.7 \pm 14.8\%$ ,  $n = 34$ ; Figure 6, B and C). The siRNA transfections were performed at 3 DIV, and the cells were analyzed at 5 DIV, a period corresponding to a stage of dendrite differentiation in this neuronal culture model (Dotti *et al.*, 1988). Therefore, these experiments allowed us to test the contribution of CD3 $\zeta$  to dendrite formation. We observed that CD3 $\zeta$  siRNA1 and siRNA3 significantly increased the size and the complexity of the dendritic arbor analyzed after immunostaining for CD3 $\zeta$  and the dendritic marker MAP2. The total length of dendritic branches recorded per cell was increased by 90 and 123% upon transfection with siRNA1 or siRNA3, respectively, compared with control cells transfected with a control siRNA (control siRNA,  $86.5 \pm 11.1 \mu\text{m}$ ,  $n = 63$  cells; CD3 $\zeta$  siRNA1,  $163.3 \pm 16.3 \mu\text{m}$ ,  $n = 52$  cells,  $p < 0.001$ ; CD3 $\zeta$  siRNA3,  $192.6 \pm 31.6 \mu\text{m}$ ,  $n = 29$  cells,  $p < 0.01$ , Student's *t* test; Figure 6, C–E). Moreover, the amount of dendritic branching recorded per cell was increased by 80 and 99% after transfection with CD3 $\zeta$  siRNA1 or siRNA3, respectively, compared with siRNA control cells (control siRNA,  $2.94 \pm 0.34$ ,  $n = 63$  cells; CD3 $\zeta$  siRNA1,  $5.29 \pm 0.45$ ,  $n = 52$  cells,  $p < 0.001$ ; CD3 $\zeta$  siRNA3,  $5.86 \pm 0.89$ ,  $n = 29$  cells,  $p < 0.01$ ; Figure 6, C–E). There was no detectable difference in the dendritic arbor between either siRNA1 and siRNA3 ( $p = 0.43$  for the branching length and  $p = 0.57$  for the dendritic branchpoint number) or between mGFP and control siRNA ( $p = 0.63$  for the branching length and  $p = 0.60$  for the dendritic branchpoint number; values for mGFP are  $79.1 \pm 10.5 \mu\text{m}$  for the branching length,  $n = 56$  cells, and  $2.70 \pm 0.31$  for the number of dendritic branches,  $n = 56$  cells), supporting that the changes in dendritic morphology induced by CD3 $\zeta$ -targeted siRNAs were specifically linked to the reduced CD3 $\zeta$  expression.

To further test the role of CD3 $\zeta$  in dendrite outgrowth, we generated a putative dominant negative form of CD3 $\zeta$ . In T lymphocytes, CD3 $\zeta$  is the critical signaling subunit of the TCR-CD3 complex involved in the recognition of MHC-peptide complex present on antigen-presenting cells. The function of CD3 $\zeta$  critically depends on its 3 ITAMs, a se-

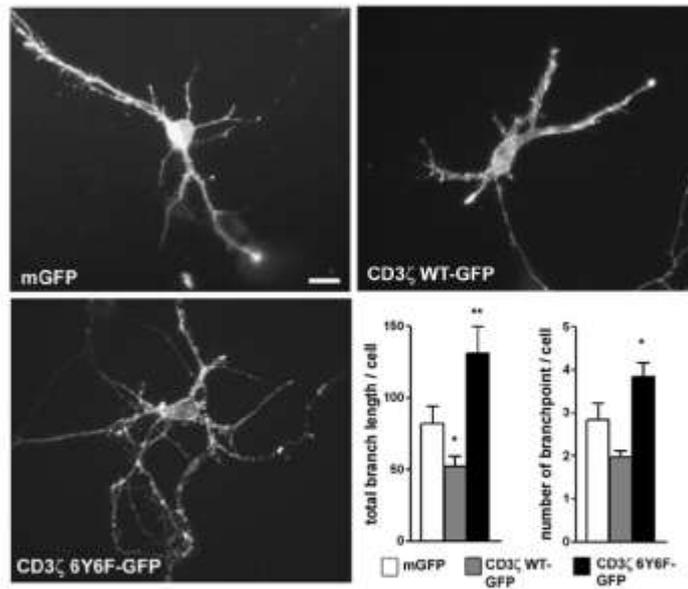
quence motif containing two Tyr phosphorylation sites (YxxLx(6–8)YxxL). On TCR-MHC binding, Src family protein tyrosine kinases Lck or Fyn phosphorylates the Tyr residues in the ITAMs, triggering the T-cell response. Substitution of the six Tyr into Phe residues completely abolished the ability of CD3 $\zeta$  to be phosphorylated and therefore converts CD3 $\zeta$  into an inactive form (Lowin-Kropf *et al.*, 1998; van Oers *et al.*, 2000). We thus replaced the six Tyr of CD3 $\zeta$  fused to GFP (CD3 $\zeta$ -GFP) by Phe and the resulting CD3 $\zeta$ -6Y6F-GFP construct was overexpressed in cultured neurons by transfection at 3 DIV. Neurons were transfected with mGFP alone as control. Cells were fixed at 5 DIV and immunostained for MAP2 to label dendrites. In neurons overexpressing the CD3 $\zeta$ -6Y6F-GFP mutant, the dendrites were more elaborate than in the mGFP-transfected cells (Figure 7). Quantification revealed that the total branch length recorded per cell and branchpoint number per cell increased by 65 and 42%, respectively (for total branch length per cell, mGFP,  $79.1 \pm 10.5 \mu\text{m}$ ,  $n = 56$  cells; CD3 $\zeta$ -6Y6F-GFP,  $130.9 \pm 18.8 \mu\text{m}$ ,  $n = 32$  cells,  $p < 0.01$ ; for number of branchpoint per cell, mGFP,  $2.70 \pm 0.31$ ,  $n = 56$  cells; CD3 $\zeta$ -6Y6F-GFP,  $3.84 \pm 0.46$ ,  $n = 32$  cells,  $p < 0.05$ ; Figure 7). Thus, expression of CD3 $\zeta$ -6Y6F-GFP affected dendritic development by promoting branchpoint formation, suggesting that CD3 $\zeta$  may be normally involved in dendrite patterning, likely through an ITAM-based mechanism. Conversely, transfection with CD3 $\zeta$ -GFP induced a reduction in the length and number of dendritic branches recorded per cell by 34% ( $52.5 \pm 6.8 \mu\text{m}$ ,  $n = 58$  cells,  $p < 0.05$ ) and 27% ( $1.97 \pm 0.20$ ,  $n = 58$  cells,  $p = 0.051$ ), respectively, compared with control cells transfected with mGFP (see values above; Figure 7). This result suggests that endogenous CD3 $\zeta$  activity was limiting in dendrite patterning and that increasing CD3 $\zeta$  concentration through neuron transfection with CD3 $\zeta$ -GFP further inhibited dendrite development. Altogether, these results suggest that neuronal CD3 $\zeta$  is a negative regulator of dendrite outgrowth and patterning.

#### Application of CD3 $\zeta$ Antibody to Cultured Neurons Elicits Intracellular Calcium Increase and Inhibits Dendrite Development

If CD3 $\zeta$  is a negative regulator of dendrite development, then activating endogenous protein should impair dendrite formation. We used a CD3 $\zeta$  antibody targeted to the short extracellular domain of the molecule (antibody Ab22) as a tool that might potentially activate cell surface CD3 $\zeta$ . Initial characterization of the intracellular signaling mediated by CD3 $\zeta$  in leukocytes relied on the use of chimeric receptors comprising a heterologous cell-surface molecule fused to the cytoplasmic tail of CD3 $\zeta$  (Irving and Weiss, 1991; Letourneur and Klausner, 1991). Application of antibodies to the cell surface of these chimeric receptors recapitulated the signal transduction events normally elicited by the intact TCR-CD3 receptor complex that leads to  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization (Wange and Samelson, 1996). We applied a similar strategy with CD3 $\zeta$  Ab22 antibody to measure  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization by fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  imaging on live neurons. It is important to note that these experiments were carried out in the absence of the glial feeder layer, thus enabling measurement of direct effects of CD3 $\zeta$  antibody on hippocampal neurons, because the low-density culture system we used represents a virtually pure neuron culture model (Goslin *et al.*, 1998). Experiments were performed in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  to measure the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from internal compartments. Application of  $5 \mu\text{g/ml}$  control antibody (3g8) targeted to the extracellular sequence of the human transmembrane protein CD16 for 10 min did not affect the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  level



**Figure 6.** CD3 $\zeta$  siRNA1 and siRNA3 promoted dendritic branching. (A) The efficacy and specificity of CD3 $\zeta$  siRNA was tested in CD3 $\zeta$ -transfected COS-7 cells by immunoblot analysis. An equal amount of protein was loaded for each lane, and the same samples were blotted against CD3 $\zeta$  and GAPDH antibodies. CD3 $\zeta$  siRNA1 and siRNA3 induced a strong suppression of CD3 $\zeta$  expression. The signal intensity for each CD3 $\zeta$  siRNA is plotted below as a percent of the signal intensity obtained from control CD3 $\zeta$ -expressing COS-7 cells without siRNA. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM from four experiments (\*  $p < 0.05$  compared with cells transfected with CD3 $\zeta$  plasmid alone). (B) Quantification of CD3 $\zeta$  expression in cultured cortical neurons transfected at 3 DIV and immunostained at 5 DIV. Data are presented as a ratio of anti-CD3 $\zeta$  fluorescence intensity in mGFP-positive cells relative to nearby nontransfected cells  $\pm$  SEM (for each condition  $n > 15$  cells from at least two cultures; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (C) Knockdown of neuronal CD3 $\zeta$  expression by siRNA1 and siRNA3. Neurons were cotransfected at 3 DIV with mGFP (green) and either control siRNA or CD3 $\zeta$  siRNA1 or siRNA3, and were immunolabeled at 5 DIV for CD3 $\zeta$  (red) and the dendritic marker MAP2 (blue). Neurons transfected with a control siRNA show a robust CD3 $\zeta$  immunoreactivity on dendrites (arrowheads). Neurons transfected with either CD3 $\zeta$  siRNA1 or siRNA3 show a decreased CD3 $\zeta$  immunoreactivity in dendrites (arrows) and a more complex dendritic arbor compared with control cells. (D) mGFP-labeled cultured cortical neurons transfected at 3 DIV and fixed at 5 DIV sampled from cultures transfected with mGFP alone, or mGFP + control siRNA, or mGFP + CD3 $\zeta$  siRNA1, or mGFP + CD3 $\zeta$  siRNA3. (E) Quantification of the total length and number of dendritic branches per cell. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of 29–63 cells from two to four independent cultures. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Student's *t* test) compared with corresponding measurements in cells cotransfected with mGFP and the control siRNA. Scale bar, 20  $\mu$ m.



**Figure 7.** Overexpression of a CD3 $\zeta$  mutant lacking the Tyr phosphorylation sites in the ITAMs increased dendritic branching. Neurons transfected at 3 DIV with mGFP or CD3 $\zeta$ -GFP or CD3 $\zeta$ -6Y6F-GFP were fixed at 5 DIV and were visualized by the GFP signal. The dendritic arborization was increased in neurons expressing CD3 $\zeta$ -6Y6F-GFP but reduced in neurons expressing CD3 $\zeta$ -GFP compared with control neurons transfected with mGFP. The length and number of dendritic branches were measured and data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 32–58 cells from three independent experiments (bottom right). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (Student's  $t$  test) compared with corresponding measurements in cells transfected with mGFP. Scale bar, 15  $\mu$ m.

(Figure 8A). By contrast, the subsequent application of Ab22 CD3 $\zeta$  antibody at 5  $\mu$ g/ml onto the same cells induced a rapid rise of  $[Ca^{2+}]_i$  in 87% of the neurons (46/53 recorded cells from three experiments; Figure 8A), indicating that CD3 $\zeta$  Ab22 antibody induced a  $Ca^{2+}$  release from internal stores, likely through a direct binding to cell surface-associated CD3 $\zeta$  proteins. These data suggest that Ab22 exhibits agonist-like activity and activates endogenous CD3 $\zeta$  triggering a  $[Ca^{2+}]_i$  increase. We thus applied CD3 $\zeta$  Ab22 antibody to neuron culture to analyze the effects of endogenous CD3 $\zeta$  recruitment on dendrite patterning. The CD3 $\zeta$  antibody (5  $\mu$ g/ml) was added at 1 and 3 DIV, and the cells were fixed at 5 DIV for MAP2 immunostaining followed by dendrite morphology analysis. The control cultures consisted in the addition of either the vehicle alone or the control antibody 3g8. No difference was observed in the dendritic arbor between the vehicle- and 3g8-treated neurons (for total branch length, vehicle-treated cells,  $46.7 \pm 7.6 \mu$ m,  $n = 52$  cells, control antibody treated-cells,  $52.0 \pm 9.1 \mu$ m,  $n = 40$  cells;  $p = 0.65$ ; for branchpoint number, vehicle-treated cells,  $1.71 \pm 0.21$ ,  $n = 52$  cells control antibody treated-cells,  $1.83 \pm 0.23$ ,  $n = 40$  cells,  $p = 0.72$ ; Figure 8, B and C). By contrast, substantial modifications of the dendritic profile were observed after CD3 $\zeta$  Ab22 application. Both the total branch length and the number of branchpoints per cell were decreased by 78 and 67%, respectively, compared with control 3g8-treated cells (for total branch length per cell,  $11.3 \pm 2.3 \mu$ m,  $n = 50$  cells,  $p < 0.001$ ; for branchpoint number per cell,  $0.60 \pm 0.12$ ,  $p < 0.001$ ; Figure 8, B and C). Collectively, our data suggest that activating endogenous CD3 $\zeta$  inhibits dendrite development in young neurons.

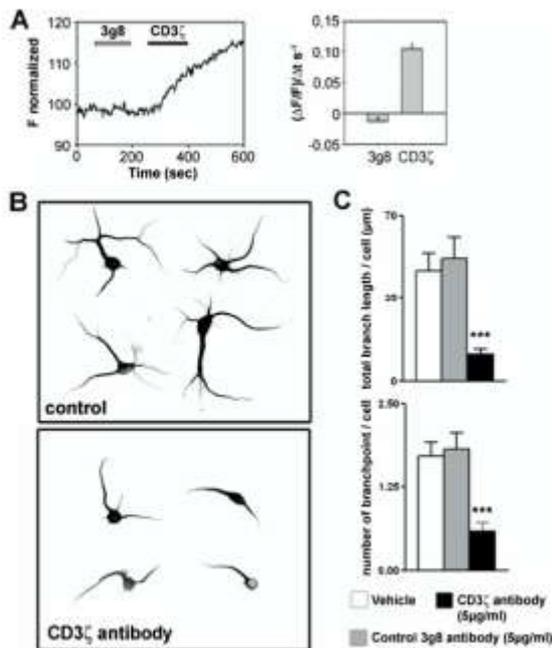
## DISCUSSION

A novel idea is emerging that a large molecular repertoire is common to the nervous and immune systems, which might reflect the existence of neuronal functions for molecules originally characterized in the immune system. Alterna-

tively, such converging repertoire might also reflect physiological interactions between the two systems (Boulanger and Shatz, 2004; Steinman, 2004). Here, we show that the signaling adaptor protein CD3 $\zeta$ , first described in the immune system (Samelson *et al.*, 1985), has a previously uncharacterized role in regulating neuronal development. CD3 $\zeta$  distribution in developing neurons showed a selective association with dendritic filopodia and growth cones, actin-rich structures involved in neurite growth and patterning. Loss-of-function experiments by siRNA-mediated knock-down or by overexpression of CD3 $\zeta$  mutated in its three ITAMs affected dendrite formation with an increased number and length of dendritic branching. Conversely, overexpressing CD3 $\zeta$  or activating endogenous CD3 $\zeta$  by a CD3 $\zeta$  antibody reduced the length and number of dendritic branches. Altogether, our findings reveal a novel role for CD3 $\zeta$  in the nervous system, highlighting its contribution to dendrite development through an ITAM-based mechanism.

### Neuronal Expression of CD3 $\zeta$ and Its Selective Association with Growth Cones and Filopodia in Young Neurons

We provide biochemical and immunohistochemical evidence for the expression of CD3 $\zeta$  in the CNS. Previous studies reported the detection of CD3 $\zeta$  mRNA in feline and mouse brain sections (Corriveau *et al.*, 1998; Huh *et al.*, 2000), but our study is the first to demonstrate expression of CD3 $\zeta$  protein in brain slices and to identify the CD3 $\zeta$ -expressing cells, which were predominantly neurons and to a lesser extent oligodendrocytes. The cellular distribution of CD3 $\zeta$  immunoreactivity analyzed in developing hippocampal neurons showed a prominent enrichment at dendritic growth cones and filopodia in young neurons and at dendritic spines in mature neurons. These aforementioned neuronal subdomains are all actin-rich structures, and we indeed found in young neurons a striking colocalization of CD3 $\zeta$  with F-actin. Treatment with the actin depolymerization agent cytochalasin D caused a dispersal of CD3 $\zeta$  clus-



**Figure 8.** Application of CD3 $\zeta$  antibody to hippocampal cultured neurons induces an intracellular calcium increase and reduces the complexity of the dendritic arbor. (A) Cultured neurons at 7 DIV were loaded with Fluo-3 AM and exposed sequentially to the control antibody 3g8 (5  $\mu$ g/ml) and to the CD3 $\zeta$  Ab22 antibody (5  $\mu$ g/ml). Left, representative relative fluo-3 fluorescence in response to 3g8 and CD3 $\zeta$  antibodies shows a rise in  $[Ca^{2+}]_i$  after CD3 $\zeta$  antibody application.  $[Ca^{2+}]_i$  increase was observed in 46 of 53 neurons from three different cultures. Right, bar graph comparing the slope of fluorescence increase triggered by 3g8 and CD3 $\zeta$  antibodies. (B) MAP2-immunolabeled 5 DIV hippocampal neurons sampled from cultures treated with a control antibody (control) or with CD3 $\zeta$  Ab22 antibody (CD3 $\zeta$  antibody). (C) The length and number of dendritic branches were measured on neurons immunostained for MAP2. Results are shown as the mean  $\pm$  SEM of 40–52 cells from two experiments. \*\*\*  $p < 0.001$  (Student's *t* test) compared with corresponding measurements in 3g8 antibody-treated cells. Scale bar, 80  $\mu$ m.

ters, indicating that the accumulation of CD3 $\zeta$  at growth cones and filopodia was dependent on F-actin. Interestingly, CD3 $\zeta$  remained colocalized with F-actin puncta spread throughout the neuropile upon actin disruption, suggesting a close molecular interaction between CD3 $\zeta$  and F-actin. Association of CD3 $\zeta$  with the actin cytoskeleton has been reported in lymphocytes and proposed to play a role in the dynamic rearrangements of the actin cytoskeleton required for the formation and stabilization of the immunological synapse at the interface between antigen-presenting cells and T lymphocytes (Caplan *et al.*, 1995; Rozdzial *et al.*, 1995; Krummel and Davis, 2002). In neurons, the localization of CD3 $\zeta$  at cytoskeletal F-actin-rich structures positions it ideally for a role in the regulation of dendritic shaping driven by actin-based mechanisms. CD3 $\zeta$  could directly bind actin filaments to regulate actin network assembly or act as an adaptor molecule that would connect membrane receptors and signaling proteins linked to the assembly/stability of actin cytoskeleton. In the latter case, one possibility is that

the effects of CD3 $\zeta$  recruitment on neuronal morphogenesis involves the actin-related RhoA GTPase, which has been documented to inhibit dendritic growth and branch extension (Li *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000).

#### Novel Function of CD3 $\zeta$ in Dendrite Patterning

Our finding that CD3 $\zeta$  was enriched at dendritic growth cones and filopodia in young neurons suggests a potential role for this molecule in dendrite morphogenesis. Accordingly, the inhibition of CD3 $\zeta$  expression in cultured neurons by siRNA increased dendrite outgrowth, a phenotype similarly obtained by expression of a CD3 $\zeta$  mutant lacking the Tyr phosphorylation sites within the ITAMs. The effects of the CD3 $\zeta$ -6Y6F-GFP mutant were likely due to the competition with the endogenous protein and suggest that the role of CD3 $\zeta$  on dendritic shaping required tyrosine-based signaling motifs. Conversely, CD3 $\zeta$  overexpression, which presumably mimicked an increased recruitment of the protein, and CD3 $\zeta$  antibody application, which acts through the activation of endogenously expressed CD3 $\zeta$ , both reduced the length and number of dendritic branches. Together, these data suggest that CD3 $\zeta$  acts as a negative regulator of dendritic arbor complexity through an ITAM-based mechanism.

A critical role for CD3 $\zeta$  in the establishment of the neuronal network has been described in the retinogeniculate projections of the visual system (Huh *et al.*, 2000). In mice lacking CD3 $\zeta$ , the area of retinal projections in the lateral geniculate nucleus is abnormally larger and ectopic clusters of inputs were observed, indicating that CD3 $\zeta$  is required to precisely restrict the field of retinal projections (Huh *et al.*, 2000). The fact that CD3 $\zeta$  mRNA was detected in the lateral geniculate nucleus suggests a postsynaptic expression of CD3 $\zeta$  proteins in this area (Huh *et al.*, 2000). In light of our results, one could hypothesize that CD3 $\zeta$  deletion might result in an excessive dendritic arborization of lateral geniculate nucleus neurons, which in turn might induce a broader extension of axonal inputs, as observed in mutant mice.

#### Potential Mechanisms for CD3 $\zeta$ Neuronal Function

In T-cell, CD3 $\zeta$  is a component of the CD3 complex that also includes CD3 $\epsilon$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  subunits. The CD3 $\epsilon$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  have all been detected in the cerebellum and CD3 $\epsilon$ -deficient mice, in which CD3- $\gamma$  and CD3- $\delta$  protein levels are also reduced, showed an impaired neuronal architecture of Purkinje neurons (Nakamura *et al.*, 2007). The cerebral expression of the four CD3 subunits raised the possibility that a kind of CD3 complex may exist in the brain similarly as in the immune system. However, CD3 $\zeta$  mRNA was not detected in the cerebellum (Nakamura *et al.*, 2007), and we were not able to detect CD3 $\epsilon$  at the protein level in forebrain samples (data not shown). Thus CD3 $\zeta$  appeared to be expressed in distinct brain regions different from those for CD3 $\epsilon$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ , suggesting that CD3 $\zeta$  may function independently from the other CD3 subunits, as reported in NK cells (Lanier, 2001). One major issue that still needs to be resolved is the identification of the CD3 $\zeta$ -bearing neuronal receptor, which could be either a known immune or neuronal receptor. Several CD3 $\zeta$ -containing receptors have been identified in the immune system in both T-cells and NK cells. The most documented is the TCR in T-cells, which interacts with peptide-MHC complexes present on target cells (Samelson, 2002). The mRNA for the  $\beta$  subunit of the TCR has been detected in the murine CNS, but the absence of genomic recombination and the failure to detect the corresponding protein in brain homogenates make it unlikely to be the neuronal CD3 $\zeta$ -containing receptor (Syken and Shatz, 2003; Nishiyori

*et al.*, 2004). Other CD3 $\zeta$ -containing receptors have been characterized in NK cells that belong to the family of activating receptors named NKp46, NKp30, and the low-affinity Fc receptor for IgG (Lanier, 2001). The neuronal expression of these NK cell-activating receptors has not been reported so far, and further studies will be required to identify the nature of the neuronal CD3 $\zeta$ -associated receptor.

Also critical to understanding how CD3 $\zeta$  control neuronal morphogenesis is identifying downstream signaling. We have found that mutagenesis of the three ITAMs reproduced the siRNA phenotype, suggesting that the function of CD3 $\zeta$  in normal dendrite development was mediated through an ITAM-dependent mechanism. The current model of TCR-CD3 signaling in T-cells assumes that the ITAM phosphorylation of CD3 $\zeta$  is a molecular switch that triggers the docking of SH2-containing signaling molecules such as the protein tyrosine kinases of the Syk/ZAP-70 family, which subsequently induces downstream signaling events including Ca<sup>2+</sup> mobilization and activation of the Rho and Ras pathways (Pitcher and van Oers, 2003; Baniyash, 2004). In agreement with this, we found that CD3 $\zeta$  recruitment by a CD3 $\zeta$  antibody induced an elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in cultured neurons. The expression of ZAP-70-related tyrosine kinase in developing neurons (Ishijima *et al.*, 1995; Yoneya *et al.*, 1998), and the reported role of Syk in neurite outgrowth (Tsujimura *et al.*, 2001; Callagher *et al.*, 2007) is compatible with the notion that Syk/ZAP-70 could be a relevant component of the intracellular transduction pathway connecting CD3 $\zeta$  activation and Ca<sup>2+</sup> mobilization to negatively control dendritic shaping.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pr. J. P. Soullillou for his support and to Dr. Ashton-Chess for editing the manuscript. We thank Dr. D. Chabanne and R. Brion for help in T lymphocyte preparation, R. Thunard for expert technical assistance, and K. Moriyoshi for kindly providing cDNA. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Fondation Progrès, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (F.R.C.), and by an INSERM/Région Pays de la Loire postdoctoral fellowship (S.J.B.). G.L. is a recipient of a tenure position supported by the Centre National de la Recherche Scientifique.

#### REFERENCES

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., 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.

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

Caplan, S., Zelig, 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. USA* 92, 4768–4772.

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, 535–592.

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.

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

Fink, C. C., Bayer, K. U., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., Schulman, H., and Meyer, T. (2003). Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron* 39, 283–297.

Furukawa, T., Itoh, M., Krueger, N. X., Streuli, M., and Saito, H. (1994). Specific interaction of the CD45 protein-tyrosine phosphatase with tyrosine-phosphorylated CD3 zeta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10928–10932.

Gallagher, D., Gutierrez, H., Gavalda, N., O'Keeffe, G., Hay, R., and Davies, A. M. (2007). Nuclear factor-kappaB activation via tyrosine phosphorylation of inhibitor kappaB-alpha is crucial for ciliary neurotrophic factor-promoted neurite growth from developing neurons. *J. Neurosci.* 27, 9664–9669.

García, G. G., and Müller, R. A. (1997). Differential tyrosine phosphorylation of zeta chain dimers in mouse CD4 T lymphocytes: effect of age. *Cell Immunol.* 175, 51–57.

Geahlen, R. L., and McLaughlin, J. L. (1989). Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 241–245.

Goslin, K., Asmussen, H., and Banker, G. (1998). Rat hippocampal neurons in low density culture. In: *Culturing Nerve Cells*, ed. G. Banker and K. Goslin, Cambridge, MA: MIT Press, 339–370.

Huh, G. S., Boulangier, L. M., Du, H., Riquelme, P. A., Beutz, T. M., and Shatz, C. J. (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 289, 2155–2159.

Irving, B. A., and Weiss, A. (1991). The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64, 891–901.

Ishijima, S. A., Zeng, Y. X., Kurashima, C., Usuyama, M., Shirasawa, T., Sakamoto, K., and Hirokawa, K. (1995). Expression of ZAP-70 gene in the developing thymus and various nonlymphoid tissues of embryonic and adult mice. *Cell Immunol.* 165, 278–283.

Itoh, Y., Matsuura, A., Kneibuchi, M., Honda, R., Takayama, S., Ichimiya, S., Kon, S., and Kikuchi, K. (1993). Structural analysis of the CD3 zeta/eta locus of the rat. Expression of zeta but not eta transcripts by rat T cells. *J. Immunol.* 151, 4705–4717.

Jaworski, J., Spangler, S., Seeburg, D. P., Hoogenraad, C. C., and Sheng, M. (2005). Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J. Neurosci.* 25, 11300–11312.

Krummel, M. F., and Davis, M. M. (2002). Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 66–74.

Kumanogoh, A., and Kikutani, H. (2003). Immune semaphorins: a new area of semaphorin research. *J. Cell Sci.* 116, 3463–3470.

Lanier, L. L. (2001). On guard—activating NK cell receptors. *Nat. Immunol.* 2, 23–27.

Lebret, F., and Klausner, R. D. (1991). T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor zeta family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8905–8909.

Li, Z., Van Aelst, L., and Cline, H. T. (2000). Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat. Neurosci.* 3, 217–225.

Lohmann, C., Myhr, K. L., and Wong, K. O. (2002). Transmitter-evoked local calcium release stabilizes developing dendrites. *Nature* 418, 177–181.

Lowin-Kropf, B., Shapiro, V. S., and 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.

Mahanthappa, N. K., and Patterson, P. H. (1992). Thy-1 involvement in neurite outgrowth: perturbation by antibodies, phospholipase C, and mutation. *Dev. Biol.* 150, 47–59.

Malissen, M. *et al.* (1993). T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *EMBO J.* 12, 4347–4355.

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.

Morris, R. (1985). Thy-1 in developing nervous tissue. *Dev. Neurosci.* 7, 133–160.

Nakamura, K. *et al.* (2007). CD3 and immunoglobulin G Fc receptor regulate cerebellar functions. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5128–5134.

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.

Pitcher, L. A., and van Oers, N. S. (2003). T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol.* 24, 554–560.

Polleux, F., Morrow, T., and Ghosh, A. (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404, 567–573.

- 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.
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12, 4565–4574.
- 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.
- Samelson, L. E. (2002). Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 371–394.
- Samelson, L. E., Harford, J. B., and Klausner, R. D. (1986). Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 43, 223–231.
- Sancho, J., Peter, M. E., Franco, R., Danielian, S., Kang, J. S., Fagard, R., Woods, J., Reed, J. C., Kamoun, M., and Terhorst, C. (1993). Coupling of GTP-binding to the T cell receptor (TCR) zeta-chain with TCR-mediated signal transduction. *J. Immunol.* 150, 3230–3242.
- 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.
- Sourial-Bassillios, N., Eklof, 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.
- Steinman, L. (2004). Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat. Immunol.* 5, 575–581.
- Syken, J., and Shatz, C. J. (2003). Expression of T cell receptor beta locus in central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13048–13053.
- Terry-Lorenzo, R. T., Roadcap, D. W., Otsuka, T., Blanpied, T. A., Zamorano, P. L., Garner, C. C., Shonkikar, S., and Ehlers, M. D. (2005). Neurabin/protein phosphatase-1 complex regulates dendritic spine morphogenesis and maturation. *Mol. Biol. Cell* 16, 2349–2362.
- Tsujimura, T., Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., Ishihara, I., Mitsui, N., Takahashi, S., and Yamamura, H. (2001). Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma F19 cells. *FEBS Lett.* 489, 129–133.
- van Oers, N. S., Tohlen, B., Malissen, B., Moomaw, C. R., Afendis, S., and Slaughter, C. A. (2000). The 21- and 23-kD forms of TCR zeta are generated by specific ITAM phosphorylations. *Nat. Immunol.* 1, 322–328.
- Wange, R. L., and Samelson, L. E. (1996). Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5, 197–205.
- Whitford, K. L., Marillat, V., Stein, E., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Chodotal, A., and Ghosh, A. (2002). Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron* 33, 47–61.
- Wong, W. T., Faulkner-Jones, B. E., Sanes, J. R., and Wong, R. O. (2000). Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho. *J. Neurosci.* 20, 5024–5036.
- Wu, J. Y., Feng, L., Park, H. T., Havlioglu, N., Wen, L., Tang, H., Bacon, K. B., Jiang, Z., Zhang, X., and Rao, Y. (2001). The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature* 410, 948–952.
- Yoneya, H., Yanagi, S., Inatome, R., Ditzig, J., Hitomi, T., Amatsu, M., and Yamamura, H. (1998). Antibodies directed against ZAP-70 cross-react with a 66-kDa tyrosine kinase in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 140–143.

# Résultats supplémentaires

## Introduction

La protéine adaptatrice CD3 $\zeta$  a récemment été montrée comme étant associée sélectivement aux sites post-synaptiques des synapses excitatrices glutamatergiques dans la rétine et dans l'hippocampe (Xu et al., 2010). Sa délétion génétique induit une diminution de la transmission synaptique médiée par les récepteurs au glutamate dans la rétine et une altération de la plasticité synaptique de l'hippocampe caractérisée par une LTP augmentée et une disparition de la LTD impliquant ainsi cette protéine dans les fonctions synaptiques (Xu et al., 2010; Huh et al., 2000). Les mécanismes à l'origine de ces altérations restent à l'heure actuelle inconnus. Nous avons observé une expression synaptique de la protéine CD3 $\zeta$  sur les neurones de l'hippocampe à 15-21 DIV. Les agrégats de la protéine CD3 $\zeta$  sont colocalisés avec plusieurs protéines post-synaptiques telles que la sous-unité NR1 du récepteur au glutamate de type NMDA, la protéine d'échafaudage PSD-95 et l'actine. Ces constituants des synapses excitatrices sont concentrés au niveau des épines dendritiques des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Sorra et Harris, 2000), représentant la population majeure de nos cultures de neurones. Nous avons donc émis l'hypothèse d'un rôle de la protéine CD3 $\zeta$  dans la régulation du nombre et de la composition moléculaire des synapses excitatrices glutamatergiques dans le SNC. Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de CD3 $\zeta$  sur la composition moléculaire des synapses par Western blot (Figure 1). Pour ce faire, nous nous sommes intéressés aux constituants des synapses excitatrices glutamatergiques. Nous avons analysé les sous-unités NR1 et NR2A (Standley et al., 2000; Liu et al., 2004), sous-unités majeures des récepteurs au glutamate de type NMDA et les protéines importantes pour la fonction de ces récepteurs comme la CaMKII et la PSD-95 (Li et al., 2003; Yashiro et Philpot, 2008). La sous-unité GluR2, sous-unité critique pour le fonctionnement des récepteurs au glutamate de type AMPA a été aussi examinée (Seidenman et al., 2003). Afin de déterminer si l'action de CD3 $\zeta$  a un impact sur la composition des synapses inhibitrices GABAergiques, les sous-unités  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 principalement exprimées par les récepteurs GABAergiques de type GABA A ont été étudiées (Herd et al., 2008; Uusi-Oukari et Korpi, 2010).

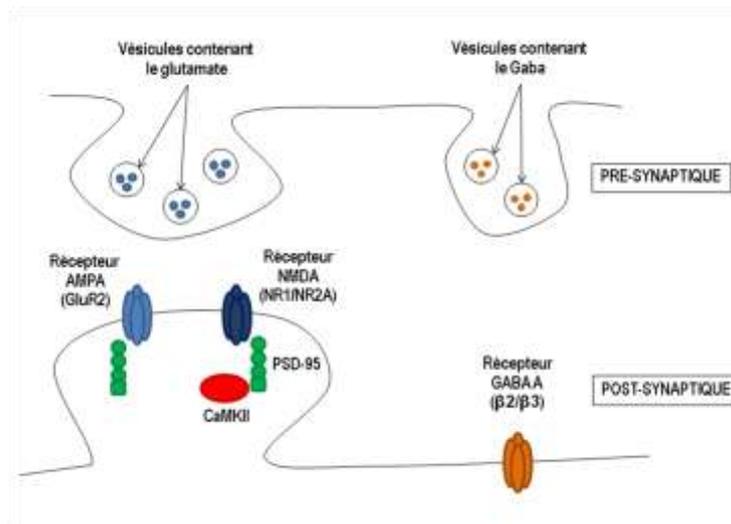


Figure 1 : Schéma d'une synapse excitatrice glutamatergique et d'une synapse inhibitrice GABAergique.

Par ailleurs, les anomalies de la transmission excitatrice glutamatergique et de la plasticité synaptique mises en évidence chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  peuvent avoir des conséquences sur le niveau d'anxiété et de dépression ou encore sur les capacités d'apprentissage de ces souris. Aucune étude comportementale des souris CD3 $\zeta^{-/-}$  n'ayant été réalisée, nous avons donc dans une seconde partie, effectué une série de tests comportementaux afin de déterminer le rôle de la protéine CD3 $\zeta$  sur certains comportements liés à l'anxiété et la dépression. De plus, certaines analyses immunohistochimiques menées par V. Pelliier-Monnin et N. Noraz (INSERM U842) ont mis en évidence la colocalisation de la protéine CD3 $\zeta$  avec le marqueur des dendrites MAP2 dans la couche plexiforme externe des bulbes olfactifs chez le rat âgé de 7 jours. C'est à cette période que s'établissent dans cette région les synapses entre les dendrites des cellules mitrales et celles des cellules granulaires. Ces observations nous ont amenés à proposer un rôle de CD3 $\zeta$  dans l'établissement de ces synapses et de ce fait dans la fonction olfactive. Des études de la fonction olfactive chez les souris sauvages et déficientes pour le CD3 $\zeta$  ont par conséquent été réalisées.

## Matériels et méthodes

### Animaux

Les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  (Malissen et al., 1993), ayant un fond génétique C57BL/6, sont issues d'accouplement entre souris hétérozygotes pour le CD3 $\zeta$ .

### Génotypage

Afin d'identifier le génotype des souris, une biopsie de la queue à l'âge de 7 jours est réalisée. Les morceaux de queue sont incubés 3h dans une solution pH 8,3 contenant 5M de NaCl, 1M de Tris, 10% de SDS, 0,5M d'EDTA ainsi que de la protéinase K (10mg/ml) à 55°C. Les suspensions ainsi obtenues sont centrifugées 5 min à 13000 rpm puis diluées au 20<sup>ème</sup> dans de l'eau avant de faire le génotypage FastPCR. 1 $\mu$ L de chaque dilution est ensuite utilisé en Fast PCR en utilisant du Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems (AB), Foster City, CA) sur thermocycleur Veriti (AB) en respectant les conditions suivantes : 10 min à 96°C puis 40 cycles de 3sec à 96°C ; 3sec à 56°C ; 6sec à 68°C et enfin 10sec à 72°C. Les produits de PCR sont alors conservés à 4°C puis une migration est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% auquel a été ajouté du bromure d'éthidium. Les amplicons sont révélés par exposition du gel aux ultraviolets. On discrimine les animaux naturels, hétérozygotes et homozygotes par l'amplification de deux gènes : le CD3 $\zeta$  et la Néomycine qui est intercalée dans le gène CD3 $\zeta$  en cas de modification génétique empêchant la transcription de celui-ci et son amplification (lors du génotypage). Un échantillon de référence pour chaque génotype est utilisé en contrôle positif.

### Analyse protéique par Western blot

Préparation de homogénats protéiques membranaires de cortex de souris. Les cortex cérébraux de souris âgées de 2 mois sont homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur en Teflon dans une solution de Tris-HCl 10mM, pH 7,4, contenant 320mM de sucrose et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. La suspension est centrifugée à 700g pendant 10min. Le surnageant collecté est centrifugé à 100 000g pendant 30min à 4°C. Le culot, représentant la fraction protéique membranaire, est resuspendu dans une solution de Tris-HCl 10mM, pH 7,4.

Préparation de homogénats protéiques membranaires du cortex de souris enrichis en protéines synaptiques. Les cortex cérébraux de souris âgées de 2 mois sont homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur en Teflon dans une solution d'HEPES 5mM, pH 7,4, contenant 320mM de sucrose et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. La suspension est centrifugée à 700g pendant 10min. Le

surnageant collecté est centrifugé à 100 000g pendant 30min à 4°C. Le culot est resuspendu, solubilisé pendant 1h à 4°C dans une solution de Tris-HCl 5mM, pH 8,1 contenant 0,5% de TritonX-100, 320mM de sucrose et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Tampon A) puis centrifugé à 100 000g pendant 1h à 4°C. Le culot obtenu est resuspendu dans le tampon A et centrifugé à 100 000g pendant 1h à 4°C. Le culot final resuspendu dans le tampon A, représente une fraction protéique particulièrement enrichie en protéines synaptiques (fraction synaptique).

Les différentes fractions sont solubilisées dans du tampon Laemmli. Les fractions membranaires (15µg de protéines) et fractions synaptiques (7µg de protéines) sont chargées dans un gel SDS-PAGE (10% d'acrylamide) et transférées sur une membrane en nitrocellulose. La membrane est par la suite saturée avec une solution de lait 5% dissous dans du Tris-HCl 20mM, pH 7,4 contenant 0,45M de NaCl et 0,1% de Tween 20 (TBST). La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire d'intérêt dilué dans la solution de TBST contenant 5% de lait (Tableau I). Le lendemain, la membrane est lavée avec la solution de TBST et incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxidase (PO) approprié (tableau II). La membrane est révélée par un substrat chimio-luminescent (Pierce, Rockford, IL) à l'aide du révélateur d'images luminescentes LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japon). Les Western blot ont été analysés à l'aide du logiciel Image Gauge (Fujifilm, Paris, France). La moyenne de la valeur densitométrique ainsi que la SEM sont calculées à partir de 3 animaux pour chaque phénotype pour les fractions membranaires (P2) et 5 animaux pour les fractions membranaires enrichies en protéines synaptiques. L'analyse statistique est réalisée par le test de Mann Whitney.

**Tableau I : Anticorps primaires utilisés.**

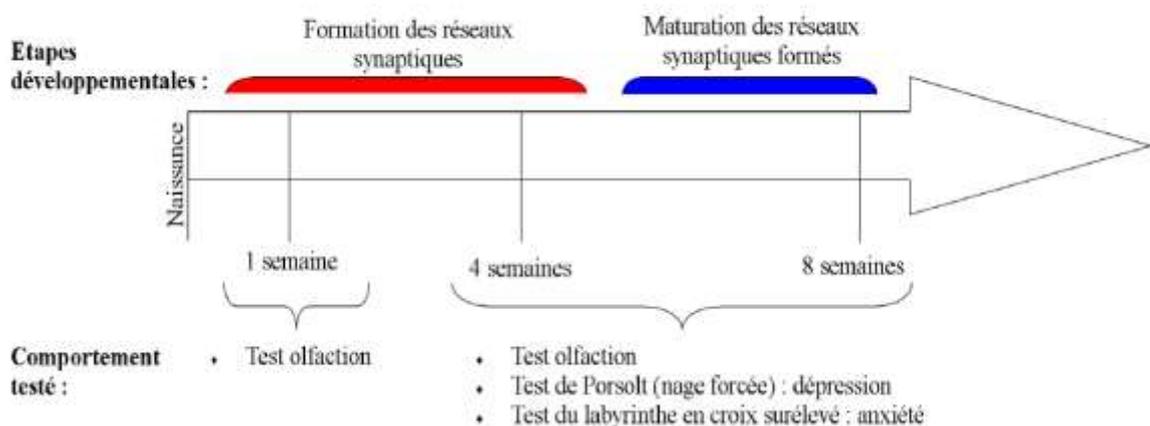
| Anticorps primaire          | Cible                                      | Référence   | Origine                       | Concentration initiale | Dilution |
|-----------------------------|--|-------------|-------------------------------|------------------------|----------|
| Anti-CamKII                 | Camoduline Kinase II                       | MA1-048     | Affinity Bioreagents          | 1,17mg/ml              | 1/2000   |
| Anti-GABA A $\beta$ 2/3     | Sous unité $\beta$ 2/3 du récepteur GABA A | MAB341      | Millipore                     | 1mg/ml                 | 1/500    |
| Anti-GAPDH (clone 6C5)      | GAPDH                                      | SC-32233    | Santa Cruz Biotechnology, INC | 0,1mg/ml               | 1/500    |
| Anti-GluR2                  | Sous unité Glur2 du récepteur AMPA         | AB1768-25UG | Millipore                     | 0,5mg/ml               | 1/1000   |
| Anti-NR1                    | Sous unité NR1 du récepteur NMDA           | 556308      | BD Pharmingen                 | 0,5mg/ml               | 1/1000   |
| Anti-NR2A                   | Sous unité NR2A du récepteur NMDA          | 07-632      | Millipore                     | 1mg/ml                 | 1/500    |
| Anti-PSD-95 (Clone 6G6-1C9) | PSD-95                                     | ab2723      | AbCam                         | 1mg/ml                 | 1/200    |
| Anti-Synapsine 1            | Synapsine 1                                | S193        | Sigma                         | 0,2mg/ml               | 1/1000   |

**Tableau II : Anticorps secondaires utilisés.**

| Anticorps secondaire        | Cible         | Référence   | Origine                | Concentration initiale | Dilution |
|-----------------------------|---------------|-------------|------------------------|------------------------|----------|
| Anti-IgG (H+L) de lapin PO  | IgG de lapin  | 111-035-144 | Jackson Immunoresearch | 0,8mg/ml               | 1/2000   |
| Anti-IgG (H+L) de souris PO | IgG de souris | 715-036-151 | Jackson Immunoresearch | 0,8mg/ml               | 1/1000   |

## Tests comportementaux et analyses

Les portées de souris, obtenues par le croisement de souris hétérozygotes pour le CD3 $\zeta$ , sont toutes testées sans connaissance de leur statut génétique et sont réparties en trois groupes après révélation de leur génotype au moment du sacrifice : un groupe d'animaux sauvages (+/+), hétérozygotes pour le CD3 $\zeta$  (+/-) et déficients pour le CD3 $\zeta$  (-/-). Ainsi au total 55 souris (20 femelles et 35 mâles) ont été testées selon le protocole expérimental suivant (Figure 2). Le nombre d'animaux mâles (CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>, n= 14 ; CD3 $\zeta$ <sup>+/-</sup>, n= 11 ; CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup>, n=10) étant supérieur à celui des femelles (CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>, n= 10 ; CD3 $\zeta$ <sup>+/-</sup>, n= 7 ; CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup>, n=3), seuls les résultats concernant les mâles seront analysés afin de présenter une étude complète.

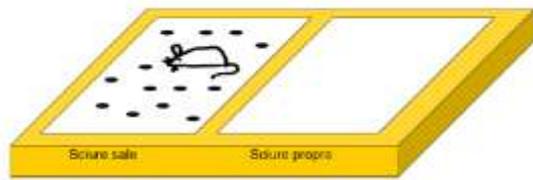


**Figure 2 : Protocole expérimental de l'étude comportementale.** L'olfaction, l'anxiété ainsi que la dépression des souris ont été testées au cours de la formation des réseaux synaptiques (4 semaines) mais également une fois la maturation de ces réseaux atteinte (8 semaines). L'olfaction a également été testée au cours de la synaptogenèse dans les bulbes olfactifs (1 semaine).

## Tests olfactifs

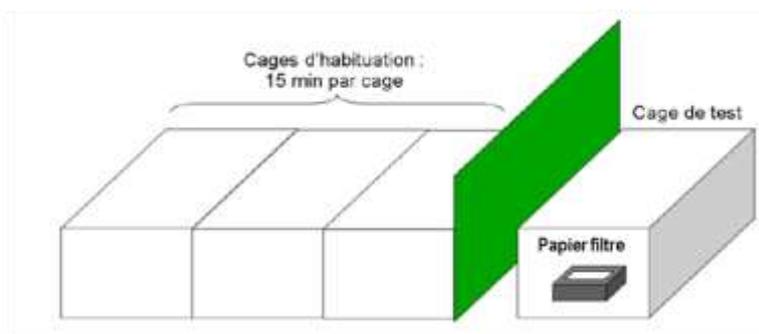
**Nouveau-nés.** Pour réaliser ce test, une boîte composée de 2 tiroirs recouverts d'un grillage à maillage fin (0,5mm) est utilisée (Figure 3). L'un des tiroirs contient de la sciure propre et l'autre de la sciure provenant de la cage de vie du souriceau (sciure sale). Au cours de ce test, les souriceaux âgés de 7 jours sont placés au milieu du dispositif et leurs comportements sont analysés pendant 2 minutes. A cet âge, les souris sont aveugles et se déplacent uniquement à l'aide de leur odorat. Le comportement des souris est enregistré avec une caméra vidéo digitale pour l'analyse. Le temps passé dans chaque compartiment est comptabilisé. L'analyse statistique a été réalisée grâce au

logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism software, Lajolla, CA) sur 13 souris CD3 $\zeta^{+/+}$ , 12 souris CD3 $\zeta^{+/-}$  et 7 souris CD3 $\zeta^{-/-}$  par le test de Kruskal-Wallis.



**Figure 3 : Dispositif pour tester l'olfaction chez les nouveau-nés.**

Adultes. Les souris sont placées individuellement dans une cage identique à celle utilisée pour le test (20 x 15 x 13 cm). Après 15min d'habituation, les souris sont transférées dans une nouvelle cage. Cette habituation est répétée 3 fois pour chaque animal (Figure 4). Juste après l'habituation, les souris sont transférées dans la cage test, et un papier filtre (5 x 5 cm) imbibé d'une solution odorante est introduit. Les papiers sont protégés par un grillage à maillage fin (0,5 mm) afin que les souris ne puissent ni le goûter ni le grignoter. Le temps passé par la souris à renifler le papier pendant 3 minutes est mesuré. La souris est considérée en train de renifler quand son museau est à 1mm maximum du dispositif. Le comportement des souris est enregistré avec une caméra vidéo digitale pour l'analyse. L'odeur utilisée est le lait de noix de coco (50%, Suzywan). L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism software, Lajolla, CA) sur 11-14 souris CD3 $\zeta^{+/+}$ , 6-10 souris CD3 $\zeta^{+/-}$  et 8-9 souris CD3 $\zeta^{-/-}$  par le test de Kruskal-Wallis.



**Figure 4 : Dispositif pour tester la préférence olfactive chez les souris âgées de 4 et 8 semaines.**

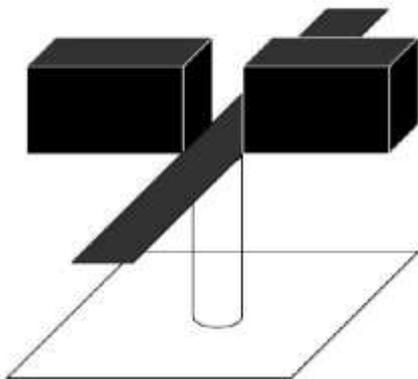
### ***Etude de la dépression : Test de Porsolt ou test de la nage forcée***

Le test de la nage forcée est réalisé en accord avec le protocole décrit par Porsolt (porsolt). Les souris sont placées dans un b cher (hauteur 40 cm, diamètre 25 cm) contenant 20 cm d'eau à 25±1 C. Le temps d'immobilisation de la souris est mesuré pendant 4 minutes. Le comportement des souris est

enregistré avec une caméra vidéo digitale pour l'analyse. Une souris est considérée comme immobile quand elle flotte ou quand elle fait des mouvements nécessaires pour le maintien de sa tête hors de l'eau. Après le test, les souris sont séchées à l'aide d'un torchon et redéposées dans leur cage. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism software, Lajolla, CA) sur 13 souris  $CD3\zeta^{+/+}$ , 11 souris  $CD3\zeta^{+/-}$  et 10 souris  $CD3\zeta^{-/-}$  par le test de Kruskal-Wallis.

### ***Etude de l'anxiété : Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze)***

Le labyrinthe en croix surélevé fait de plastique est constitué de 2 bras ouverts (16 cm x 5 cm) sans côtés et 2 bras fermés (16 cm x 5 cm x 16 cm) connecté à une plateforme centrale (5 cm x 5 cm). Le labyrinthe est surélevé de 60 cm (Figure 5). Avant le test, des souris dites « salisseuses » du même sexe que les souris à tester, sont déposées dans le labyrinthe pendant 15 minutes afin de salir le dispositif. Ensuite chaque souris à tester est placée dans le carré central et son comportement est enregistré pendant 5 minutes avec une caméra vidéo digitale pour l'analyse. Entre chaque groupe de souris de sexe opposé, le dispositif est désinfecté. Le temps passé, le nombre d'entrées ainsi que la distance parcourue dans les bras ouverts sont comptabilisés. L'ensemble de ces paramètres permet d'apprécier le degré d'anxiété et l'activité motrice de la souris. L'augmentation du temps passé et de le nombre d'entrées dans les bras ouverts par rapport aux souris sauvages sont considérés comme des indicateurs d'un comportement anxieux. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism software, Lajolla, CA) sur 10-14 souris  $CD3\zeta^{+/+}$ , 11 souris  $CD3\zeta^{+/-}$  et 10 souris  $CD3\zeta^{-/-}$  par le test de Kruskal-Wallis et Mann Whitney.



**Figure 5: Schéma représentant le labyrinthe en croix surélevé.**

## Résultats

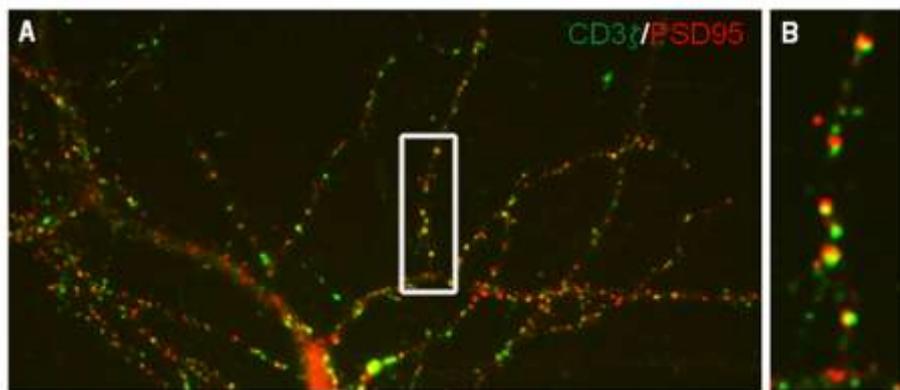
### A. Analyse biochimique des molécules synaptiques

Afin d'étudier l'expression des protéines synaptiques dans les cerveaux de souris  $CD3\zeta^{+/+}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$ , nous avons réalisé une analyse par Western blot des composants des synapses excitatrices glutamatergiques et des synapses inhibitrices GABAergiques.

#### I. Les synapses excitatrices glutamatergiques

##### a. Les récepteurs au glutamate de type AMPA et NMDA

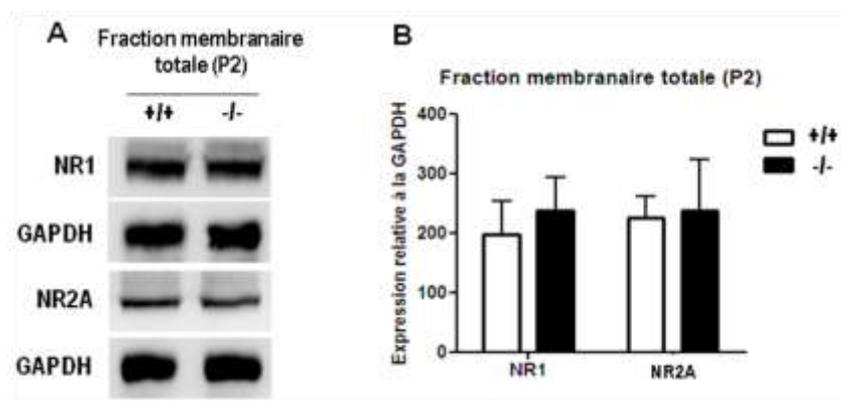
Nos données immunocytochimiques réalisées sur des neurones d'hippocampe à 21 DIV montrent que la protéine  $CD3\zeta$  est associée aux synapses excitatrices glutamatergiques marquées par la protéine PSD-95 (Figure 6).



**Figure 6. Distribution de la protéine  $CD3\zeta$  dans les neurones d'hippocampe à 21 DIV *in vitro* (A, B)**  
*Les neurones sont fixés et doublement marqués avec la protéine  $CD3\zeta$  (vert) et la PSD-95 (rouge), un marqueur post-synaptique des synapses excitatrices glutamatergiques. La protéine  $CD3\zeta$ , distribuée en agrégats le long des prolongements dendritiques, colocalise avec la protéine PSD-95. L'encadré est agrandi en B.*

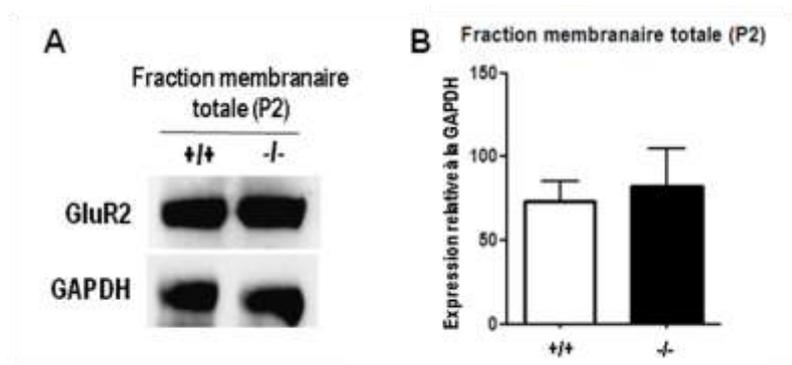
Nos résultats suggèrent ainsi que la protéine  $CD3\zeta$  est un composant des synapses excitatrices glutamatergiques.

Afin d'étudier l'impact de l'absence du  $CD3\zeta$  sur le niveau d'expression de protéines des synapses excitatrices, les fractions membranaires totales, préparées à partir de souris  $CD3\zeta^{-/-}$  et  $CD3\zeta^{+/+}$  ont été dans un premier temps examinées (Figures 7A, B et 8A, B). Les résultats montrent que le niveau d'expression des sous-unités NR1 et NR2A du récepteur NMDA et celui de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA n'est pas modifié chez les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  par rapport aux souris  $CD3\zeta^{+/+}$ .



**Figure 7. Analyse de l'expression protéique dans les fractions membranaires totales des sous-unités du récepteur NMDA chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup> et CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> par Western blot.**

**(A)** Le niveau d'expression protéique des sous-unités NR1 et NR2A du récepteur NMDA n'est pas modifié chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> par rapport aux souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>. **(B)** Quantification densitométrique. Les données sont représentées par les moyennes  $\pm$  SEM relatives à la GAPDH (n= 3 pour chaque génotype).

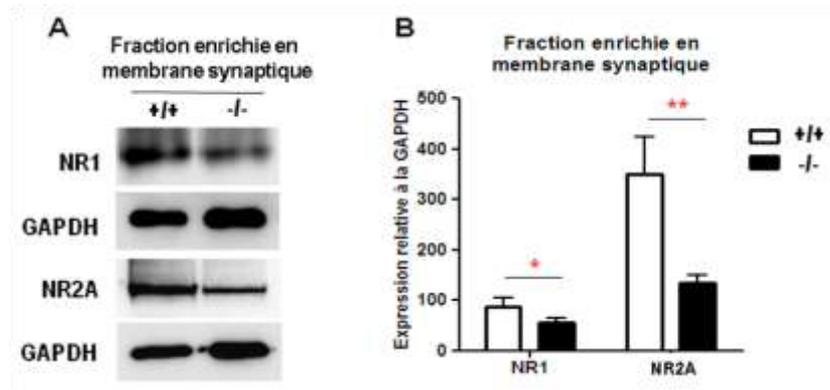


**Figure 8. Analyse de l'expression protéique dans les fractions membranaires totales de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup> et CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> par Western blot.**

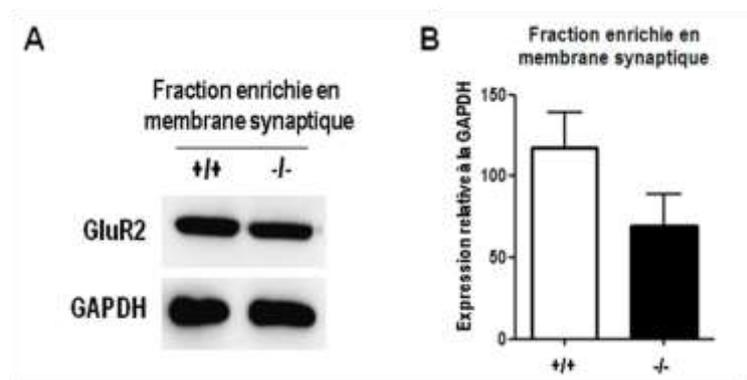
**(A)** Le niveau d'expression protéique de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA n'est pas modifié chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> par rapport aux souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>. **(B)** Quantification densitométrique. Les données sont représentées par les moyennes  $\pm$  SEM relatives à la GAPDH (n= 3 pour chaque génotype).

Les échantillons analysés correspondent à la fraction membranaire totale de cerveaux de souris (fraction P2) qui incluent les membranes plasmiques et compartiments cytoplasmiques. Afin d'analyser plus finement la composition moléculaire au niveau des synapses, nous avons examiné le niveau d'expression de ces protéines dans des fractions membranaires enrichies en structures synaptiques. Dans ces fractions, le niveau d'expression des sous-unités NR1 et NR2A est significativement réduit chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> en comparaison avec les souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup> (NR1 CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>, 85,93  $\pm$  17,99 ; NR1 CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup>, 55,37  $\pm$  8,18, p = 0,047 ; NR2A CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>, 349,85  $\pm$  73,95 ; NR2A CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup>, 134,00  $\pm$  7,7 ; p = 0,004) (Figure 9A, B) tandis que celui de la sous-unité GluR2 n'est significativement pas modifié (Figure 10A, B). Ces données suggèrent que l'absence de CD3 $\zeta$  affecte l'accumulation

synaptique des sous-unités NR1 et NR2A sans interférer avec leur niveau d'expression cellulaire global.



**Figure 9.** Analyse de l'expression protéique dans les fractions membranaires enrichies en protéines synaptiques des sous-unités du récepteur NMDA chez les souris  $CD3\zeta^{+/+}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  par Western blot. (A) Le niveau d'expression protéique des sous-unités NR1 et NR2A du récepteur NMDA est significativement diminué chez les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  par rapport aux souris  $CD3\zeta^{+/+}$ . (B) Quantification densitométrique. Les données sont représentées par les moyennes  $\pm$  SEM relatives à la GAPDH ( $n=5$  pour chaque génotype ; \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,005$ ; Test de Mann Whitney).

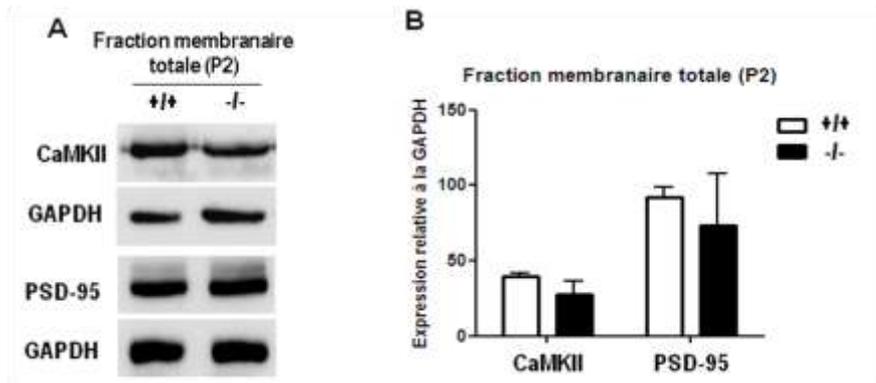


**Figure 10.** Analyse de l'expression protéique dans les fractions membranaires enrichies en protéines synaptiques de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA chez les souris  $CD3\zeta^{+/+}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  par Western blot. (A) Le niveau d'expression protéique de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA n'est pas modifié chez les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  par rapport aux souris  $CD3\zeta^{+/+}$ . (B) Quantification densitométrique. Les données sont représentées par les moyennes  $\pm$  SEM relatives à la GAPDH ( $n=5$  pour chaque génotype).

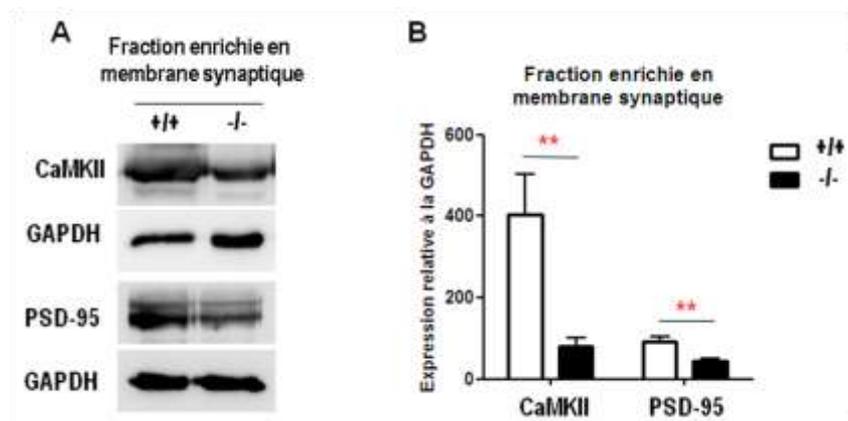
#### b. Molécules associées au récepteur au glutamate de type NMDA : PSD-95 et CaMKII

Le niveau d'expression des protéines importantes pour le fonctionnement et la signalisation des récepteurs au glutamate et connues pour être régulées par l'activité synaptique dans la densité post-synaptique a été examiné (Figure 11 et 12). Dans les fractions membranaires totales, le niveau d'expression protéique des protéines PSD-95, protéine d'échafaudage majeure interagissant avec les récepteurs NMDA (Kornau et al., 1995) et CaMKII, une protéine kinase importante dans l'induction de la plasticité synaptique (Fukunaga et Miyamoto, 2000) n'est pas affecté (Figure 11A, B). En revanche dans les fractions membranaires enrichies en protéines synaptiques, leur expression

protéique est significativement diminuée chez les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  en comparaison avec les souris  $CD3\zeta^{+/+}$  (CaMKII  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $402,73 \pm 100,13$  ; CaMKII  $CD3\zeta^{-/-}$ ,  $81,34 \pm 20,50$  ; PSD-95  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $91,03 \pm 13,80$  ; PSD-95  $CD3\zeta^{-/-}$ ,  $44,75 \pm 6,17$  ;  $p = 0,0079$  et  $p = 0,004$  respectivement) (Figure 12A, B). Ces données suggèrent donc que l'absence de  $CD3\zeta$  affecte la composition protéique de la densité post-synaptique notamment le niveau d'expression de la CaMKII et de la PSD-95.



**Figure 11. Analyse de l'expression protéique dans les fractions membranaires totales des protéines de signalisation PSD-95 et CaMKII chez les souris  $CD3\zeta^{+/+}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  par Western blot. (A) Le niveau d'expression protéique des protéines PSD-95 et CaMKII n'est pas modifié chez les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  par rapport aux souris  $CD3\zeta^{+/+}$ . (B) Quantification densitométrique. Les données sont représentées par les moyennes  $\pm$  SEM relatives à la GAPDH ( $n=3$  pour chaque génotype).**



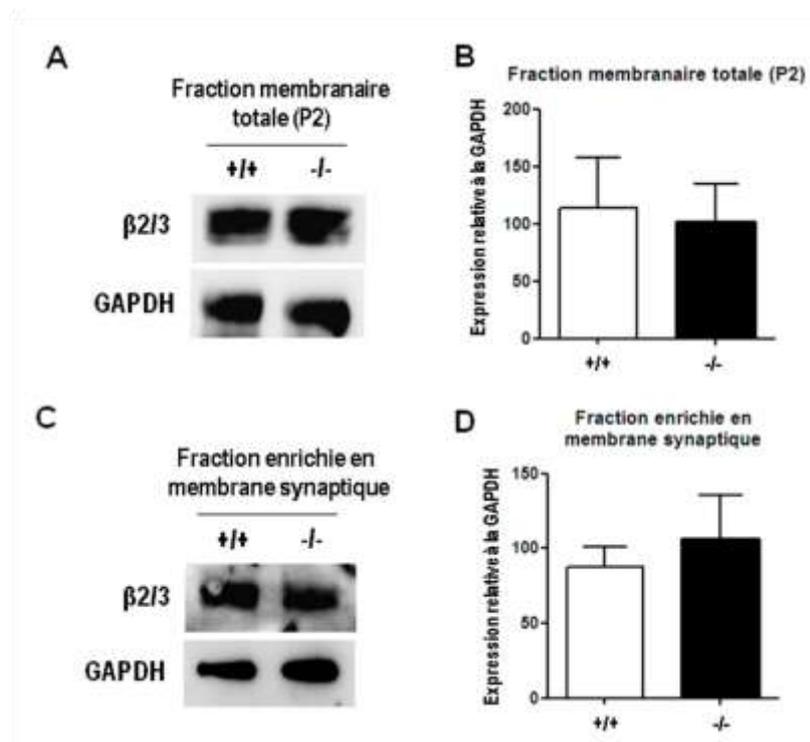
**Figure 12. Analyse de l'expression protéique dans les fractions membranaires enrichies en protéines synaptiques des protéines de signalisation PSD-95 et CaMKII chez les souris  $CD3\zeta^{+/+}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  par Western blot. (A) Le niveau d'expression protéique des protéines PSD-95 et CaMKII est significativement diminué chez les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  par rapport aux souris  $CD3\zeta^{+/+}$ . (B) Quantification densitométrique. Les données sont représentées par les moyennes  $\pm$  SEM relatives à la GAPDH ( $n=5$  pour chaque génotype ;  $**p < 0,008$  ; Test de Mann Whitney).**

L'absence de  $CD3\zeta$  n'affecte pas le niveau d'expression global des constituants des synapses glutamatergiques. En revanche, chez les souris déficientes, alors que le niveau d'expression synaptique de la sous-unité GluR2 est inchangé, celui des sous-unités NR1, NR2A et des protéines

PSD-95 et CaMKII sont significativement diminués. Il semble donc que l'absence de la protéine CD3 $\zeta$  affecte principalement l'accumulation des sous-unités des récepteurs de type NMDA et leurs protéines associées au niveau des synapses.

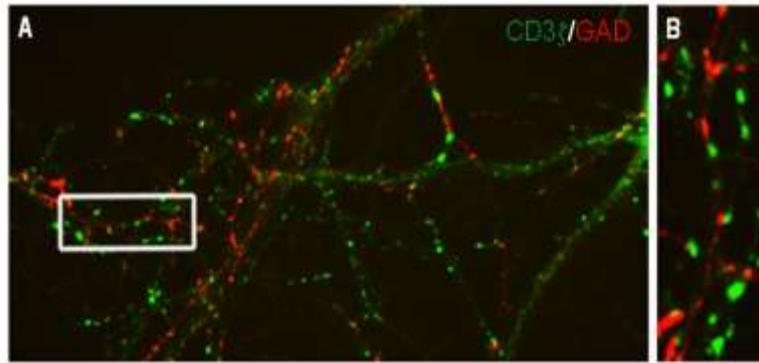
## II. Les synapses inhibitrices GABAergiques : le récepteur au GABA de type GABA A.

Nous avons vu des modifications majeures des niveaux d'expression des sous-unités NR1 et NR2A des récepteurs au glutamate de type NMDA. Pour déterminer si des altérations de la composition moléculaire des synapses inhibitrices étaient également induites chez les souris déficientes pour la protéine CD3 $\zeta$ , nous avons examiné le niveau d'expression de sous-unités majeures des récepteurs ionotropiques GABA A, les sous-unités  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 dans les fractions membranaires totales (Figure 13A, B) et enrichies en protéines synaptiques (Figure 13C, D). Nos résultats montrent que le niveau d'expression de ces sous-unités n'est pas altéré chez les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  par rapport aux souris CD3 $\zeta^{+/+}$  suggérant ainsi que le CD3 $\zeta$  n'a pas d'impact sur ces sous-unités (Figure 13).



**Figure 13.** Analyse de l'expression protéique dans les fractions membranaires totales (A, B) et enrichies en protéines synaptiques (C, D) des sous-unités  $\beta$ 2/3 du récepteur GABA A chez les souris CD3 $\zeta^{+/+}$  et CD3 $\zeta^{-/-}$  par Western blot. (A, C) Le niveau d'expression protéique des sous-unités  $\beta$ 2/3 du récepteur GABA A n'est pas modifié chez les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  par rapport aux souris CD3 $\zeta^{+/+}$ . (B, D) Quantification densitométrique. Les données sont représentées par les moyennes  $\pm$  SEM relatives à la GAPDH ( $n= 3-5$  pour chaque génotype).

De plus, certaines de nos données immunocytochimiques réalisées sur des neurones d'hippocampe à 21 DIV montrent que la protéine CD3 $\zeta$  n'est pas associée aux synapses inhibitrices GABAergiques marquées par la protéine GAD (Glutamic acid decarboxylase) (Figure 14).



**Figure 14. Distribution de la protéine CD3 $\zeta$  dans les neurones d'hippocampe à 21 DIV *in vitro* (A, B)**  
 Les neurones sont fixés et doublement marqués avec la protéine CD3 $\zeta$  (vert) et la GAD (rouge), un marqueur pré-synaptique des synapses inhibitrices GABAergiques. La protéine CD3 $\zeta$ , distribuée en agrégats le long des prolongements dendritiques, ne colocalise pas avec la protéine GAD. L'encadré est agrandi en B.

Nos résultats suggèrent ainsi que la protéine CD3 $\zeta$  n'est pas un composant des synapses inhibitrices de type GABAergique et ne semble pas avoir d'impact sur le niveau d'expression et l'agrégation synaptique ses récepteurs GABAergiques de type GABA A.

## B. Analyse comportementale

L'analyse biochimique révèle que la protéine CD3 $\zeta$  a un impact sur l'expression de certains composants des synapses excitatrices glutamatergiques. Nous avons donc voulu savoir si ces modifications de la composition protéique au niveau des synapses pouvaient être corrélées à des perturbations du comportement des souris CD3 $\zeta^{-/-}$ .

### I. L'absence de la protéine CD3 $\zeta$ n'a pas d'impact majeur sur le poids des souris.

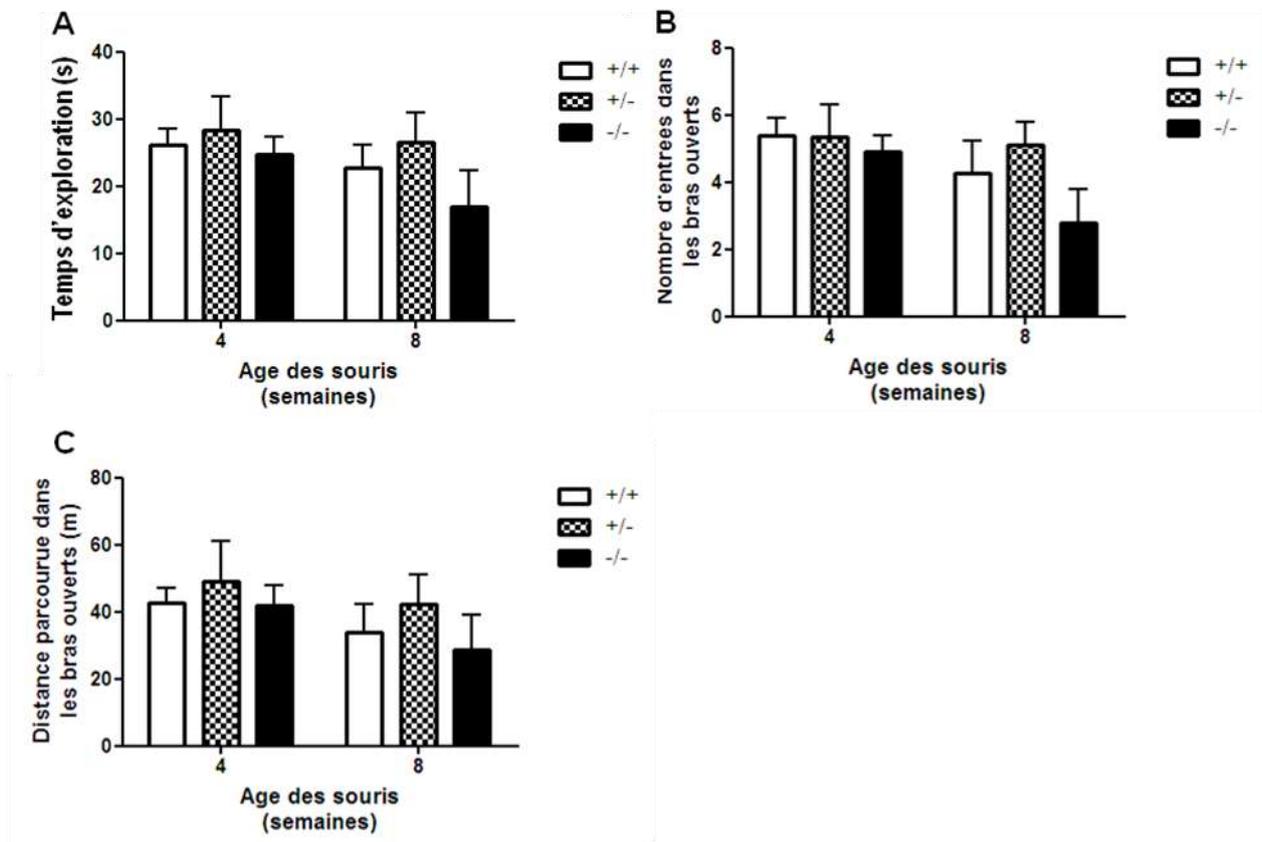
Etant donné que le poids des souris peut influencer leurs comportements, le poids de ces souris a donc été suivi au cours du temps. Les résultats référencés dans la table 1 ne montrent aucune différence de poids entre les génotypes des souris quelque soit leur âge.

**Table 1 : Suivi du poids des souris CD3 $\zeta^{+/+}$ , CD3 $\zeta^{+/-}$  et CD3 $\zeta^{-/-}$ .**

| Souris               | +/+       | +/-       | -/-       | +/+       | +/-        | -/-        | +/+        | +/-        | -/-        |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Age (jours)          | 7         | 7         | 7         | 28        | 28         | 28         | 56         | 56         | 56         |
| Taille du groupe (n) | 7         | 10        | 8         | 15        | 12         | 9          | 14         | 6          | 6          |
| Poids (g)            | 3,51±0,12 | 3,57±0,14 | 3,71±0,19 | 9,97±0,54 | 10,64±1,60 | 10,83±0,75 | 21,33±0,50 | 20,86±1,18 | 21,38±0,43 |

## II. L'absence du CD3 $\zeta$ n'influe pas sur le niveau d'anxiété des souris.

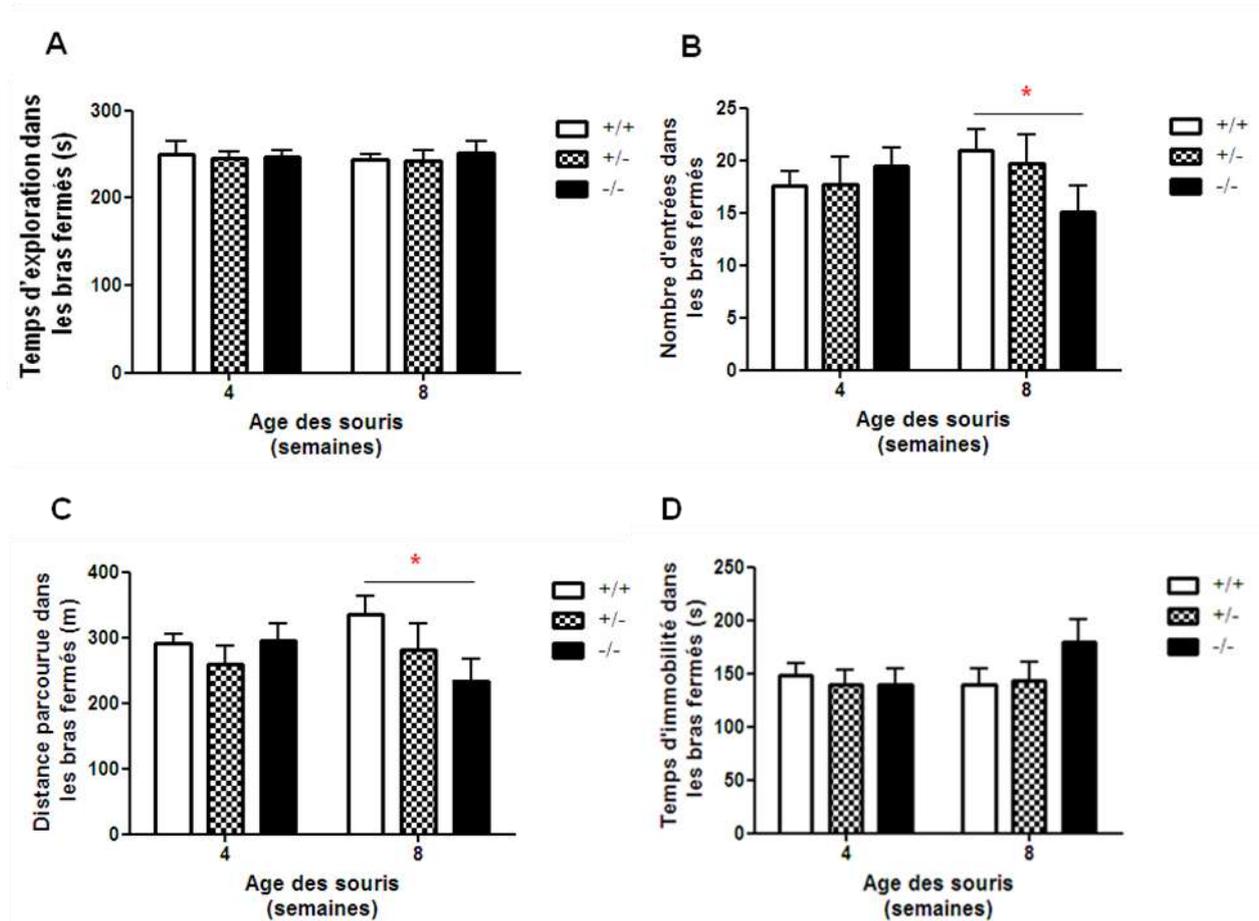
Les souris ont été testées à 4 et 8 semaines, c'est-à-dire au cours de la formation des réseaux synaptiques (4 semaines) et lorsque la maturation de ces réseaux est atteinte (8 semaines). Le test du labyrinthe en croix surélevé a été utilisé afin d'évaluer le niveau d'anxiété des souris CD3 $\zeta^{-/-}$  et CD3 $\zeta^{+/-}$ . L'analyse montre que le temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts, considérés comme anxiogènes, ainsi que la distance parcourue dans ces bras ne varient pas entre les différents phénotypes quelque soit l'âge des souris (Figure 15A, B et C). Les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  et CD3 $\zeta^{+/-}$  présentent donc un comportement lié à l'anxiété similaire aux souris CD3 $\zeta^{+/+}$ .



**Figure 15. Etude du comportement anxieux des souris CD3 $\zeta^{+/+}$ , CD3 $\zeta^{+/-}$  et CD3 $\zeta^{-/-}$ .** Le temps passé dans les bras ouverts (A), le nombre d'entrées (B) ainsi que la distance parcourue dans les bras ouverts (C) ont été analysés. Différents groupes de souris comportant les souris CD3 $\zeta^{+/+}$ , CD3 $\zeta^{+/-}$  et CD3 $\zeta^{-/-}$  âgées de 4 semaines et de 8 semaines ont été soumises au test du labyrinthe en croix surélevé pendant 5 minutes. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM (CD3 $\zeta^{+/+}$  n=10-14, CD3 $\zeta^{+/-}$  n=11, CD3 $\zeta^{-/-}$  n=10).

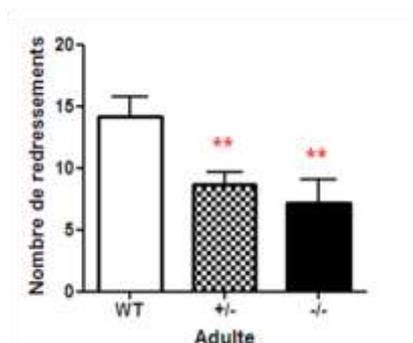
Nos résultats démontrent que les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  et CD3 $\zeta^{+/-}$  ont un comportement similaire aux souris CD3 $\zeta^{+/+}$  dans les bras ouverts, fortement anxiogènes. Dans les bras fermés, considérés comme sécurisants, les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  et CD3 $\zeta^{+/-}$  passent autant de temps que les souris CD3 $\zeta^{+/+}$  quelque soit leur âge (Figure 16A). De plus, le nombre d'entrées et le temps parcouru par les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  âgées

de 8 semaines dans les bras fermés sont significativement diminués par rapport aux souris  $CD3\zeta^{+/+}$  (Figure 16B,  $p = 0,039$  ; C,  $p = 0,047$ ). A 8 semaines, les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  restent plus longtemps immobiles dans les bras fermés que les souris  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{+/+}$  (Figure 16D). Aucune différence n'est observée à l'âge de 4 semaines.



**Figure 16. Etude du comportement des souris  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  dans les bras fermés.** Le temps passé dans les bras fermés (A) Le nombre d'entrées (B) la distance parcourue (C) et le temps d'immobilité (D) dans les bras fermés ont été analysés. Différents groupes de souris comportant les souris  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  âgées de 4 semaines et de 8 semaines ont été soumises au test du labyrinthe en croix surélevé pendant 5 minutes. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $CD3\zeta^{+/+}$   $n=10-14$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$   $n=11$ ,  $CD3\zeta^{-/-}$   $n=10$ ; \* $p<0,05$ ; test de Mann Whitney).

Dans nos conditions expérimentales, il semble donc que les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  âgées de 8 semaines dans un environnement sécurisé sont moins actives que les souris  $CD3\zeta^{+/+}$  et  $CD3\zeta^{+/-}$ . Afin d'apprécier le degré de curiosité et la capacité d'exploration des souris, nous avons quantifié le nombre de redressements effectués par les souris âgées de 8 semaines dans les bras fermés (Figure 17).



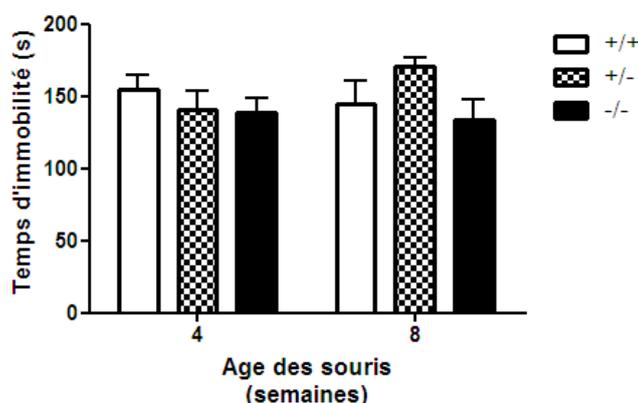
**Figure 17. Etude du comportement des souris  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  dans les bras fermés.** Le nombre de redressements des souris  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  âgées de 8 semaines a été comptabilisé au cours du test du labyrinthe en croix surélevé pendant 5 minutes. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $CD3\zeta^{+/+}$   $n=10-14$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$   $n=11$ ,  $CD3\zeta^{-/-}$   $n=10$ ; \*\* $p<0,05$ ; test de Mann Whitney).

Nos analyses montrent que les souris  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  ont un nombre de redressements significativement diminué par rapport aux souris  $CD3\zeta^{+/+}$  ( $CD3\zeta^{+/-}$ ,  $p = 0,008$  ;  $CD3\zeta^{-/-}$ ,  $p = 0,002$ ) (Figure 17). Aucune différence concernant le nombre de redressements n'est observé à 4 semaines. A 8 semaines, les souris  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  explorent moins leur environnement par rapport aux souris  $CD3\zeta^{+/+}$ .

Nos résultats montrent dans ces conditions expérimentales que dans les bras sécurisants, les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  ont une activité locomotrice et exploratrice plus faible par rapport aux souris  $CD3\zeta^{+/+}$  à l'âge de 8 semaines.

### III. L'absence du $CD3\zeta$ n'influe pas sur le niveau de dépression des souris.

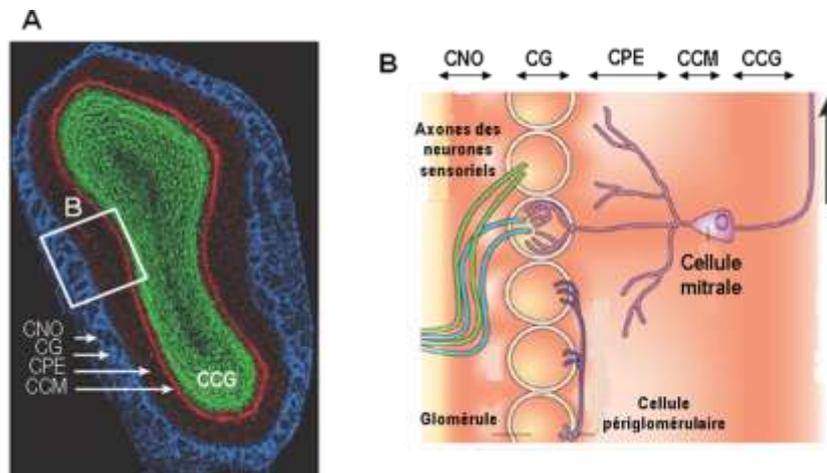
L'analyse du caractère dépressif des souris a été réalisée par le test de la nage forcée ou test de Porsolt. D'après nos résultats (Figure 18), quelque soit leur âge, les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  et  $CD3\zeta^{+/-}$  restent immobiles autant de temps que les souris  $CD3\zeta^{+/+}$ . Les souris  $CD3\zeta^{-/-}$  et  $CD3\zeta^{+/-}$  présentent donc un comportement lié à la dépression similaire à celui des souris  $CD3\zeta^{+/+}$ .



**Figure 18. Etude du comportement dépressif des souris  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$ .** Différents groupes de souris comprenant les souris  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  âgées de 4 semaines et de 8 semaines ont été soumises au test de la nage forcée. Chaque souris est forcée à nager dans un bécier contenant de l'eau et le temps d'immobilisation est comptabilisé. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $CD3\zeta^{+/+}$   $n=13$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$   $n=11$ ,  $CD3\zeta^{-/-}$   $n=10$ ).

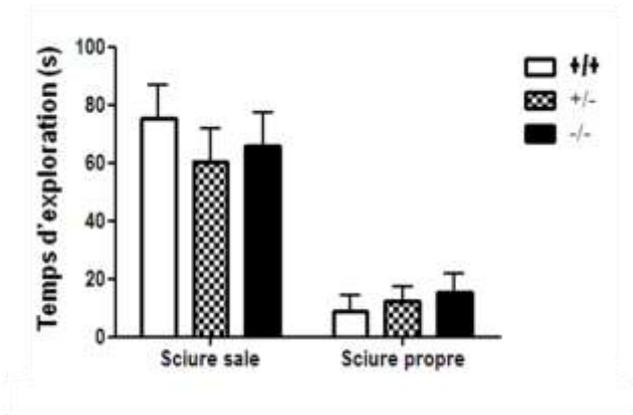
#### IV. L'absence du CD3 $\zeta$ n'altère pas les fonctions olfactives.

Des études immunohistochimiques réalisées par V. Pellier-Monnin et N. Noraz (INSERM U842) montrent que chez des rats âgés de 7 jours, la protéine CD3 $\zeta$  est fortement exprimée et colocalise avec le marqueur des dendrites MAP2 dans la couche plexiforme externe (CPE) des bulbes olfactifs (Figure 19). A ce stade du développement, les connexions synaptiques entre les dendrites des cellules mitrales et les dendrites des neurones granulaires s'établissent dans la CPE. De manière intéressante, l'expression du CD3 $\zeta$  décroît fortement chez les rats âgés de 15 jours, lorsque les connexions synaptiques sont formées. Cette expression transitoire de la protéine CD3 $\zeta$  corrélée à l'étape de la synaptogenèse suggère ainsi une action potentielle de CD3 $\zeta$  dans l'établissement de ces synapses et de ce fait dans les fonctions olfactives. La discrimination olfactive des souris a donc été réalisée à 7 jours et la préférence olfactive a été étudiée à 4 et 8 semaines.



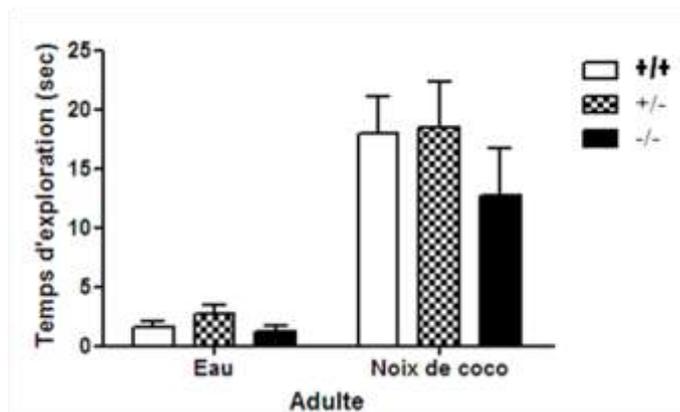
**Figure 19. Anatomie du bulbe olfactif (A).** Les axones des neurones sensoriels forment la couche des nerfs olfactifs (CNO, bleu). Ces axones projettent dans les glomérules où ils se ramifient et forment des synapses avec les neurones dans la couche glomérulaire (CG, bleu). Les bulbes olfactifs possèdent des interneurones autour des glomérules et une fine bande de corps cellulaires des cellules mitrales (CCM, Rouge). Au centre se situe la couche des cellules granulaires (CCG, vert) qui contient les interneurones immatures en migration. Entre la CG et la CCM se situe la couche plexiforme externe (CPE, rouge). Dans cette région, il y a une grande interaction entre les dendrites des cellules granulaires et les dendrites des cellules mitrales. L'encadré est agrandi en B. **(B) Architecture synaptique des glomérules.** Les axones des neurones sensoriels olfactifs et les dendrites des cellules mitrales projettent dans les glomérules et forment ainsi des synapses. Les axones des cellules mitrales projettent dans le cortex piriforme. Adapté de P. Mombaerts 2004 et D.J. Zou et al 2009.

Concernant le test de discrimination olfactive, nos résultats montrent que quelque que soit le génotype, les souris discriminent toutes la sciure sale (Figure 20). De plus, il n'y a pas de différence significative entre les différents groupes de souris. Les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  et CD3 $\zeta^{+/-}$  ne présentent donc pas d'altérations majeures de discrimination olfactive à 7 jours post-natal.



**Figure 20. Etude de l'olfaction chez des souris nouveau-nés  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$ .** Différents groupes de souris comprenant les souris  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$  âgées de 7 jours ont été soumises au test de discrimination olfactive. Le temps passé dans chaque compartiment est comptabilisé. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $CD3\zeta^{+/+}$  n=13,  $CD3\zeta^{+/-}$  n=12,  $CD3\zeta^{-/-}$  n=7).

Pour le test de la préférence olfactive réalisé à 8 semaines, le temps passé à renifler l'odeur attractive ou neutre par la souris est mesuré (Figure 21). Pour les souris  $CD3\zeta^{+/+}$ , ce temps est en moyenne de  $1,64 \pm 0,44$ s pour l'eau (odeur neutre) et  $18,00 \pm 3,09$ s pour le lait de noix de coco (odeur attractive). Le temps passé à sentir l'eau et le lait de noix de coco est de  $2,70 \pm 0,79$ s et  $18,5 \pm 3,82$ s respectivement pour les souris  $CD3\zeta^{+/-}$  et de  $1,22 \pm 0,46$ s et  $12,67 \pm 4,09$ s pour les souris  $CD3\zeta^{-/-}$ , ce qui correspond à des temps similaires à ceux passés par les souris  $CD3\zeta^{+/+}$ . Les mêmes résultats sont observés chez les souris âgées de 4 semaines. Dans nos conditions expérimentales, il semble donc que les souris déficientes pour le  $CD3\zeta$  ne présentent pas d'altération des fonctions olfactives.



**Figure 21. Etude de l'olfaction chez des souris adultes  $CD3\zeta^{+/+}$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{-/-}$ .** Différents groupes de souris comprenant les souris  $CD3\zeta^{-/-}$ ,  $CD3\zeta^{+/-}$  et  $CD3\zeta^{+/+}$  adultes (8 semaines) ont été soumises au test de la préférence olfactive. Le temps où la souris renifle le papier filtre est mesuré pour la noix de coco (odeur attractive) et l'eau (odeur neutre). Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $CD3\zeta^{+/+}$  n=14,  $CD3\zeta^{+/-}$  n=10,  $CD3\zeta^{-/-}$  n=9).

## Discussion

### **Redistribution des sous-unités NR1 et NR2A des récepteurs NMDA ainsi que de leurs protéines associées chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup>.**

Les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  ayant des altérations de la plasticité synaptique dans l'hippocampe, nous avons étudié l'impact du CD3 $\zeta$  sur la composition moléculaire des synapses glutamatergiques. Pour ce faire, des études biochimiques par Western blot ont été réalisées. Les résultats obtenus sur les fractions membranaires enrichies en protéines synaptiques révèlent une altération du niveau d'expression des sous-unités NR1 et NR2A des récepteurs NMDA ainsi que des protéines CaMKII et PSD95, protéines importantes pour la fonction de ces récepteurs. Or l'analyse des fractions membranaires totales ne montre aucune différence significative du niveau d'expression protéique des différentes sous-unités étudiées. Nos données suggèrent que la quantité totale des protéines étudiées est similaire chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> et souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup> mais que leur distribution est différente entre les deux types de souris. Il semble que l'absence de la protéine CD3 $\zeta$  limiterait la localisation des sous-unités NR1 et NR2A au niveau des synapses et les maintiendrait dans les régions extrasynaptiques.

Pourquoi l'absence de la protéine CD3 $\zeta$  modifie-t-elle le contenu des compartiments synaptiques en NR1, NR2A, PSD-95 et CaMKII ?

Tout d'abord, les récepteurs NMDA, la PSD-95 et la CaMKII sont étroitement reliés, de par leurs interactions directes existant entre ces trois molécules, et de part leur intégration dans leur complexe multimoléculaire synaptique. On peut ainsi concevoir que des changements de distribution ou d'activité sur l'une de ces trois molécules aura un impact sur les autres. On sait que l'adressage synaptique des récepteurs NMDA dépend de l'activation de la PKC par phosphorylation (Groc et al., 2004; Fong et al., 2002). On peut poser l'hypothèse que la protéine CD3 $\zeta$  participerait à l'activation de la PKC, voie de signalisation décrite dans les lymphocytes T (Roybal et Wülfing, 2010), et favoriserait donc l'insertion synaptique des récepteurs NMDA contenant les sous-unités NR1 et NR2A. Ainsi chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$ , l'activation de la PKC serait incomplète ce qui limiterait le nombre des récepteurs recrutés à la synapse. La proportion moins importante de récepteurs NMDA dans les compartiments synaptiques chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> par rapport aux souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup> pourrait directement influencer sur la quantité de CaMKII synaptique. En effet, l'entrée de calcium induite par l'activation des récepteurs NMDA permet l'activation de la protéine CaMKII et son transport au niveau des récepteurs NMDA synaptiques (Shen et Meyer, 1999b). La plus faible proportion de sous-unités NR1 et NR2A synaptiques peut se traduire par une plus faible proportion de CaMKII synaptique. Des données de la littérature montrent que la protéine PSD-95 est importante pour la localisation synaptique de la sous-unité NR2A (Sans et al., 2000; Townsend et al., 2003). La

diminution de son expression protéique synaptique et son accumulation au niveau des régions extrasynaptiques observées chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  pourraient également contribuer à la redistribution de la sous-unité NR2A au niveau des sites extrasynaptiques. Cependant, il a été montré que la localisation et l'expression des sous-unités NR1 et NR2A ne sont pas affectées au niveau de la densité post-synaptique chez les souris déficientes pour la PSD-95 (Migaud et al., 1998) rendant cette hypothèse peu probable. Une autre protéine, GIPC (GAIP-interacting protein, C terminus), importante pour l'expression des récepteurs NMDA à la surface, a été mise en évidence (Yi et al., 2007). Contrairement à la PSD-95, la protéine GIPC est exclue des sites synaptiques et s'associe préférentiellement aux récepteurs NMDA extrasynaptiques. Chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$ , cette protéine pourrait être surexprimée favorisant ainsi le maintien des récepteurs NMDA dans les régions extrasynaptiques. Cette protéine interagit spécifiquement avec les récepteurs NMDA ce qui expliquerait qu'il n'y ait pas d'effet sur les récepteurs AMPA.

Les récepteurs NMDA sont constitués par la combinaison de deux sous-unités NR1 et de deux sous-unités régulatrices qui sont principalement NR2A ou NR2B. Il serait primordial d'évaluer le niveau d'expression protéique de la sous-unité NR2B chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup>. En effet, la combinaison précise des sous-unités des récepteurs NMDA détermine les propriétés fonctionnelles de ces récepteurs canaux (Cull-Candy et Leszkiewicz, 2004). Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2B ont des courants ioniques plus longs (Monyer 1994), sont plus perméables aux ions Ca<sup>2+</sup> (Sobczyk et al., 2005) et interagissent préférentiellement avec la protéine CaMKII par rapport à la sous-unité NR2A (Strack et Colbran, 1998). Ainsi les récepteurs NMDA constitués par la sous-unité NR2B sont plus favorables à l'induction de la LTP. Compte tenu que les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> présentent une LTP exacerbée, on peut supposer que chez ces souris, le niveau d'expression protéique synaptique de la sous-unité NR2B est plus élevé que chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>. De ce fait, les récepteurs NMDA synaptiques seraient composés principalement par la sous-unité NR2B favorisant ainsi l'induction de la LTP comme observé chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> (Huh et al., 2000). Nous avons observé que le niveau d'expression de la protéine CaMKII est significativement diminué au niveau des fractions membranaires synaptiques chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup>. Cependant, nos données ne nous renseignent pas sur l'activité de cette protéine au niveau des synapses. Etant donné que l'activité de cette protéine est corrélée avec son état de phosphorylation, des études complémentaires sont nécessaires pour connaître l'état de phosphorylation de cette protéine qui nous renseignera sur son niveau d'activité dans les fractions membranaires synaptiques des souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> et CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>.

Concernant les récepteurs AMPA, la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA ne semble pas être affectée. Cependant ces récepteurs sont principalement composés des sous-unités GluR1 et GluR2 et moins fréquemment des sous-unités GluR3 et GluR2 (Craig et al., 1993). La sous-unité GluR1 favorise

l'insertion des récepteurs AMPA au niveau des synapses au cours de la LTP *via* son interaction avec le complexe Stargazin/PSD-95. Etant donné que l'expression protéique synaptique de la PSD-95 est altérée, on peut supposer que celle de la sous-unité GluR1 peut également l'être. De même, le niveau d'expression de la sous-unité GluR3 peut être modifié. Il est donc nécessaire de connaître le niveau d'expression protéique des sous-unités GluR1 et GluR3 afin de mieux cerner les mécanismes altérés par l'absence du CD3 $\zeta$ . Les changements des ratios entre les différentes sous-unités des récepteurs glutamatergiques pourraient être à l'origine des défauts de transmission glutamatergiques observés chez les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  (Huh et al., 2000; Xu et al., 2010).

Les études biochimiques par Western blot sont donc à compléter afin d'identifier précisément l'impact du CD3 $\zeta$  dans la composition protéiques des synapses excitatrices glutamatergiques.

### **Tests comportementaux.**

Nous avons choisi d'analyser le niveau d'anxiété et de dépression de nos animaux au cours du développement cérébral post-natal. Les souris ont été testées à 4 semaines au cours de la maturation des réseaux synaptiques et à 8 semaines, une fois la maturation cérébrale achevée (Tirelli et al., 2003; Spear, 2000). Nos analyses comportementales démontrent que l'absence du CD3 $\zeta$  n'a pas d'influence sur le niveau d'anxiété et de dépression des souris quelque soit l'âge des souris. Ces données supposent que la protéine CD3 $\zeta$  n'a pas d'influence sur la maturation et le fonctionnement des réseaux neuronaux impliqués dans l'anxiété et la dépression. De manière intéressante il a été montré que la délétion génétique du CMHI, un partenaire du CD3 $\zeta$  dans le SI, n'a pas d'effet sur l'anxiété des souris (McConnell et al., 2009).

D'autre part, l'analyse comportementale dans les bras fermés du labyrinthe en croix surélevé, considérés comme sécurisants, révèle que les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  ont une réduction de leur activité physique et exploratrice dans les bras fermés en comparaison avec les souris CD3 $\zeta^{+/-}$  et CD3 $\zeta^{+/+}$ . Nous avons observé que les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  ont une distance parcourue dans les bras fermés plus faible corrélée à un temps d'immobilité plus long par rapport aux souris CD3 $\zeta^{+/+}$ . De plus, le nombre de redressements des souris CD3 $\zeta^{-/-}$  est plus faible suggérant une activité exploratrice amoindrie. Ces différences comportementales ne sont observées qu'à l'âge de 8 semaines supposant ainsi que la protéine CD3 $\zeta$  affecte la fonction des réseaux neuronaux matures. Ces observations devront être approfondies par des tests utilisant l'open-field permettant d'analyser l'activité locomotrice. De plus, l'hippocampe ayant un rôle central dans les processus de mémorisation et d'apprentissage, les altérations de la plasticité provoquées identifiées chez les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  dans cette région peut aboutir à des anomalies de mémorisation et d'apprentissage.

Malgré l'étroite corrélation entre l'expression de la protéine CD3 $\zeta$  et la synaptogenèse dans la couche plexiforme externe des bulbes olfactifs, suggérant une fonction possible du CD3 $\zeta$  dans le système olfactif, les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  ne développent aucun défaut olfactif. A 7 jours post-nataux, les souris discriminent toutes la sciure provenant de la cage parentale supposant ainsi que la protéine CD3 $\zeta$  ne semble pas altérer l'établissement des contacts dendritiques entre les cellules mitrales et les neurones granulaires des bulbes olfactifs. A des stades plus tardifs, nos résultats montrent que les souris discriminent toutes la noix de coco (odeur attractive) quelque soit leur âge. Les tests utilisés dans cette étude permettent principalement de détecter l'anosmie (perte totale de l'odorat). Cependant, l'absence du CD3 $\zeta$  peut induire la perte partielle de l'odorat (hyposmie) qui n'a pas pu être décelée dans le test utilisé. En effet, une seule dilution au cours de notre étude a été utilisée. Il se peut que pour des dilutions plus faibles, les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  soient plus sensibles ou moins sensibles à l'odeur que les souris CD3 $\zeta^{+/+}$ . De plus, une étude récente montre que l'altération de la transmission glutamatergique dans les cellules granulaires des bulbes olfactifs affecte la capacité de discrimination d'odeurs complexes mais pas celle d'odeurs simples des souris âgées de 4 semaines (Abraham et al., 2010). Chez ces souris la mémoire olfactive n'est pas atteinte. Il serait donc intéressant de tester la capacité de mémorisation d'odeurs simples et de discrimination d'odeurs complexes chez les souris CD3 $\zeta^{-/-}$ .

## Perspectives

Les études biochimiques par Western blot sont donc à poursuivre afin d'identifier précisément l'impact du CD3 $\zeta$  dans la composition des synapses glutamatergiques. L'analyse des transcrits codant pour les différentes protéines étudiées en Western blot sera également effectuée.

Des approches *in vivo* et *in vitro* de culture de neurones hippocampiques, en analysant en détail l'impact de la protéine CD3 $\zeta$  sur la distribution des récepteurs au glutamate de type AMPA et NMDA ainsi que les protéines importantes liées à leur fonction telles que la CaMKII et la PSD-95 seront développées.

## In vivo

### **Immunohistochimie**

Les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  et les souris sauvages du même sexe seront sacrifiées à 2 mois, leurs cerveaux seront ainsi prélevés afin de réaliser des immunohistochimies. Différents marqueurs synaptiques seront utilisés comme des anticorps ciblant les différentes sous-unités des récepteurs glutamatergiques de type AMPA et NMDA (NR2A, GluR1...) mais également des anticorps ciblant des protéines impliquées dans leur fonction comme des protéines d'échafaudage (PSD-95, SAP97) ou de

signalisation intracellulaire (CaMKII). Les coupes coronales des souris  $CD3\zeta^{-/-}$  et des souris  $CD3\zeta^{+/+}$  seront comparées entre elles. L'intensité et la distribution du marquage, le nombre d'agrégats synaptiques ainsi que leur taille seront analysés.

### **Tests comportementaux**

D'un point de vue physiologique et cellulaire, les phénomènes mis en jeu dans la mémoire sont connus pour l'implication de la LTP dans la fonction synaptique (Bliss et Collingridge, 1993; Neves et al., 2008). Chez les souris déficientes pour le  $CD3\zeta$ , présentant une augmentation de la LTP, une atteinte de la mémoire est probable. Pour répondre à cette hypothèse, des tests comportementaux faisant intervenir l'apprentissage et la mémoire sont à effectuer. Ne disposant pas de matériel expérimental pour l'étude de la mémorisation spatiale comme le labyrinthe aquatique de Morris (Morris Water Maze), des tests impliquant la mémoire à court terme ou long terme plus simple à mettre en place sont à développer. Un des tests facile à mettre au point est le test de la reconnaissance des objets. Ce test fait intervenir la mémoire à court terme principalement médiée par le cortex frontal et la mémoire à long terme médiée par l'hippocampe. Ce test est basé sur la tendance spontanée des rongeurs à explorer des nouveaux objets (Ennaceur et Delacour, 1988). Au cours de ce test, la souris est placée dans une cage (50 cm x 25 cm x 25 cm) dont les parois sont noires contenant 2 objets similaires et son comportement est observé pendant 10min (test d'entraînement). Les objets sont positionnés à chaque coin de la cage et présentent des similarités de texture, de couleur et de taille mais ont des formes différentes. Au cours du test proprement dit, les souris sont placées dans la cage contenant deux objets différents pendant 90 min (mémoire à court terme) et 24h (mémoire à long terme) après l'entraînement. Le temps d'exploration de la souris envers chaque objet est alors mesuré.

### **In vitro**

Pour réaliser la culture de neurones hippocampiques provenant de souris déficientes pour le  $CD3\zeta$ , des accouplements de souris hétérozygotes pour ce gène est donc nécessaire. Les souris à 17 jours de gestation seront sacrifiées, les embryons prélevés seront alors disséqués individuellement. Des biopsies de queues seront récupérées afin de réaliser le génotypage des souris le jour même. Les hippocampes seront disséqués puis déposés individuellement dans un falcon en attendant les résultats des génotypages. Une fois le statut génétique des embryons connu, les tissus provenant de souris  $CD3\zeta^{-/-}$  et  $CD3\zeta^{+/+}$  seront dissociés et les cellules de chaque animal serontensemencées individuellement. La difficulté de cette expérience est d'obtenir dans la portée un nombre suffisant de souris  $CD3\zeta^{-/-}$  et  $CD3\zeta^{+/+}$ . Les neurones seront maintenus en culture 15-16 jours puis seront fixés

pour réaliser une analyse immunocytochimique. De même que pour l'analyse *in vivo*, les mêmes marqueurs synaptiques seront utilisés. L'intensité et la distribution du marquage, le nombre d'agrégats synaptiques ainsi que leur taille seront analysés.

De plus une analyse morphologique sera effectuée. A l'aide de marqueurs axonal et dendritique, le nombre ainsi que la longueur des embranchements seront mesurés. De plus, la forme, la taille et le nombre des épines dendritiques seront étudiés.

# **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

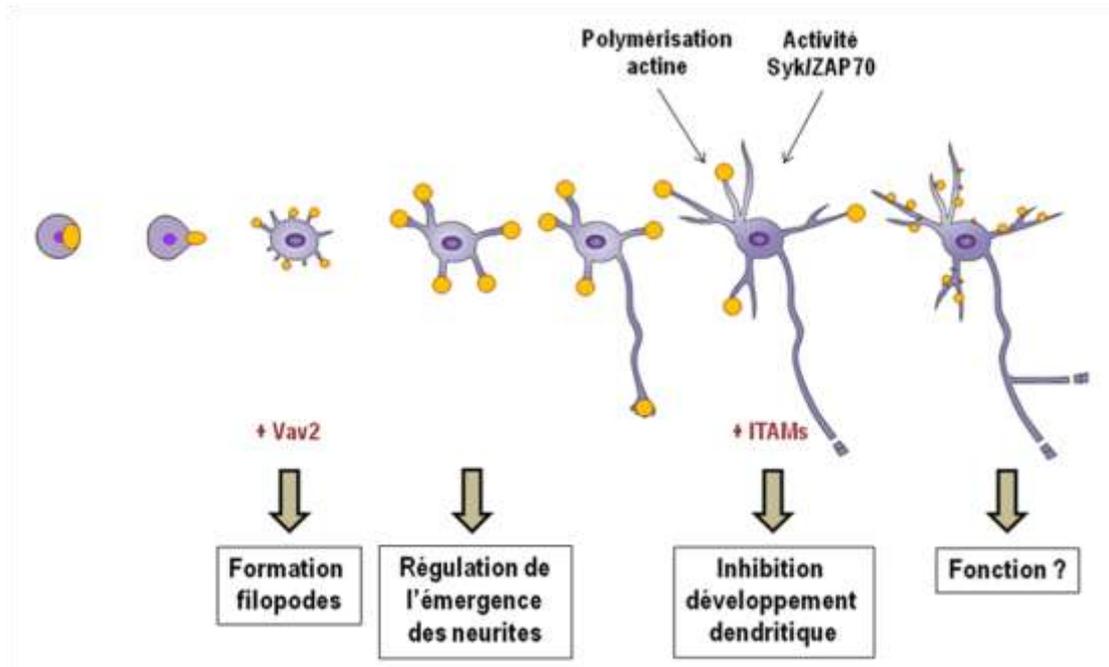
---

# DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

## Expression et localisation de la protéine CD3 $\zeta$ dans le SNC

Nos résultats montrent que l'ARNm et la protéine de la molécule CD3 $\zeta$  sont exprimés dans le SNC. Nos études immunohistochimiques *in vivo* et *in vitro* révèlent que la protéine CD3 $\zeta$  est principalement exprimée par les neurones notamment ceux de l'hippocampe et du cortex chez le rat et la souris. Ces observations corrélerent avec les données de la littérature qui montrent la présence de l'ARNm de CD3 $\zeta$  dans le thalamus, l'hippocampe et le NGL aux stades pré- et post-nataux (Corriveau et al., 1998; Huh et al., 2000; Sourial-Bassillious et al., 2006) et celle de la protéine dans certaines sous-populations neuronales de la rétine (Xu et al., 2010). Nous avons observé l'expression de la protéine CD3 $\zeta$  dès la naissance des neurones à partir de cellules souches neurales de rat puis tout au long du développement neuronal, incluant les stades de formation et maturation des axones, des dendrites et des synapses. La protéine CD3 $\zeta$  semble donc être exprimée tout le long de la vie des neurones de l'hippocampe *in vitro*. Cependant nous n'avons pas étudié les variations de l'expression de la protéine et de l'ARNm du CD3 $\zeta$  au cours la vie du rongeur. Il serait intéressant de comparer l'expression de sa protéine et celle de son transcrite chez l'embryon, le jeune et chez l'adulte afin de déterminer s'il existe une période d'action privilégiée de cette molécule.

Nous avons conduit une analyse détaillée de la distribution cellulaire de la protéine CD3 $\zeta$  à plusieurs étapes clé du développement neuronal. Au stade très précoce de différenciation, quand le neurone ne montre aucun signe de polarisation et qu'il est encore de forme sphérique, la protéine CD3 $\zeta$  s'accumule dans des microdomaines autour du corps cellulaire du neurone. Nos résultats montrent une étroite corrélation entre l'agrégation de cette protéine et l'émergence des premiers neurites. Au cours de la polarisation neuronale, la protéine CD3 $\zeta$  est fortement concentrée au niveau des cônes de croissance et dans les filopodes des neurites mineurs mais également au niveau du cône de croissance de l'axone en formation. Cependant, lorsque les dendrites initient leur différenciation, la protéine CD3 $\zeta$  est alors préférentiellement associée au domaine somatodendritique et n'est pratiquement plus détectée dans le domaine axonal suggérant ainsi un rôle privilégié de cette protéine au cours de la différenciation dendritique. Nous avons en effet identifié l'implication de CD3 $\zeta$  dans le développement dendritique. Il serait également intéressant d'analyser l'impact de cette protéine sur les premières étapes de l'élongation axonale, lorsque CD3 $\zeta$  est encore fortement exprimé au niveau de l'axone, entre 2 et 4 DIV. A des stades de développement plus tardifs, lors de la formation et de la maturation des synapses, CD3 $\zeta$  est associé aux filopodes dendritiques et aux épines dendritiques, sites des synapses du type excitateur glutamatergique (Figure 29).



**Figure 29 : Modèle de travail de l'étude portant sur la fonction de la protéine CD3 $\zeta$  au cours du développement neuronal.** La protéine CD3 $\zeta$  est représentée par les cercles de couleur jaune.

Le point commun des structures cellulaires exprimant CD3 $\zeta$  est qu'elles correspondent toutes à des domaines cellulaires riches en actine. Il est en effet établi que les filopodes, les cônes de croissance et les épines dendritiques sont des structures particulièrement riches en actine (Hotulainen et Hoogenraad, 2010; Dent et al., 2007; Ishikawa et Kohama, 2007). Même au stade sphérique, quand ces structures ne sont pas encore formées, la protéine CD3 $\zeta$  s'accumule au niveau de sites riches en actine autour de la cellule. Ces données supportent un lien fonctionnel très fort entre l'actine et le CD3 $\zeta$ . Comme décrit dans l'introduction, l'actine est clairement impliquée dans la croissance des prolongements neuronaux et dans le remodelage des épines dendritiques suggérant un rôle de CD3 $\zeta$  au cours de ces processus. Il est possible que la colocalisation de CD3 $\zeta$  avec l'actine reflète à la fois un rôle de l'actine sur l'adressage ou l'ancrage de CD3 $\zeta$  en des sites cellulaires spécifiques et une fonction de CD3 $\zeta$  sur la dynamique du cytosquelette d'actine. Nos résultats montrant l'implication de la Rho GEF Vav2 dans la formation des filopodes induite par CD3 $\zeta$  soutient l'hypothèse d'un lien fonctionnel entre CD3 $\zeta$  et l'actine.

### Régulation de la distribution de la protéine CD3 $\zeta$

En cohérence avec nos résultats précédents, montrant une corrélation entre la distribution de CD3 $\zeta$  et de l'actine, nous avons montré que la polymérisation de l'actine régule la distribution de la protéine CD3 $\zeta$ . En effet, le traitement des neurones de l'hippocampe avec la cytochalsine D, inhibiteur de la polymérisation de l'actine, induit la redistribution de la protéine CD3 $\zeta$  le long des

dendrites. Malgré la réorganisation du cytosquelette d'actine, la molécule CD3 $\zeta$  reste colocalisée avec l'actine suggérant ainsi l'existence d'une interaction entre ces deux protéines.

Un autre facteur important pour l'adressage de la protéine CD3 $\zeta$  dans notre modèle est la famille des protéines kinases Syk/ZAP70. En effet, un inhibiteur de cette famille de protéines kinases induit, quelques minutes après son application, une dispersion massive de CD3 $\zeta$  le long des neurites. Cela implique que le niveau d'activité de Syk/ZAP70 régule l'agrégation de CD3 $\zeta$  au niveau des filopodes et des cônes de croissance. Dans les LT, suite à la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR, CD3 $\zeta$  active ces protéines kinases par des voies de phosphorylation (Chan et al., 1994). Des études préliminaires au sein de notre laboratoire révèlent que les protéines Syk et ZAP70 phosphorylées sont présentes dans les neurones de l'hippocampe *in vitro* suggérant que celles-ci sont activées et qu'il existe en amont de ces protéines une voie de signalisation fonctionnelle permettant leur activation. Dans les LT, la phosphorylation de la protéine ZAP70 est induite par l'activation de CD3 $\zeta$ , conduisant à la formation d'un complexe protéique comprenant les protéines PLC- $\gamma$ 1, Vav ou SLP76 (Finco et al., 1998; Paz et al., 2001; Perez-Villar et al., 2002). Il a été reporté que les protéines PLC- $\gamma$ 1 et Vav sont exprimées dans les neurones (Cowan et al., 2005; Zhou et al., 2007; Quevedo et al., 2010; Nguyen et al., 2007). Si cette voie de signalisation décrite dans les LT est maintenue dans les neurones, cela suggère que CD3 $\zeta$ , en activant Syk/ZAP70, agirait sur sa propre distribution cellulaire. Il s'agirait là d'un mécanisme de rétrocontrôle : un recrutement important de CD3 $\zeta$  conduirait à une forte activation de Syk/ZAP70 permettant de maintenir l'accumulation de CD3 $\zeta$  au niveau des cônes de croissance et des filopodes. En revanche, un faible recrutement de CD3 $\zeta$  conduirait à une faible activation de Syk/ZAP70 induisant une dispersion de CD3 $\zeta$  le long des neurites. Etant donné, l'étroite relation entre le CD3 $\zeta$  et l'actine, il serait intéressant d'examiner si l'inhibition des protéines kinases Syk/ZAP70 redistribue également l'actine.

### **Récepteurs potentiellement associés à la protéine CD3 $\zeta$ dans le SNC**

Comme présenté dans l'introduction du manuscrit, CD3 $\zeta$  est une protéine adaptatrice signalétique qui est classiquement associée à un récepteur membranaire. Ce récepteur, activé par son ligand, transmet le signal intracellulaire par l'intermédiaire de CD3 $\zeta$ . Plusieurs récepteurs s'associant à CD3 $\zeta$  ont été décrits dans les LT. Il est donc pertinent de s'interroger sur leur implication potentielle dans les neurones, en association avec CD3 $\zeta$ .

L'équipe de C. Shatz a montré que les souris déficientes pour le CMHI, ligand du TCR, présentent un phénotype similaire aux souris déficientes pour le CD3 $\zeta$ . En effet, chez ces souris, les axones des NGR projettent dans des régions ectopiques du NGL et présentent une augmentation de la LTP et une absence de LTD dans l'hippocampe (Huh et al., 2000). Ces protéines étant

fonctionnellement associées dans le SI, l'hypothèse proposée est qu'elles puissent l'être également dans le SNC par l'intermédiaire du TCR. Nos analyses en microscopie confocale révèlent que la protéine CD3 $\zeta$  est exprimée au niveau des sites post-synaptiques des neurones de l'hippocampe et du cortex. Une étude récente montre que le CMHI est également associé au domaine post-synaptique mais est aussi détecté au niveau pré-synaptique (Datwani et al., 2009). Il pourrait donc exister au niveau synaptique une voie de signalisation CMH/CD3 $\zeta$  par l'intermédiaire du TCR. Cependant, plusieurs arguments vont à l'encontre de cette hypothèse. Alors que les souris déficientes pour le CMHI ont une augmentation leur apprentissage moteur, les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  ont un apprentissage moteur normal au cours du test du rotarod (McConnell et al., 2009) suggérant deux voies distinctes pour le CMHI et CD3 $\zeta$ . De plus, dans le SNC, l'ARNm du TCR $\beta$ , au cours du développement comme chez l'adulte, est immature et la présence de la protéine n'a pu être démontrée. La chaîne  $\alpha$  du TCR n'est pas détectée, suggérant ainsi que le TCR n'est pas exprimé à la surface des cellules et est non fonctionnel (Syken et Shatz, 2003; Nishiyori et al., 2004). Nos propres résultats obtenus dans le laboratoire n'ont jamais pu mettre en évidence l'expression protéique par Western blot des chaînes du TCR ni des sous-unités CD3 $\delta$  et CD3 $\epsilon$  appartenant au complexe TCR/CD3. Cependant, d'autres groupes ont montré la présence de l'ARNm des sous-unités CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$  et CD3 $\delta$  dans le cervelet mais celle de CD3 $\zeta$  (Nakamura et al., 2007). Cette étude suggère l'existence possible d'un complexe CD3 dans le cervelet, dénué de la sous-unité CD3 $\zeta$ . L'absence de la sous-unité CD3 $\epsilon$  provoque une diminution de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje du cervelet tandis que la déficience en CD3 $\zeta$  augmente la complexité de cette arborisation dans les neurones de la rétine et du cortex cérébral (Nakamura et al., 2007; Xu et al., 2010). Ces observations suggèrent que les sous-unités CD3 $\zeta$  et CD3 $\epsilon$  ne sont pas fonctionnellement associées dans les neurones. Le rôle du CD3 $\zeta$  dans le SNC ne semble donc pas nécessiter son association avec le TCR ou avec les sous-unités du complexe CD3.

La protéine CD3 $\zeta$  est également connue pour s'associer aux récepteurs NKp30 et NKp44 dans les cellules NK (Lanier, 2003). Nos études préliminaires montrent que les ARNm des récepteurs NKp30 et NKp46 sont présents dans le cerveau de rat. Seul l'ARNm du récepteur NKp30 semble exprimé dans les neurones du cortex. Il serait intéressant d'identifier la présence de sa protéine par Western blot dans les neurones et sa localisation *in vitro* et *in vivo* par immunohistochimie afin d'examiner s'il existe une corrélation entre la distribution de cette protéine et le CD3 $\zeta$ .

Un autre récepteur, le récepteur aux chimiokines CXCR4, a été identifié dans les LT comme un récepteur associé à CD3 $\zeta$  (Kumar et al., 2006). Dans les neurones de l'hippocampe, nous avons observé l'expression de la protéine CD3 $\zeta$  dans les cônes de croissance des neurites et dans le cône de croissance de l'axone en élongation. De manière intéressante, une étude réalisée précédemment par

notre équipe montre que l'expression de la protéine CXCR4 est similaire à celle de la protéine CD3 $\zeta$  au cours des premières étapes du développement neuronal (Pujol et al., 2005). Ces observations suggèrent une coopération possible entre ces deux protéines au cours de la neuritogenèse et de l'élongation axonale. Au cours de la différenciation dendritique, la protéine CXCR4 est préférentiellement exprimée dans l'axone (Baudouin et al., 2006) alors que nos résultats montrent que la protéine CD3 $\zeta$  est restreinte au domaine somatodendritique. De part leurs différentes localisations, les protéines CXCR4 et CD3 $\zeta$  ne semblent donc pas interagir au cours de la différenciation dendritique. Afin de déterminer si ces protéines interagissent au cours des stades développementaux précédant la différenciation dendritique, des co-immunoprécipitations suite au traitement par le SDF-1, ligand du récepteur CXCR4, sont à réaliser.

## **Fonction cérébrale de la protéine CD3 $\zeta$**

### **Rôle de CD3 $\zeta$ dans la formation des premiers filopodes**

Les résultats obtenus au cours de la neuritogenèse indiquent que la protéine CD3 $\zeta$  favorise la formation des filopodes et freine la genèse des neurites par l'intermédiaire de la protéine Vav2, une Rho GEF connue pour activer les protéines Rho GTPases nécessaires à la régulation du cytosquelette d'actine lors de la formation des filopodes et des neurites (da Silva et Dotti, 2002; Abe et al., 2000). La co-transfection des neuroblastes de la forme dominante-négative de Vav2 avec CD3 $\zeta$  provoque une diminution du nombre de filopodes alors que la surexpression de la protéine CD3 $\zeta$  seule induit une croissance excessive de filopodes. L'inhibition de la protéine Vav2 empêche la formation des filopodes induite par la protéine CD3 $\zeta$  ce qui suggère que ces protéines coopèrent. Ces données sont confortées par l'analyse des souris déficientes pour les protéines Vav2 et Vav3 qui présentent le même phénotype que les souris CD3 $\zeta^{-/-}$  à savoir une projection ectopique dans le NGL des afférences axonales de la rétine (Huh et al., 2000; Cowan et al., 2005). Cette étude révèle également que la stimulation des récepteurs aux éphrines permet le recrutement et l'activation de la protéine Vav2, nécessaire à l'endocytose du couple Ephrine/Récepteurs aux Ephrines pour le collapsus du cône de croissance *in vitro* (Cowan et al., 2005). Il a également été montré l'implication des récepteurs aux éphrines sur la motilité des filopodes *in vitro* et *in vivo* (Kayser et al., 2008). Une hypothèse est que l'activation des récepteurs aux éphrines recrute la protéine Vav2 par l'intermédiaire de la protéine CD3 $\zeta$  afin de favoriser la formation des filopodes. Nos résultats préliminaires *in vitro* montrent que les neurones issus de souris CD3 $\zeta^{-/-}$  répondent peu au traitement par les éphrines en comparaison avec les neurones issus de souris CD3 $\zeta^{+/+}$  se caractérisant par un nombre de collapsus de cônes de croissance moins important. Ces observations suggèrent un lien fonctionnel entre les récepteurs aux éphrines, la protéine Vav2 et le CD3 $\zeta$ .

Dans cette hypothèse, l'activation des récepteurs aux éphrines provoquerait son autophosphorylation permettant le recrutement et l'activation de certaines protéines kinases comme les protéines kinases de la famille Src, connues pour activer la protéine CD3 $\zeta$  dans les LT (Chan et al., 1994). La protéine CD3 $\zeta$  activée induirait le recrutement de la protéine Vav2 par l'intermédiaire de protéines kinases comme ZAP70 ou Syk permettant le collapsus du cône de croissance et la formation des filopodes. Une approche pour tester cette hypothèse sera d'examiner si la transfection des neurones CD3 $\zeta^{-/-}$  avec la forme constitutivement active de Vav2 permet de rétablir la voie de signalisation normalement engagée par CD3 $\zeta$  et ainsi de permettre le collapsus des cônes de croissances et la formation des filopodes suite à l'activation des récepteurs aux éphrines. L'implication de Syk/ZAP70 sur la voie de l'éphrine et CD3 $\zeta$  sera testée en inhibant cette famille de protéines tyrosine kinases par le Piceatanol sur des neurones issus de souris CD3 $\zeta^{+/+}$  et CD3 $\zeta^{-/-}$ . La proportion de collapsus des cônes de croissance et le nombre de filopodes seront quantifiés dans chaque condition, après stimulation par l'éphrine. Par cette étude nous espérons mieux comprendre les mécanismes liés à l'impact de la protéine CD3 $\zeta$  dans la formation des filopodes.

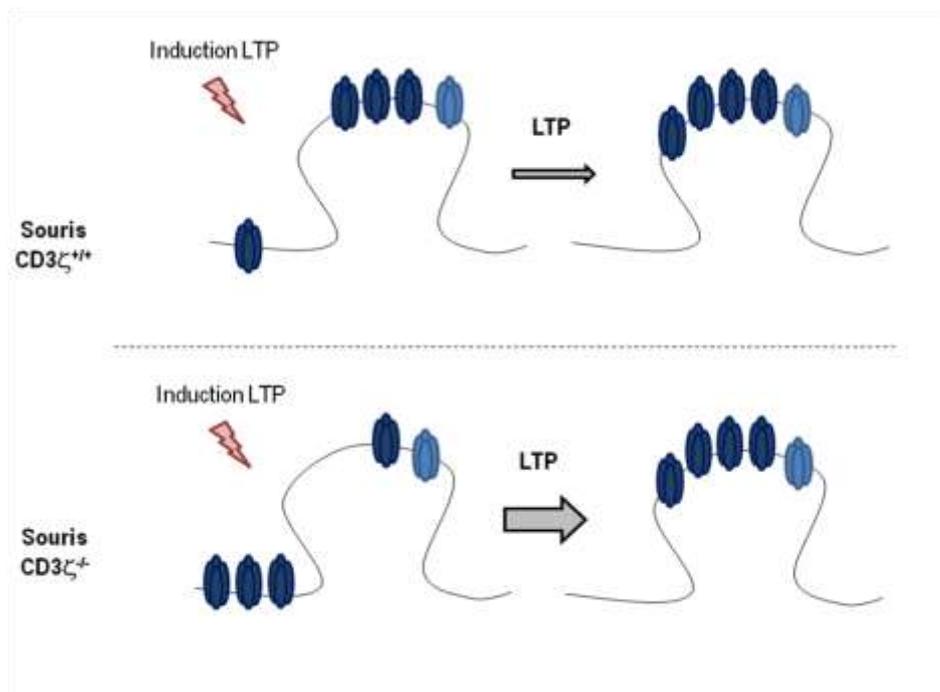
### **Rôle de CD3 $\zeta$ dans la dendritogenèse**

Au cours de la différenciation dendritique, nous avons montré que la protéine CD3 $\zeta$  est un régulateur négatif de la croissance des dendrites. Cette observation a été confirmée récemment par une étude qui montre que l'absence de CD3 $\zeta$  provoque une augmentation de la complexité de l'arborisation dendritique des NGR (Xu et al., 2010). Afin de déterminer le mécanisme lié à l'action de CD3 $\zeta$  sur la dendritogenèse, les neurones ont été transfectés avec le mutant dominant négatif du CD3 $\zeta$  dans lequel les domaines ITAMs sont non fonctionnels. La surexpression de la forme mutante induit une augmentation de la complexité de l'arborisation dendritique. Au contraire, la surexpression de la forme CD3 $\zeta$  sauvage la réduit significativement. Dans les LT, l'activation des domaines ITAMs permet le recrutement et l'activation de nombreuses protéines de signalisation notamment la famille ZAP70/Syk (Chan et al., 1994). Nous avons mis en évidence la présence de l'ARNm de la molécule ZAP70 à 4DIV et 16DIV dans les neurones de cortex chez le rat. De plus, nos données immunocytochimiques sur les neurones de l'hippocampe à 8DIV révèlent que la protéine ZAP70 phosphorylée est notamment localisée dans le domaine somatodendritique suite à l'ajout de pervanadate, inhibiteur puissant des protéines phosphatases permettant de stabiliser la phosphorylation des protéines. Ces différentes observations suggèrent que l'effet du CD3 $\zeta$  sur la morphologie des dendrites dépendrait de l'activation des domaines ITAMs et du recrutement de la protéine ZAP70. Si ce mécanisme existe dans le SNC, l'activation du CD3 $\zeta$  par un anticorps

extracellulaire permettrait de déterminer si la protéine ZAP70 est activée par immunocytochimie et de savoir par co-immunoprécipitation s'il y a une interaction entre ces protéines.

### **Rôle de la protéine CD3 $\zeta$ dans la fonction synaptique ?**

Les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  ont une altération de la plasticité synaptique. Nos analyses immunocytochimiques sur des neurones de l'hippocampe à 21 DIV révèlent que la protéine CD3 $\zeta$ , exprimée sous forme d'agrégats, colocalise partiellement avec la protéine PSD-95. En revanche aucune colocalisation n'est observée entre le CD3 $\zeta$  et la protéine GAD, enzyme nécessaire à la synthèse du neurotransmetteur inhibiteur GABA et utilisé comme marqueur des synapses inhibitrices. Ces données suggèrent que la protéine CD3 $\zeta$  est un composant des synapses glutamatergiques. Ces résultats sont en accord avec une étude récente qui montre également que le CD3 $\zeta$  est associé à la PSD-95 dans le NGL de la rétine. Fonctionnellement, il a été montré que le CD3 $\zeta$  est impliqué dans la transmission synaptique médiée par les récepteurs au glutamate dans les NGR (Xu et al., 2010). Nous avons donc analysé l'impact de la protéine CD3 $\zeta$  sur la composition moléculaire des synapses glutamatergiques. Nos analyses biochimiques par Western blot révèlent que la protéine CD3 $\zeta$  maintient les sous-unités NR1 et NR2A des récepteurs au glutamate de type NMDA ainsi que les protéines PSD-95 et CaMKII dans les régions extra-synaptiques. En revanche, la distribution des sous-unités  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 des récepteurs GABAergiques et celle de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA ne sont pas affectées. Ces modifications de distribution des récepteurs NMDA contenant les sous-unités NR1 et NR2A pourraient expliquer les défauts de la plasticité synaptique enregistrés dans l'hippocampe (Huh et al., 2000). L'augmentation de la LTP observée chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  est dépendante des récepteurs NMDA (Huh et al., 2000). L'induction de la LTP-dépendante des récepteurs NMDA est accompagnée par l'insertion et l'activation par le glutamate des récepteurs AMPA au niveau des synapses permettant la dépolarisation de la membrane plasmique nécessaire à l'activation des récepteurs NMDA synaptiques (Makino et Malinow, 2009). Suite à cette induction, les récepteurs NMDA extrasynaptiques sont recrutés à la synapse et potentialisent la transmission synaptique (Harney et al., 2008; Zhao et al., 2008; Williams et al., 2007). Chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$ , la plupart des NMDA sont extrasynaptiques. De ce fait, le nombre de récepteurs NMDA extrasynaptiques recrutés au niveau de la synapse au cours de l'induction de la LTP serait proportionnellement plus important que chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>. Cela provoquerait une potentialisation plus importante reflétée par une LTP augmentée (Figure 30).



**Figure 30 : Hypothèse expliquant l'augmentation de la LTP chez les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$ .**  
 Les récepteurs AMPA sont représentés en bleu clair et les récepteurs NMDA en bleu foncé.

L'analyse de la composition moléculaire des synapses *in vitro* et *in vivo* par immunohistochimie sur des souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  permettrait de confirmer les résultats obtenus en Western blot. La morphologie des épines dendritiques, sites des synapses excitatrices de type glutamatergique, est importante, en effet, les modifications de leur taille ou de leur nombre peut affecter la force de la transmission synaptique (von Bohlen Und Halbach, 2009). Des études sont en cours afin d'examiner le nombre et la taille des épines dendritiques, *in vitro* chez les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> en comparaison des souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>.

#### **Impact de la protéine CD3 $\zeta$ sur l'activité locomotrice des souris?**

Nos analyses comportementales démontrent que les souris déficientes pour le CD3 $\zeta$  n'ont pas de modification de leur niveau d'anxiété et de dépression par rapport aux souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>. De plus, l'absence du CD3 $\zeta$ , dans nos conditions expérimentales, ne semble pas affecter la fonction olfactive de nos souris. En revanche, nous avons montré une réduction de l'activité d'exploration des souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> dans les bras fermés du labyrinthe en croix surélevé en comparaison des souris CD3 $\zeta$ <sup>+/+</sup>. En effet, la distance parcourue par les souris CD3 $\zeta$ <sup>-/-</sup> dans les bras fermés est plus courte et est corrélée à un temps d'immobilité plus long. De plus, le nombre de redressements effectués par ces souris est plus faible. Cependant, le test du labyrinthe en croix surélevé, étant utilisé pour étudier l'anxiété,

n'est donc pas approprié pour analyser l'activité d'exploration des souris. Des études plus approfondies en utilisant l'open-field sont à effectuer.

Notre étude a permis de montrer que la molécule adaptatrice CD3 $\zeta$  à ce jour uniquement caractérisée dans le SI, est également exprimée dans le SNC et plus particulièrement dans les neurones. Nos études fonctionnelles ont mis à jour un nouveau rôle de CD3 $\zeta$  dans la formation des filopodes, dans la régulation négative du développement dendritique mais également dans la régulation de la distribution des récepteurs de type NMDA au niveau des sites synaptiques. Nous apportons donc par ce travail de thèse des éléments nouveaux quand au rôle et la régulation de cette molécule au cours du développement neuronal et nous espérons que les expériences futures permettront de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués au cours de ces phénomènes.

# BIBLIOGRAPHIE

## A

---

- Abe, K., Rossman, K. L., Liu, B., Ritola, K. D., Chiang, D., Campbell, S. L., Burridge, K., et Der, C. J. (2000). Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J. Biol. Chem* 275, 10141-10149.
- Abraham, N. M., Egger, V., Shimshek, D. R., Renden, R., Fukunaga, I., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Klugmann, M., Margrie, T. W., Schaefer, A. T., et al. (2010). Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron* 65, 399-411.
- Adler, C. E., Fetter, R. D., et Bargmann, C. I. (2006). UNC-6/Netrin induces neuronal asymmetry and defines the site of axon formation. *Nat. Neurosci* 9, 511-518.
- Ahnert-Hilger, G., Höltje, M., Grosse, G., Pickert, G., Mucke, C., Nixdorf-Bergweiler, B., Boquet, P., Hofmann, F., et Just, I. (2004). Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J. Neurochem* 90, 9-18.
- Aizawa, H., Hu, S., Bobb, K., Balakrishnan, K., Ince, G., Gurevich, I., Cowan, M., et Ghosh, A. (2004). Dendrite development regulated by CREST, a calcium-regulated transcriptional activator. *Science* 303, 197-202.
- Akira, S., Takeda, K., et Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol* 2, 675-680.
- Al-Hallaq, R. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., et Wenthold, R. J. (2007). NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *J. Neurosci* 27, 8334-8343.
- Allen, N. D. (2008). Temporal and epigenetic regulation of neurodevelopmental plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 363, 23-38.
- Alvarez-Buylla, A., et Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci* 22, 629-634.
- de Anda, F. C., Pollarolo, G., Da Silva, J. S., Camoletto, P. G., Feiguin, F., et Dotti, C. G. (2005). Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* 436, 704-708.
- Andersen, S. S., et Bi, G. Q. (2000). Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays* 22, 172-179.
- Anwyl, R. (1999). Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res. Brain Res. Rev* 29, 83-120.
- Arakawa, Y., Bito, H., Furuyashiki, T., Tsuji, T., Takemoto-Kimura, S., Kimura, K., Nozaki, K., Hashimoto, N., et Narumiya, S. (2003). Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J. Cell Biol* 161, 381-391.
- Arendt, D. (2008). The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nat. Rev. Genet* 9, 868-882.

Arimura, N., et Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci* 8, 194-205.

Asada, N., Sanada, K., et Fukada, Y. (2007). LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. *J. Neurosci* 27, 11769-11775.

Ashwood, P., Wills, S., et Van de Water, J. (2006). The immune response in autism: a new frontier for autism research. *J. Leukoc. Biol* 80, 1-15.

## B

---

Bajénoff, M., Egen, J. G., Koo, L. Y., Laugier, J. P., Brau, F., Glaichenhaus, N., et Germain, R. N. (2006). Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 25, 989-1001.

Barco, A., Patterson, S., Alarcon, J. M., Gromova, P., Mata-Roig, M., Morozov, A., et 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.

Barda-Saad, M., Shirasu, N., Pauker, M. H., Hassan, N., Perl, O., Balbo, A., Yamaguchi, H., Houtman, J. C. D., Appella, E., Schuck, P., et al. (2010). Cooperative interactions at the SLP-76 complex are critical for actin polymerization. *EMBO J* 29, 2315-2328.

Barnes, A. P., Lilley, B. N., Pan, Y. A., Plummer, L. J., Powell, A. W., Raines, A. N., Sanes, J. R., et Polleux, F. (2007). LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell* 129, 549-563.

Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L. C., et Soderling, T. R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276, 2042-2045.

Barria, A., et Malinow, R. (2005). NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 48, 289-301.

Bassani, S., Valnegri, P., Beretta, F., et Passafaro, M. (2009). The GLUR2 subunit of AMPA receptors: synaptic role. *Neuroscience* 158, 55-61.

Baudouin, S. J., Pujol, F., Nicot, A., Kitabgi, P., et Boudin, H. (2006). Dendrite-selective redistribution of the chemokine receptor CXCR4 following agonist stimulation. *Mol. Cell. Neurosci* 33, 160-169.

Beck, H. N., Drahushuk, K., Jacoby, D. B., Higgins, D., et Lein, P. J. (2001). Bone morphogenetic protein-5 (BMP-5) promotes dendritic growth in cultured sympathetic neurons. *BMC Neurosci* 2, 12.

Beebe, S. J. (1994). The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. *Semin. Cancer Biol* 5, 285-294.

Belmadani, A., Tran, P. B., Ren, D., Assimacopoulos, S., Grove, E. A., et Miller, R. J. (2005). The

- chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors. *J. Neurosci* 25, 3995-4003.
- Ben-Zvi, A., Ben-Gigi, L., Yagil, Z., Lerman, O., et Behar, O. (2008). Semaphorin3A regulates axon growth independently of growth cone repulsion via modulation of TrkA signaling. *Cell. Signal* 20, 467-479.
- Bird, G. L., Meadows, J., Goka, J., Polson, R., et Williams, R. (1990). Cyclosporin-associated akinetic mutism and extrapyramidal syndrome after liver transplantation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr* 53, 1068-1071.
- Bliss, T. V., et Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- von Bohlen Und Halbach, O. (2009). Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Ann. Anat* 191, 518-531.
- Bonifacino, J. S., Suzuki, C. K., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A. M., et 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.
- Boulanger, L. M. (2009). Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 64, 93-109.
- Boulanger, L. M., et Shatz, C. J. (2004). Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci* 5, 521-531.
- Brodin, L., Löw, P., Gad, H., Gustafsson, J., Pieribone, V. A., et Shupliakov, O. (1997). Sustained neurotransmitter release: new molecular clues. *Eur. J. Neurosci* 9, 2503-2511.
- Brouns, M. R., Matheson, S. F., et Settleman, J. (2001). p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat. Cell Biol* 3, 361-367.
- Brown, G. P., Blitzer, R. D., Connor, J. H., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R., et Landau, E. M. (2000). Long-term potentiation induced by theta frequency stimulation is regulated by a protein phosphatase-1-operated gate. *J. Neurosci* 20, 7880-7887.

## C

---

- Caceres, A., Mautino, J., et Kosik, K. S. (1992). Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9, 607-618.
- Cai, Z., Pan, Z. L., Pang, Y., Evans, O. B., et Rhodes, P. G. (2000). Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr. Res* 47, 64-72.
- Call, M. E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., et Wucherpfennig, K. W. (2002). The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111, 967-979.
- Camacho-Arroyo, I., López-Griego, L., et Morales-Montor, J. (2009). The role of cytokines in the regulation of neurotransmission. *Neuroimmunomodulation* 16, 1-12.

- 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.
- Caplan, S., Zeliger, S., Wang, L., et 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.
- Chae, Y. C., Lee, S., Heo, K., Ha, S. H., Jung, Y., Kim, J. H., Ihara, Y., Suh, P., et Ryu, S. H. (2009). Collapsin response mediator protein-2 regulates neurite formation by modulating tubulin GTPase activity. *Cell. Signal* 21, 1818-1826.
- Chan, A. C., Desai, D. M., et 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.
- Charych, E. I., Akum, B. F., Goldberg, J. S., Jörnsten, R. J., Rongo, C., Zheng, J. Q., et Firestein, B. L. (2006). Activity-independent regulation of dendrite patterning by postsynaptic density protein PSD-95. *J. Neurosci* 26, 10164-10176.
- Chen, C., Hsu, L., Huang, L., et Huang, T. (2010). Chronic administration of cyclosporine A changes expression of BDNF and TrkB in rat hippocampus and midbrain. *Neurochem. Res* 35, 1098-1104.
- Chen, G., Sima, J., Jin, M., Wang, K., Xue, X., Zheng, W., Ding, Y., et Yuan, X. (2008). Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development. *Nat. Neurosci* 11, 36-44.
- Chen, L., Chetkovich, D. M., Petralia, R. S., Sweeney, N. T., Kawasaki, Y., Wenthold, R. J., Brecht, D. S., et Nicoll, R. A. (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408, 936-943.
- Chen, N., Luo, T., et Raymond, L. A. (1999). Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J. Neurosci* 19, 6844-6854.
- Choi, Y., Di Nardo, A., Kramvis, I., Meikle, L., Kwiatkowski, D. J., Sahin, M., et He, X. (2008). Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation. *Genes Dev* 22, 2485-2495.
- Chung, H. J., Xia, J., Scannevin, R. H., Zhang, X., et Huganir, R. L. (2000). Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J. Neurosci* 20, 7258-7267.
- Collingridge, G. L., Isaac, J. T. R., et Wang, Y. T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci* 5, 952-962.
- Collins, S. P., Reoma, J. L., Gamm, D. M., et Uhler, M. D. (2000). LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *Biochem. J* 345 Pt 3, 673-680.
- Condeelis, J. (1993). Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu. Rev. Cell Biol* 9, 411-444.
- Corotto, F. S., Henegar, J. A., et Maruniak, J. A. (1993). Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci. Lett* 149, 111-114.

- Corriveau, R. A., Huh, G. S., et Shatz, C. J. (1998). Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 21, 505-520.
- 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., et Greenberg, M. E. (2005). Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron* 46, 205-217.
- Craig, A. M., et Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci* 17, 267-310.
- Craig, A. M., Blackstone, C. D., Haganir, R. L., et Banker, G. (1993). The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* 10, 1055-1068.
- Cubelos, B., Sebastián-Serrano, A., Beccari, L., Calcagnotto, M. E., Cisneros, E., Kim, S., Dopazo, A., Alvarez-Dolado, M., Redondo, J. M., Bovolenta, P., et al. (2010). Cux1 and Cux2 regulate dendritic branching, spine morphology, and synapses of the upper layer neurons of the cortex. *Neuron* 66, 523-535.
- Cull-Candy, S. G., et Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE* 2004, re16.

## D

---

- Da Silva, J. S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., et Dotti, C. G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol* 162, 1267-1279.
- Dakoji, S., Tomita, S., Karimzadegan, S., Nicoll, R. A., et Bredt, D. S. (2003). Interaction of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins with multiple membrane associated guanylate kinases. *Neuropharmacology* 45, 849-856.
- Dalby, N. O., et Mody, I. (2003). Activation of NMDA receptors in rat dentate gyrus granule cells by spontaneous and evoked transmitter release. *J. Neurophysiol* 90, 786-797.
- Datwani, A., McConnell, M. J., Kanold, P. O., Micheva, K. D., Busse, B., Shamloo, M., Smith, S. J., et Shatz, C. J. (2009). Classical MHCI molecules regulate retinogeniculate refinement and limit ocular dominance plasticity. *Neuron* 64, 463-470.
- Davies, C. H., Clarke, V. R., Jane, D. E., et Collingridge, G. L. (1995). Pharmacology of postsynaptic metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *Br. J. Pharmacol* 116, 1859-1869.
- De Anda, F. C., Pollarolo, G., Da Silva, J. S., Camoletto, P. G., Feiguin, F., et Dotti, C. G. (2005). Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* 436, 704-708.
- De Groen, P. C., Aksomit, A. J., Rakela, J., Forbes, G. S., et Krom, R. A. (1987). Central nervous system toxicity after liver transplantation. The role of cyclosporine and cholesterol. *N. Engl. J. Med* 317, 861-866.

- DeGiorgis, J. A., Galbraith, J. A., Dosemeci, A., Chen, X., et Reese, T. S. (2006). Distribution of the scaffolding proteins PSD-95, PSD-93, and SAP97 in isolated PSDs. *Brain Cell Biol* 35, 239-250.
- Dehmelt, L., et Halpain, S. (2004). Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J. Neurobiol* 58, 18-33.
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., et Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 11211-11216.
- 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.
- Derkach, V., Barria, A., et Soderling, T. R. (1999). Ca<sup>2+</sup>/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.
- Di Nuzzo, S., Zanni, M., et De Panfilis, G. (2007). Exacerbation of paranoid schizophrenia in a psoriatic patient after treatment with cyclosporine A, but not with etanercept. *J Drugs Dermatol* 6, 1046-1047.
- Dickson, B. J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959-1964.
- Dietrich, J., Kastrup, J., Lauritsen, J. P., Menné, C., von Bülow, F., et 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.
- Dimitrova, S., Reissaus, A., et Tavosanis, G. (2008). Slit and Robo regulate dendrite branching and elongation of space-filling neurons in *Drosophila*. *Dev. Biol* 324, 18-30.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M., et Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., et Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci* 17, 5046-5061.
- Dohgu, S., Sumi, N., Nishioku, T., Takata, F., Watanabe, T., Naito, M., Shuto, H., Yamauchi, A., et Kataoka, Y. (2010). Cyclosporin A induces hyperpermeability of the blood-brain barrier by inhibiting autocrine adrenomedullin-mediated up-regulation of endothelial barrier function. *Eur J Pharmacol*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553921> [Accédé Août 3, 2010].
- D'Oro, U., Munitic, I., Chacko, G., Karpova, T., McNally, J., et Ashwell, J. D. (2002). Regulation of constitutive TCR internalization by the zeta-chain. *J. Immunol* 169, 6269-6278.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A., et Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci* 8, 1454-1468.
- Dunstone, M. A., Kjer-Nielsen, L., Kostenko, L., Purcell, A. W., Brooks, A. G., Rossjohn, J., et McCluskey, J. (2004). The production and purification of the human T-cell receptors, the

CD3epsilon gamma and CD3epsilon delta heterodimers: complex formation and crystallization with OKT3, a therapeutic monoclonal antibody. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* 60, 1425-1428.

## E

---

- Eckenhoff, M. F., et Rakic, P. (1984). Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J. Comp. Neurol* 223, 1-21.
- Egger, V., Feldmeyer, D., et Sakmann, B. (1999). Coincidence detection and changes of synaptic efficacy in spiny stellate neurons in rat barrel cortex. *Nat. Neurosci* 2, 1098-1105.
- Ellman, L. M., et Susser, E. S. (2009). The promise of epidemiologic studies: neuroimmune mechanisms in the etiologies of brain disorders. *Neuron* 64, 25-27.
- Engert, F., et Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., et Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med* 4, 1313-1317.
- Erondu, N. E., et Kennedy, M. B. (1985). Regional distribution of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J. Neurosci* 5, 3270-3277.
- Erreger, K., Dravid, S. M., Banke, T. G., Wyllie, D. J. A., et Traynelis, S. F. (2005). Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J. Physiol. (Lond.)* 563, 345-358.

## F

---

- Faix, J., et Rottner, K. (2006). The making of filopodia. *Curr. Opin. Cell Biol* 18, 18-25.
- Farazifard, R., et Wu, S. H. (2010). Metabotropic glutamate receptors modulate glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the central nucleus of the inferior colliculus. *Brain Res* 1325, 28-40.
- Farkas, L. M., et Huttner, W. B. (2008). The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr. Opin. Cell Biol* 20, 707-715.
- Faulds, D., Goa, K. L., et Benfield, P. (1993). Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 45, 953-1040.
- Feldmeyer, D., Egger, V., Lubke, J., et Sakmann, B. (1999). Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single 'barrel' of developing rat somatosensory cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 521 Pt 1, 169-190.

- Fernández, O., Romero, F., Bravo, M., Burgos, D., Cabello, M., et González-Molina, M. (1993). [Neurologic complications induced by the treatment of the acute renal allograft rejection with the monoclonal antibody OKT3]. *Neurologia* 8, 277-280.
- Ffrench-Constant, C., et Colognato, H. (2004). Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol* 14, 678-686.
- Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E., et Weiss, A. (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9, 617-626.
- Fong, D. K., Rao, A., Crump, F. T., et Craig, A. M. (2002). Rapid synaptic remodeling by protein kinase C: reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J. Neurosci* 22, 2153-2164.
- Franco, R., Peter, M. E., Choi, M. S., Malissen, B., Sancho, J., et Terhorst, C. (1994). Characterization of the GTP/GDP binding site in the murine CD3-zeta polypeptide chain. *Immunol. Lett* 43, 167-175.
- Fukata, Y., Itoh, T. J., Kimura, T., Ménager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., et al. (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol* 4, 583-591.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., et Hisatsune, T. (2003). Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J. Neurosci* 23, 9357-9366.
- Fukunaga, K., et Miyamoto, E. (2000). A working model of CaM kinase II activity in hippocampal long-term potentiation and memory. *Neurosci. Res* 38, 3-17.
- Fukunaga, K., Muller, D., et Miyamoto, E. (1995). Increased phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and its endogenous substrates in the induction of long-term potentiation. *J. Biol. Chem* 270, 6119-6124.

## G

---

- Galjart, N. (2005). CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6, 487-498.
- Gardoni, F., Schrama, L. H., van Dalen, J. J., Gispen, W. H., Cattabeni, F., et 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.
- Garner, C. C., Nash, J., et Huganir, R. L. (2000). PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol* 10, 274-280.
- Garner, C. C., Zhai, R. G., Gundelfinger, E. D., et Ziv, N. E. (2002). Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 25, 243-251.
- Garvalov, B. K., Flynn, K. C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamburg, J. R., et Bradke, F. (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity.

- J. Neurosci 27, 13117-13129.
- Gaudillière, B., Konishi, Y., de la Iglesia, N., Yao, G. L., et Bonni, A. (2004). A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron* 41, 229-241.
- Geraldo, S., et Gordon-Weeks, P. R. (2009). Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J. Cell. Sci* 122, 3595-3604.
- Geremia, N. M., Gordon, T., Brushart, T. M., Al-Majed, A. A., et Verge, V. M. K. (2007). Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Exp. Neurol* 205, 347-359.
- Goddard, C. A., Butts, D. A., et Shatz, C. J. (2007). Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 6828-6833.
- Goldberg, J. L., Espinosa, J. S., Xu, Y., Davidson, N., Kovacs, G. T. A., et Barres, B. A. (2002). Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron* 33, 689-702.
- Götz, M., et Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6, 777-788.
- Graef, I. A., Wang, F., Charron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M., et Crabtree, G. R. (2003). Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell* 113, 657-670.
- Gray, E. G. (1963). Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *J. Anat* 97, 101-106.
- Groc, L., Heine, M., Cognet, L., Brickley, K., Stephenson, F. A., Lounis, B., et Choquet, D. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat. Neurosci* 7, 695-696.
- Groth, R. D., et Mermelstein, P. G. (2003). Brain-derived neurotrophic factor activation of NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-dependent transcription: a role for the transcription factor NFATc4 in neurotrophin-mediated gene expression. *J. Neurosci* 23, 8125-8134.
- Guo, X., Lin, Y., Horbinski, C., Drahushuk, K. M., Kim, I. J., Kaplan, P. L., Lein, P., Wang, T., et Higgins, D. (2001). Dendritic growth induced by BMP-7 requires Smad1 and proteasome activity. *J. Neurobiol* 48, 120-130.
- Gupta, S. K., Meiri, K. F., Mahfooz, K., Bharti, U., et Mani, S. (2010). Coordination between extrinsic extracellular matrix cues and intrinsic responses to orient the centrosome in polarizing cerebellar granule neurons. *J. Neurosci* 30, 2755-2766.

## H

---

- Han, Y., He, T., Huang, D. R., Pardo, C. A., et 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.

- Harney, S. C., Jane, D. E., et Anwyl, R. (2008). Extrasynaptic NR2D-containing NMDARs are recruited to the synapse during LTP of NMDAR-EPSCs. *J. Neurosci* 28, 11685-11694.
- Harney, S. C., Rowan, M., et Anwyl, R. (2006). Long-term depression of NMDA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on activation of metabotropic glutamate receptors and is altered to long-term potentiation by low intracellular calcium buffering. *J. Neurosci* 26, 1128-1132.
- Harris, K. M., et Stevens, J. K. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci* 9, 2982-2997.
- Hatanaka, Y., et Murakami, F. (2002). In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *J. Comp. Neurol* 454, 1-14.
- Hauk, T. G., Leibinger, M., Müller, A., Andreadaki, A., Knippschild, U., et Fischer, D. (2010). Stimulation of axon regeneration in the mature optic nerve by intravitreal application of the toll-like receptor 2 agonist Pam3Cys. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 51, 459-464.
- Hayashi, K., Ohshima, T., et Mikoshiba, K. (2002). Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons. *Mol. Cell. Neurosci* 20, 579-594.
- Hayashi, Y., Shi, S. H., Esteban, J. A., Piccini, A., Poncer, J. C., et Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287, 2262-2267.
- Herd, M. B., Haythornthwaite, A. R., Rosahl, T. W., Wafford, K. A., Homanics, G. E., Lambert, J. J., et Belelli, D. (2008). The expression of GABAA beta subunit isoforms in synaptic and extrasynaptic receptor populations of mouse dentate gyrus granule cells. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 989-1004.
- Hocking, J. C., Hehr, C. L., Bertolesi, G. E., Wu, J. Y., et McFarlane, S. (2010). Distinct roles for Robo2 in the regulation of axon and dendrite growth by retinal ganglion cells. *Mech. Dev* 127, 36-48.
- Hocking, J. C., Hehr, C. L., Chang, R., Johnston, J., et McFarlane, S. (2008). TGFbeta ligands promote the initiation of retinal ganglion cell dendrites in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Neurosci* 37, 247-260.
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., et Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-2232.
- Hollmann, M., et Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci* 17, 31-108.
- Holloway, R. L. (1966). Dendritic branching: some preliminary results of training and complexity in rat visual cortex. *Brain Res* 2, 393-396.
- Hoogenraad, C. C., Milstein, A. D., Ethell, I. M., Henkemeyer, M., et Sheng, M. (2005). GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat. Neurosci* 8, 906-915.
- Horch, H. W., et Katz, L. C. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat. Neurosci* 5, 1177-1184.

- Hotulainen, P., et 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., et Nicoll, R. A. (2010). The role of SAP97 in synaptic glutamate receptor dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 3805-3810.
- Hudmon, A., Lebel, E., Roy, H., Sik, A., Schulman, H., Waxham, M. N., et De Koninck, P. (2005). A mechanism for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association. *J. Neurosci* 25, 6971-6983.
- Hughes, M. E., Bortnick, R., Tsubouchi, A., Bäumer, P., Kondo, M., Uemura, T., et Schmucker, D. (2007). Homophilic Dscam interactions control complex dendrite morphogenesis. *Neuron* 54, 417-427.
- Huh, G. S., Boulanger, L. M., Du, H., Riquelme, P. A., Brotz, T. M., et Shatz, C. J. (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290, 2155-2159.
- Hung, A. Y., Futai, K., Sala, C., Valtschanoff, J. G., Ryu, J., Woodworth, M. A., Kidd, F. L., Sung, C. C., Miyakawa, T., Bear, M. F., et al. (2008). Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *J. Neurosci* 28, 1697-1708.
- Hunt, J., Cheng, A., Hoyles, A., Jervis, E., et Morshead, C. M. (2010). Cyclosporin A has direct effects on adult neural precursor cells. *J. Neurosci* 30, 2888-2896.
- Hwang, I. K., Yi, S. S., Shin, J. H., Yoo, K., Choi, J. H., Lee, C. H., Seong, J. K., Yoon, Y. S., Park, J. H., et Won, M. (2010). Cyclosporine A reduces dendritic outgrowth of neuroblasts in the subgranular zone of the dentate gyrus in C57BL/6 mice. *Neurochem. Res* 35, 465-472.

## I

---

- Igarashi, M., Kozaki, S., Terakawa, S., Kawano, S., Ide, C., et Komiya, Y. (1996). Growth cone collapse and inhibition of neurite growth by Botulinum neurotoxin C1: a t-SNARE is involved in axonal growth. *J. Cell Biol* 134, 205-215.
- Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., et Kaibuchi, K. (2001). CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat. Neurosci* 4, 781-782.
- Ishikawa, R., et Kohama, K. (2007). Actin-binding proteins in nerve cell growth cones. *J. Pharmacol. Sci* 105, 6-11.
- Iwashima, M., Irving, B. A., van Oers, N. S., Chan, A. C., et Weiss, A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263, 1136-1139.

## J

---

- Janeway, C. A., et Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol* 20, 197-216.
- Jerusalinsky, D., Quillfeldt, J. A., Walz, R., Da Silva, R. C., Medina, J. H., et Izquierdo, I. (1994). Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. *Behav. Neural Biol* 61, 107-109.
- Jiang, H., Guo, W., Liang, X., et Rao, Y. (2005). Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell* 120, 123-135.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., et Macara, I. G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat. Cell Biol* 2, 531-539.
- Johansson, C. B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A. M., et Frisé, J. (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Exp. Cell Res* 253, 733-736.

## K

---

- Kaech, S., et Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1, 2406-2415.
- Kahan, B. D., Flechner, S. M., Lorber, M. I., Golden, D., Conley, S., et Van Buren, C. T. (1987). Complications of cyclosporine-prednisone immunosuppression in 402 renal allograft recipients exclusively followed at a single center for from one to five years. *Transplantation* 43, 197-204.
- Kaifu, T., Nakahara, J., Inui, M., Mishima, K., Momiyama, T., Kaji, M., Sugahara, A., Koito, H., Ujike-Asai, A., Nakamura, A., et al. (2003). Osteopetrosis and thalamic hypomyelination with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J. Clin. Invest* 111, 323-332.
- Kalyani, A., Hobson, K., et Rao, M. S. (1997). Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. *Dev. Biol* 186, 202-223.
- Kawai, T., et Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol* 11, 373-384.
- Kawano, Y., Yoshimura, T., Tsuboi, D., Kawabata, S., Kaneko-Kawano, T., Shirataki, H., Takenawa, T., et Kaibuchi, K. (2005). CRMP-2 is involved in kinesin-1-dependent transport of the Sra-1/WAVE1 complex and axon formation. *Mol. Cell. Biol* 25, 9920-9935.
- Kayser, M. S., Nolt, M. J., et Dalva, M. B. (2008). EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron* 59, 56-69.
- Kempermann, G., et Gage, F. H. (2000). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found. Symp* 231, 220-235; discussion 235-241, 302-306.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., et Gage, F. H. (2003). Early determination

- and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* *130*, 391-399.
- Kim, C. H., Chung, H. J., Lee, H. K., et Huganir, R. L. (2001). Interaction of the AMPA receptor subunit GluR2/3 with PDZ domains regulates hippocampal long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *98*, 11725-11730.
- Kim, J. H., Liao, D., Lau, L. F., et Huganir, R. L. (1998). SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron* *20*, 683-691.
- Kim, S., Choi, K. Y., Cho, I. H., Rhy, J. H., Kim, S. H., Park, C., Kim, E., et Song, W. K. (2009). Regulation of dendritic spine morphology by SPIN90, a novel Shank binding partner. *J. Neurochem* *109*, 1106-1117.
- Kishi, M., Pan, Y. A., Crump, J. G., et Sanes, J. R. (2005). Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science* *307*, 929-932.
- Kornack, D. R., et Rakic, P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *96*, 5768-5773.
- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., et Seeburg, P. H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* *269*, 1737-1740.
- Korobova, F., et 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.
- Kovar, D. R. (2006). Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr. Opin. Cell Biol* *18*, 11-17.
- Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S., et Lim, L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol. Cell. Biol* *17*, 1201-1211.
- Krangel, M. S., Orr, H. T., et 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., et Medina, I. (2003). The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* *40*, 775-784.
- Krause, M., Dent, E. W., Bear, J. E., Loureiro, J. J., et Gertler, F. B. (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* *19*, 541-564.
- Kremer, K. N., Humphreys, T. D., Kumar, A., Qian, N., et 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 alpha/CXCL12 chemokine. *J. Immunol* *171*, 360-367.
- Kriegstein, A., et Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci* *32*, 149-184.

- Kriegstein, A. R., et Götz, M. (2003). Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43, 37-43.
- Kumar, A., Humphreys, T. D., Kremer, K. N., Bramati, P. S., Bradfield, L., Edgar, C. E., et Hedin, K. E. (2006). CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity* 25, 213-224.
- Kuroda, R., Satoh, J., Yamamura, T., Anezaki, T., Terada, T., Yamazaki, K., Obi, T., et Mizoguchi, K. (2007). A novel compound heterozygous mutation in the DAP12 gene in a patient with Nasu-Hakola disease. *J. Neurol. Sci* 252, 88-91.
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., et Arakawa, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358, 36-41.
- Kwiatkowski, A. V., Gertler, F. B., et 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 neuritegenesis in the developing cortex. *Neuron* 56, 441-455.

## L

---

- Labelle, C., et Leclerc, N. (2000). Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res* 123, 1-11.
- Lafon, M., Megret, F., Lafage, M., et Prehaud, C. (2006). The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA. *J. Mol. Neurosci* 29, 185-194.
- Lan, J. Y., Skeberdis, V. A., Jover, T., Grooms, S. Y., Lin, Y., Araneda, R. C., Zheng, X., Bennett, M. V., et Zukin, R. S. (2001). Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat. Neurosci* 4, 382-390.
- Lanier, L. L. (2001). Face off--the interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Curr. Opin. Immunol* 13, 326-331.
- Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C., et Phillips, J. H. (1998). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391, 703-707.
- Lanier, L. L., Yu, G., et Phillips, J. H. (1989). Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342, 803-805.
- Lanier, L. L. (2009). DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol. Rev* 227, 150-160.
- Lanier, L. L. (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol* 15, 308-314.
- Lathia, J. D., Okun, E., Tang, S., 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* 28, 13978-13984.
- Lee, A., Li, W., Xu, K., Bogert, B. A., Su, K., et Gao, F. (2003). Control of dendritic development by the *Drosophila* fragile X-related gene involves the small GTPase Rac1. *Development* 130, 5543-5552.
- Lee, J. K., Cho, J. H., Hwang, W. S., Lee, Y. D., Reu, D. S., et Suh-Kim, H. (2000). Expression of neuroD/BETA2 in mitotic and postmitotic neuronal cells during the development of nervous system. *Dev. Dyn* 217, 361-367.
- Lee, S. H., Liu, L., Wang, Y. T., et 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, T., Winter, C., Marticke, S. S., Lee, A., et Luo, L. (2000). Essential roles of *Drosophila* RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron* 25, 307-316.
- Lee-Hoeflich, S. T., Causing, C. G., Podkova, M., Zhao, X., Wrana, J. L., et Attisano, L. (2004). Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J* 23, 4792-4801.
- Lein, P., Johnson, M., Guo, X., Rueger, D., et Higgins, D. (1995). Osteogenic protein-1 induces dendritic growth in rat sympathetic neurons. *Neuron* 15, 597-605.
- Lein, P. J., Guo, X., Shi, G., Moholt-Siebert, M., Bruun, D., et Andres, D. A. (2007). The novel GTPase Rit differentially regulates axonal and dendritic growth. *J. Neurosci* 27, 4725-4736.
- Leonard, A. S., Davare, M. A., Horne, M. C., Garner, C. C., et Hell, J. W. (1998). SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. *J. Biol. Chem* 273, 19518-19524.
- Leonard, A. S., Lim, I. A., Hemsworth, D. E., Horne, M. C., et 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., et Lohof, A. M. (2008). Normal adult climbing fiber mono-innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking MHC class I molecules. *Dev Neurobiol* 68, 997-1006.
- Levite, M. (2008). Towards unveiling the mystery: from stressed brain/mind to outburst of disease. *Curr Opin Pharmacol* 8, 458-459.
- Li, B., Otsu, Y., Murphy, T. H., et 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, N., Zhao, C., Wang, Y., et Yuan, X. (2010). The transcription factor Cux1 regulates dendritic morphology of cortical pyramidal neurons. *PLoS ONE* 5, e10596.
- Li, R., et Gunderson, G. G. (2008). Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 9, 860-873.

- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D., et Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol* 2, 540-547.
- Lin, Y., Jover-Mengual, T., Wong, J., Bennett, M. V. L., et Zukin, R. S. (2006). PSD-95 and PKC converge in regulating NMDA receptor trafficking and gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 19902-19907.
- Lisman, J., Schulman, H., et Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci* 3, 175-190.
- Liu, L., Wong, T. P., Pozza, M. F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y. P., et Wang, Y. T. (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304, 1021-1024.
- Liu, R., Schmid, R., Snider, W. D., et Maness, P. F. (2002). NGF enhances sensory axon growth induced by laminin but not by the L1 cell adhesion molecule. *Mol. Cell. Neurosci* 20, 2-12.
- Lois, C., et Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.
- Lou, L. L., et Schulman, H. (1989). Distinct autophosphorylation sites sequentially produce autonomy and inhibition of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neurosci* 9, 2020-2032.
- Love, P. E., Shores, E. W., Johnson, M. D., Tremblay, M. L., Lee, E. J., Grinberg, A., Huang, S. P., Singer, A., et 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, J., Helton, T. D., Blanpied, T. A., Rácz, B., Newpher, T. M., Weinberg, R. J., et Ehlers, M. D. (2007). Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron* 55, 874-889.
- Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci* 1, 173-180.
- Luo, L., Hensch, T. K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y., et Jan, Y. N. (1996). Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* 379, 837-840.
- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y., et Jan, Y. N. (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev* 8, 1787-1802.
- Luskin, M. B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189.
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., et Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305, 719-721.

## M

---

- Ma, Y., Li, J., Chiu, I., Wang, Y., Sloane, J. A., Lü, J., Kosaras, B., Sidman, R. L., Volpe, J. J., et 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.
- Madduri, S., Papaloïzos, M., et Gander, B. (2009). Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro. *Neurosci. Res* *65*, 88-97.
- Makino, H., et Malinow, R. (2009). AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* *64*, 381-390.
- Malenka, R. C., et Nicoll, R. A. (1993). NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* *16*, 521-527.
- Malenka, R. C., et Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* *44*, 5-21.
- Malissen, M., Gillet, A., Rocha, B., Trucy, J., Vivier, E., Boyer, C., Köntgen, F., Brun, N., Mazza, G., et Spanopoulou, E. (1993). T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *EMBO J* *12*, 4347-4355.
- Manning, A. M., et Davis, R. J. (2003). Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* *2*, 554-565.
- Markakis, E. A., et Gage, F. H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J. Comp. Neurol* *406*, 449-460.
- Marrs, G. S., Green, S. H., et Dailey, M. E. (2001). Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nat. Neurosci* *4*, 1006-1013.
- Martinez, M. C., Ochiishi, T., Majewski, M., et Kosik, K. S. (2003). Dual regulation of neuronal morphogenesis by a delta-catenin-cortactin complex and Rho. *J. Cell Biol* *162*, 99-111.
- Masuda, K., Furuyama, T., Takahara, M., Fujioka, S., Kurinami, H., et Inagaki, S. (2004). Sema4D stimulates axonal outgrowth of embryonic DRG sensory neurones. *Genes Cells* *9*, 821-829.
- Masugi-Tokita, M., Tarusawa, E., Watanabe, M., Molnár, E., Fujimoto, K., et Shigemoto, R. (2007). Number and density of AMPA receptors in individual synapses in the rat cerebellum as revealed by SDS-digested freeze-fracture replica labeling. *J. Neurosci* *27*, 2135-2144.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., et Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* *429*, 761-766.
- Matthews, B. J., Kim, M. E., Flanagan, J. J., Hattori, D., Clemens, J. C., Zipursky, S. L., et Grueber, W. B. (2007). Dendrite self-avoidance is controlled by Dscam. *Cell* *129*, 593-604.
- McAllister, A. K., Lo, D. C., et Katz, L. C. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* *15*, 791-803.
- McConnell, M. J., Huang, Y. H., Datwani, A., et Shatz, C. J. (2009). H2-K(b) and H2-D(b) regulate

- cerebellar long-term depression and limit motor learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *106*, 6784-6789.
- Ménager, C., Arimura, N., Fukata, Y., et Kaibuchi, K. (2004). PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J. Neurochem* *89*, 109-118.
- Menter, A., Gottlieb, A., Feldman, S. R., Van Voorhees, A. S., Leonardi, C. L., Gordon, K. B., Lebwohl, M., Koo, J. Y. M., Elmets, C. A., Korman, N. J., et al. (2008). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J. Am. Acad. Dermatol* *58*, 826-850.
- Meyer-Franke, A., Wilkinson, G. A., Kruttgen, A., Hu, M., Munro, E., Hanson, M. G., Reichardt, L. F., et Barres, B. A. (1998). Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* *21*, 681-693.
- Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L. C., Watabe, A. M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M. F., Morris, R. G., Morrison, J. H., et al. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* *396*, 433-439.
- Miller, S. G., et Kennedy, M. B. (1986). Regulation of brain type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>-triggered molecular switch. *Cell* *44*, 861-870.
- Minami, Y., Weissman, A. M., Samelson, L. E., et Klausner, R. D. (1987). Building a multichain receptor: synthesis, degradation, and assembly of the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *84*, 2688-2692.
- Mishra, R., Gupta, S. K., Meiri, K. F., Fong, M., Thostrup, P., Juncker, D., et Mani, S. (2008). GAP-43 is key to mitotic spindle control and centrosome-based polarization in neurons. *Cell Cycle* *7*, 348-357.
- Mizui, M., Kumanogoh, A., et Kikutani, H. (2009). Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules. *J. Clin. Immunol* *29*, 1-11.
- Mohrmann, R., Hatt, H., et Gottmann, K. (2000). Developmental regulation of subunit composition of extrasynaptic NMDA receptors in neocortical neurones. *Neuroreport* *11*, 1203-1208.
- Moon, M., et Gomez, T. M. (2010). Balanced Vav2 GEF activity regulates neurite outgrowth and branching in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Neurosci* *44*, 118-128.
- Morgan, B. P., et Gasque, P. (1996). Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol. Today* *17*, 461-466.
- Mori, T., Wada, T., Suzuki, T., Kubota, Y., et Inagaki, N. (2007). Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity. *J. Biol. Chem* *282*, 19884-19893.
- Murata, T., Ohnishi, H., Okazawa, H., Murata, Y., Kusakari, S., Hayashi, Y., Miyashita, M., Itoh, H., Oldenborg, P., Furuya, N., et al. (2006). CD47 promotes neuronal development through Src- and FRG/Vav2-mediated activation of Rac and Cdc42. *J. Neurosci* *26*, 12397-12407.

## N

---

- 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.
- Nakanishi, N., Tu, S., Shin, Y., Cui, J., Kurokawa, T., Zhang, D., Chen, H. V., Tong, G., et Lipton, S. A. (2009). Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor. *J. Neurosci* 29, 5260-5265.
- Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603.
- Nakanishi, S., Masu, M., Bessho, Y., Nakajima, Y., Hayashi, Y., et Shigemoto, R. (1994). Molecular diversity of glutamate receptors and their physiological functions. *EXS* 71, 71-80.
- Nakayama, A. Y., Harms, M. B., et Luo, L. (2000). Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci* 20, 5329-5338.
- Neves, G., Cooke, S. F., et Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci* 9, 65-75.
- Ng, J., et Luo, L. (2004). Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron* 44, 779-793.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B. J., et Luo, L. (2002). Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* 416, 442-447.
- Nguyen, T. L. X., Ye, K., Cho, S., et Ahn, J. (2007). Overexpression of phospholipase C-gamma1 inhibits NGF-induced neuronal differentiation by proliferative activity of SH3 domain. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 39, 2083-2092.
- Nicoll, R. A., Tomita, S., et Brecht, D. S. (2006). Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science* 311, 1253-1256.
- Nishimune, A., Isaac, J. T., Molnar, E., Noel, J., Nash, S. R., Tagaya, M., Collingridge, G. L., Nakanishi, S., et Henley, J. M. (1998). NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21, 87-97.
- Nishiyori, A., Hanno, Y., Saito, M., et Yoshihara, Y. (2004). Aberrant transcription of unrearranged T-cell receptor beta gene in mouse brain. *J. Comp. Neurol* 469, 214-226.
- Niswender, C. M., et Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 50, 295-322.
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., et Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci* 7, 136-144.
- Notarangelo, L. D., et Ochs, H. D. (2003). Wiskott-Aldrich Syndrome: a model for defective actin reorganization, cell trafficking and synapse formation. *Curr. Opin. Immunol* 15, 585-591.

## O

---

- Oh-hora, M. (2009). Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol. Rev* 231, 210-224.
- Okun, E., Griffioen, K. J., Gen Son, T., Lee, J., Roberts, N. J., Mughal, M. R., Hutchison, E., Cheng, A., Arumugam, T. V., Lathia, J. D., et al. (2010). TLR2 activation inhibits embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurochem*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20456021> [Accédé Juin 7, 2010].
- Oliva, A. A., Atkins, C. M., Copenagle, L., et Banker, G. A. (2006). Activated c-Jun N-terminal kinase is required for axon formation. *J. Neurosci* 26, 9462-9470.
- Oliveira, A. L. R., Thams, S., Lidman, O., Piehl, F., Hökfelt, T., Kärre, K., Lindå, H., et Cullheim, S. (2004). A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 17843-17848.
- Opazo, P., Labrecque, S., Tigaret, C. M., Frouin, A., Wiseman, P. W., De Koninck, P., et Choquet, D. (2010). CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* 67, 239-252.
- Osten, P., Srivastava, S., Inman, G. J., Vilim, F. S., Khatri, L., Lee, L. M., States, B. A., Einheber, S., Milner, T. A., Hanson, P. I., et al. (1998). The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Neuron* 21, 99-110.
- Otmakhova, N. A., Otmakhov, N., Mortenson, L. H., et Lisman, J. E. (2000). Inhibition of the cAMP pathway decreases early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J. Neurosci* 20, 4446-4451.
- Ozdinler, P. H., et Macklis, J. D. (2006). IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat. Neurosci* 9, 1371-1381.

## P

---

- Pak, C. W., Flynn, K. C., et Bamberg, J. R. (2008). Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat. Rev. Neurosci* 9, 136-147.
- Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F., et Gage, F. H. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci* 19, 8487-8497.
- Palmer, T. D., Willhoite, A. R., et Gage, F. H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol* 425, 479-494.
- Paloneva, J., Kestilä, M., Wu, J., Salminen, A., Böhling, T., Ruotsalainen, V., Hakola, P., Bakker, A. B., Phillips, J. H., Pekkarinen, P., et al. (2000). Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts. *Nat. Genet* 25, 357-361.

- Pantaloni, D., Le Clainche, C., et Carlier, M. F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* *292*, 1502-1506.
- Pasterkamp, R. J., Peschon, J. J., Spriggs, M. K., et Kolodkin, A. L. (2003). Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* *424*, 398-405.
- Patrussi, L., Ulivieri, C., Lucherini, O. M., Paccani, S. R., Gamberucci, A., Lanfranccone, L., Pelicci, P. G., et Baldari, C. T. (2007). p52Shc is required for CXCR4-dependent signaling and chemotaxis in T cells. *Blood* *110*, 1730-1738.
- Patten, S. A., et Ali, D. W. (2009). PKC $\gamma$ -induced trafficking of AMPA receptors in embryonic zebrafish depends on NSF and PICK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *106*, 6796-6801.
- Paz, P. E., Wang, S., Clarke, H., Lu, X., Stokoe, D., et Abo, A. (2001). Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem. J* *356*, 461-471.
- Perez, J. L., Khatri, L., Chang, C., Srivastava, S., Osten, P., et Ziff, E. B. (2001). PICK1 targets activated protein kinase Calpha to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. *J. Neurosci* *21*, 5417-5428.
- Pérez-Otaño, I., et Ehlers, M. D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* *28*, 229-238.
- Perez-Villar, J. J., Whitney, G. S., Sitnick, M. T., Dunn, R. J., Venkatesan, S., O'Day, K., Schieven, G. L., Lin, T., et Kanner, S. B. (2002). Phosphorylation of the linker for activation of T-cells by Itk promotes recruitment of Vav. *Biochemistry* *41*, 10732-10740.
- Phillips, G. R., Huang, J. K., Wang, Y., Tanaka, H., Shapiro, L., Zhang, W., Shan, W. S., Arndt, K., Frank, M., Gordon, R. E., et al. (2001). The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. *Neuron* *32*, 63-77.
- Pi, H. J., Otmakhov, N., El Gaamouch, F., Lemelin, D., De Koninck, P., et Lisman, J. (2010a). CaMKII control of spine size and synaptic strength: Role of phosphorylation states and nonenzymatic action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *107*, 14437-14442.
- Pi, H. J., Otmakhov, N., Lemelin, D., De Koninck, P., et Lisman, J. (2010b). Autonomous CaMKII can promote either long-term potentiation or long-term depression, depending on the state of T305/T306 phosphorylation. *J. Neurosci* *30*, 8704-8709.
- Pilo-Boyl, P., Di Nardo, A., Mulle, C., Sassoè-Pognetto, M., Panzanelli, P., Mele, A., Kneussel, M., Costantini, V., Perlas, E., Massimi, M., et al. (2007). Profilin2 contributes to synaptic vesicle exocytosis, neuronal excitability, and novelty-seeking behavior. *EMBO J* *26*, 2991-3002.
- Pin, J. P., et Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* *34*, 1-26.
- Pitcher, L. A., et van Oers, N. S. C. (2003). T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol* *24*, 554-560.
- Pittock, S. J., Rabinstein, A. A., Edwards, B. S., et Wijdicks, E. F. M. (2003a). OKT3 neurotoxicity

presenting as akinetic mutism. *Transplantation* 75, 1058-1060.

Pittock, S. J., Rabinstein, A. A., Edwards, B. S., et Wijdicks, E. F. M. (2003b). OKT3 neurotoxicity presenting as akinetic mutism. *Transplantation* 75, 1058-1060.

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.

Polleux, F., Giger, R. J., Ginty, D. D., Kolodkin, A. L., et Ghosh, A. (1998). Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 282, 1904-1906.

Ponticelli, C., et Campise, M. R. (2005). Neurological complications in kidney transplant recipients. *J. Nephrol* 18, 521-528.

Portera-Cailliau, C., Pan, D. T., et Yuste, R. (2003). Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J. Neurosci* 23, 7129-7142.

Proepper, C., Johannsen, S., Liebau, S., Dahl, J., Vaida, B., Bockmann, J., Kreutz, M. R., Gundelfinger, E. D., et Boeckers, T. M. (2007). Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. *EMBO J* 26, 1397-1409.

Pujol, F., Kitabgi, P., et Boudin, H. (2005). The chemokine SDF-1 differentially regulates axonal elongation and branching in hippocampal neurons. *J. Cell. Sci* 118, 1071-1080.

---

## Q

---

Quevedo, C., Sauzeau, V., Menacho-Márquez, M., Castro-Castro, A., et Bustelo, X. R. (2010). Vav3-deficient mice exhibit a transient delay in cerebellar development. *Mol. Biol. Cell* 21, 1125-1139.

Quitsch, A., Berhörster, K., Liew, C. W., Richter, D., et Kreienkamp, H. (2005). Postsynaptic shank antagonizes dendrite branching induced by the leucine-rich repeat protein Densin-180. *J. Neurosci* 25, 479-487.

---

## R

---

Rahpeymai, Y., Hietala, M. A., Wilhelmsson, U., Fotheringham, A., Davies, I., Nilsson, A., 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.

Rajan, I., et Cline, H. T. (1998). Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J. Neurosci* 18, 7836-7846.

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol* 145, 61-83.

- Rakic, P. (2003). Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb. Cortex* 13, 541-549.
- Redmond, L., Oh, S. R., Hicks, C., Weinmaster, G., et Ghosh, A. (2000). Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nat. Neurosci* 3, 30-40.
- Redmond, L., et Ghosh, A. (2005). Regulation of dendritic development by calcium signaling. *Cell Calcium* 37, 411-416.
- Redmond, L., Kashani, A. H., et Ghosh, A. (2002). Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34, 999-1010.
- Ribic, A., Zhang, M., Schlumbohm, C., Mätz-Rensing, K., Uchanska-Ziegler, B., Flügge, G., Zhang, W., Walter, L., et 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*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20232136> [Accédé Juillet 8, 2010].
- 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., et Huganir, R. L. (1996). Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16, 1179-1188.
- Roche, K. W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M. D., et Wenthold, R. J. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat. Neurosci* 4, 794-802.
- Rogmond, V., Auger, C., Giraudon, P., Becchi, M., Auvergnon, N., Belin, M., Honnorat, J., et Moradi-Améli, M. (2008). Processing and nuclear localization of CRMP2 during brain development induce neurite outgrowth inhibition. *J. Biol. Chem* 283, 14751-14761.
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., et Schwartz, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat. Cell Biol* 9, 1081-1088.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., et Stevens, C. F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280, 1596-1599.
- Rossini, A. A., Greiner, D. L., et Mordes, J. P. (1999). Induction of immunologic tolerance for transplantation. *Physiol. Rev* 79, 99-141.
- Roumier, A., Béchade, C., Poncer, J., Smalla, K., Tomasello, E., Vivier, E., Gundelfinger, E. D., Triller, A., et Bessis, A. (2004). Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J. Neurosci* 24, 11421-11428.
- Roybal, K. T., et Wülfing, C. (2010). Inhibiting the inhibitor of the inhibitor: blocking PKC-theta to enhance regulatory T cell function. *Sci Signal* 3, pe24.
- Rozdzial, M. M., Malissen, B., et 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.

Ruchhoeft, M. L., Ohnuma, S., McNeill, L., Holt, C. E., et Harris, W. A. (1999). The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo. *J. Neurosci* 19, 8454-8463.

## S

---

Saglietti, L., Dequidt, C., Kamieniarz, K., Rousset, M., Valnegri, P., Thoumine, O., Beretta, F., Fagni, L., Choquet, D., Sala, C., et al. (2007). Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron* 54, 461-477.

Sala, C., Piëch, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G., et Sheng, M. (2001). Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31, 115-130.

Sala, C., Futai, K., Yamamoto, K., Worley, P. F., Hayashi, Y., et Sheng, M. (2003). Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein Homer1a. *J. Neurosci* 23, 6327-6337.

Samelson, L. E., Harford, J. B., et Klausner, R. D. (1985). Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 43, 223-231.

Sans, N., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Blahos, J., Hell, J. W., et Wenthold, R. J. (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J. Neurosci* 20, 1260-1271.

Sapkota, G. P., Kieloch, A., Lizcano, J. M., Lain, S., Arthur, J. S., Williams, M. R., Morrice, N., Deak, M., et Alessi, D. R. (2001). Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90(RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys(433), is essential for LKB1 to suppress cell growth. *J. Biol. Chem* 276, 19469-19482.

Sarmiere, P. D., et Bamberg, J. R. (2004). Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *J. Neurobiol* 58, 103-117.

Schlomann, U., Schwamborn, J. C., Müller, M., Fässler, R., et Püschel, A. W. (2009). The stimulation of dendrite growth by Sema3A requires integrin engagement and focal adhesion kinase. *J. Cell. Sci* 122, 2034-2042.

Schmitt, U., Abou El-Ela, A., Guo, L. J., Glavinas, H., Krajcsi, P., Baron, J. M., Tillmann, C., Hiemke, C., Langguth, P., et Härtter, S. (2006). Cyclosporine A (CsA) affects the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the atypical antipsychotic amisulpride probably via inhibition of P-glycoprotein (P-gp). *J Neural Transm* 113, 787-801.

Schoepp, D. D., Jane, D. E., et Monn, J. A. (1999). Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38, 1431-1476.

Schwamborn, J. C., et Püschel, A. W. (2004a). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat. Neurosci* 7, 923-929.

- Schwamborn, J. C., et Püschel, A. W. (2004b). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat. Neurosci* 7, 923-929.
- Schwartz, M. L., Rakic, P., et Goldman-Rakic, P. S. (1991). Early phenotype expression of cortical neurons: evidence that a subclass of migrating neurons have callosal axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 1354-1358.
- Schwartz, N., Schohl, A., et Ruthazer, E. S. (2009). Neural activity regulates synaptic properties and dendritic structure in vivo through calcineurin/NFAT signaling. *Neuron* 62, 655-669.
- Seeburg, P. H., et Hartner, J. (2003). Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. *Curr. Opin. Neurobiol* 13, 279-283.
- Seidenman, K. J., Steinberg, J. P., Huganir, R., et Malinow, R. (2003). Glutamate receptor subunit 2 Serine 880 phosphorylation modulates synaptic transmission and mediates plasticity in CA1 pyramidal cells. *J. Neurosci* 23, 9220-9228.
- Seki, T., et Arai, Y. (1993). Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J. Neurosci* 13, 2351-2358.
- Selmeczy, Z., Vizi, E. S., Csóka, B., Pacher, P., et Haskó, G. (2008). Role of nonsynaptic communication in regulating the immune response. *Neurochem. Int* 52, 52-59.
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., et Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol* 478, 359-378.
- Serrano, P. A., Rodriguez, W. A., Pope, B., Bennett, E. L., et Rosenzweig, M. R. (1995). Protein kinase C inhibitor chelerythrine disrupts memory formation in chicks. *Behav. Neurosci* 109, 278-284.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., et Rakic, P. (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286, 741-746.
- Sharp, D. J., Yu, W., Ferhat, L., Kuriyama, R., Rueger, D. C., et Baas, P. W. (1997). Identification of a microtubule-associated motor protein essential for dendritic differentiation. *J. Cell Biol* 138, 833-843.
- Shatz, C. J. (2009). MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron* 64, 40-45.
- Shechter, R., Ronen, A., Rolls, A., London, A., Bakalash, S., Young, M. J., et Schwartz, M. (2008). Toll-like receptor 4 restricts retinal progenitor cell proliferation. *J. Cell Biol* 183, 393-400.
- Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G., et Poo, M. (2007). LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129, 565-577.
- Shen, K., et Meyer, T. (1999a). Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science* 284, 162-166.
- Shen, K., et Meyer, T. (1999b). Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science* 284, 162-166.

- Sheng, M. (2001). Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98, 7058-7061.
- Sheng, M., et Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem* 76, 823-847.
- Shi, J., Levinson, D. F., Duan, J., Sanders, A. R., Zheng, Y., Pe'er, I., Dudbridge, F., Holmans, P. A., Whittemore, A. S., Mowry, B. J., et al. (2009a). Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 460, 753-757.
- Shi, L., Smith, S. E. P., Malkova, N., Tse, D., Su, Y., et Patterson, P. H. (2009b). Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain Behav. Immun* 23, 116-123.
- Shi, S., Jan, L. Y., et Jan, Y. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112, 63-75.
- Shinjyo, N., Ståhlberg, A., Dragunow, M., Pekny, M., et Pekna, M. (2009). Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells. *Stem Cells* 27, 2824-2832.
- Shuto, H., Kataoka, Y., Fujisaki, K., Nakao, T., Sueyasu, M., Miura, I., Watanabe, Y., Fujiwara, M., et Oishi, R. (1999). Inhibition of GABA system involved in cyclosporine-induced convulsions. *Life Sci* 65, 879-887.
- Shuto, H., Kataoka, Y., Kanaya, A., Matsunaga, K., Sueyasu, M., et Oishi, R. (1998). Enhancement of serotonergic neural activity contributes to cyclosporine-induced tremors in mice. *Eur. J. Pharmacol* 341, 33-37.
- da Silva, J. S., et Dotti, C. G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat. Rev. Neurosci* 3, 694-704.
- Sjölin, H., Robbins, S. H., Bessou, G., Hidmark, A., Tomasello, E., Johansson, M., Hall, H., Charifi, F., Karlsson Hedestam, G. B., Biron, C. A., et al. (2006). DAP12 signaling regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis and down-modulates their function during viral infection. *J. Immunol* 177, 2908-2916.
- Sjölin, H., Tomasello, E., Mousavi-Jazi, M., Bartolazzi, A., Kärre, K., Vivier, E., et Cerboni, C. (2002). Pivotal role of KARAP/DAP12 adaptor molecule in the natural killer cell-mediated resistance to murine cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med* 195, 825-834.
- 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.
- Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., et Patterson, P. H. (2007). Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J. Neurosci* 27, 10695-10702.
- Sobczyk, A., Scheuss, V., et Svoboda, K. (2005). NMDA receptor subunit-dependent [Ca<sup>2+</sup>] signaling in individual hippocampal dendritic spines. *J. Neurosci* 25, 6037-6046.
- Soderling, T. R. (1996). Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases II

- and IV. *Biochim. Biophys. Acta* **1297**, 131-138.
- Soderling, T. R., Chang, B., et Brickey, D. (2001). Cellular signaling through multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem* **276**, 3719-3722.
- Soderling, T. R., et Derkach, V. A. (2000). Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* **23**, 75-80.
- Sorra, K. E., et Harris, K. M. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* **10**, 501-511.
- Sourial-Bassillious, N., Eklöf, A., Scott, L., Aperia, A., et Zelenin, S. (2006). Effect of TNF-alpha on CD3-zeta and MHC-I in postnatal rat hippocampus. *Pediatr. Res* **60**, 377-381.
- Spacek, J., et Hartmann, M. (1983). Three-dimensional analysis of dendritic spines. I. Quantitative observations related to dendritic spine and synaptic morphology in cerebral and cerebellar cortices. *Anat. Embryol* **167**, 289-310.
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* **24**, 417-463.
- Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N., et Wenthold, R. J. (2000). PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* **28**, 887-898.
- Stanners, J., Kabouridis, P. S., McGuire, K. L., et Tsoukas, C. D. (1995). Interaction between G proteins and tyrosine kinases upon T cell receptor.CD3-mediated signaling. *J. Biol. Chem* **270**, 30635-30642.
- Stefansson, H., Ophoff, R. A., Steinberg, S., Andreassen, O. A., Cichon, S., Rujescu, D., Werge, T., Pietiläinen, O. P. H., Mors, O., Mortensen, P. B., et al. (2009). Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* **460**, 744-747.
- Steinberg, M., Adjali, O., Swainson, L., Merida, P., Di Bartolo, V., Pelletier, L., Taylor, N., et Noraz, N. (2004). T-cell receptor-induced phosphorylation of the zeta chain is efficiently promoted by ZAP-70 but not Syk. *Blood* **104**, 760-767.
- 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. (2007a). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* **131**, 1164-1178.
- 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. (2007b). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* **131**, 1164-1178.
- Strack, S., et 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., et 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.

- Streit, W. J., Graeber, M. B., et Kreutzberg, G. W. (1989a). Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp. Neurol* *105*, 115-126.
- Syken, J., Grandpre, T., Kanold, P. O., et Shatz, C. J. (2006). PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science* *313*, 1795-1800.
- Syken, J., et 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.

---

## T

---

- Takai, T. (2005). A novel recognition system for MHC class I molecules constituted by PIR. *Adv. Immunol* *88*, 161-192.
- Takenawa, T., et 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.
- Takeuchi, M., et Fujisawa, H. (1998). New alternatively spliced variants of calmodulin-dependent protein kinase II from rabbit liver. *Gene* *221*, 107-115.
- Tamaru, Y., Nomura, S., Mizuno, N., et Shigemoto, R. (2001). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience* *106*, 481-503.
- Tanaka, M., Duncan, R. S., McClung, N., Yannazzo, J. S., Hwang, S., Marunouchi, T., Inokuchi, K., et Koulen, P. (2006). Homer proteins control neuronal differentiation through IP(3) receptor signaling. *FEBS Lett* *580*, 6145-6150.
- Tashiro, A., Minden, A., et Yuste, R. (2000). Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb. Cortex* *10*, 927-938.
- Telarović, S., Telarović, S., et Mihanović, M. (2007). [Cyclosporine-induced depressive psychosis in a liver transplant patient: a case report]. *Lijec Vjesn* *129*, 74-76.
- Thams, S., Oliveira, A., et Cullheim, S. (2008). MHC class I expression and synaptic plasticity after nerve lesion. *Brain Res Rev* *57*, 265-269.
- Thiels, E., Kanterewicz, B. I., Knapp, L. T., Barrionuevo, G., et 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.
- Thiels, E., Norman, E. D., Barrionuevo, G., et Klann, E. (1998). Transient and persistent increases in protein phosphatase activity during long-term depression in the adult hippocampus in vivo. *Neuroscience* *86*, 1023-1029.
- Tirelli, E., Laviola, G., et Adriani, W. (2003). Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev* *27*, 163-178.
- Tomita, S., Chen, L., Kawasaki, Y., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Nicoll, R. A., et Bredt, D. S. (2003).

Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J. Cell Biol* *161*, 805-816.

Tong, G., Takahashi, H., Tu, S., Shin, Y., Talantova, M., Zago, W., Xia, P., Nie, Z., Goetz, T., Zhang, D., et al. (2008). Modulation of NMDA receptor properties and synaptic transmission by the NR3A subunit in mouse hippocampal and cerebrcortical neurons. *J. Neurophysiol* *99*, 122-132.

Toriyama, M., Shimada, T., Kim, K. B., Mitsuba, M., Nomura, E., Katsuta, K., Sakumura, Y., Roepstorff, P., et Inagaki, N. (2006). Shootin1: A protein involved in the organization of an asymmetric signal for neuronal polarization. *J. Cell Biol* *175*, 147-157.

Townsend, M., Yoshii, A., Mishina, M., et Constantine-Paton, M. (2003). Developmental loss of miniature N-methyl-D-aspartate receptor currents in NR2A knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *100*, 1340-1345.

Tran, P. B., Ren, D., et Miller, R. J. (2005). The HIV-1 coat protein gp120 regulates CXCR4-mediated signaling in neural progenitor cells. *J. Neuroimmunol* *160*, 68-76.

Tropea, M., Johnson, M. I., et Higgins, D. (1988). Glial cells promote dendritic development in rat sympathetic neurons in vitro. *Glia* *1*, 380-392.

Tsuji, A., Tamai, I., Sakata, A., Tenda, Y., et Terasaki, T. (1993). Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol* *46*, 1096-1099.

Tucker, K. L., Meyer, M., et Barde, Y. A. (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat. Neurosci* *4*, 29-37.

Tybulewicz, V. L. J. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr. Opin. Immunol* *17*, 267-274.

## U

---

Ulbrich, M. H., et Isacoff, E. Y. (2007). Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods* *4*, 319-321.

Usui, S., Konno, D., Hori, K., Maruoka, H., Okabe, S., Fujikado, T., Tano, Y., et Sobue, K. (2003). Synaptic targeting of PSD-Zip45 (Homer 1c) and its involvement in the synaptic accumulation of F-actin. *J. Biol. Chem* *278*, 10619-10628.

Uusi-Oukari, M., et Korpi, E. R. (2010). Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol. Rev* *62*, 97-135.

## V

---

Vaillant, A. R., Zanassi, P., Walsh, G. S., Aumont, A., Alonso, A., et Miller, F. D. (2002). Signaling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron* *34*, 985-998.

- Vandenberghe, W., Nicoll, R. A., et Bredt, D. S. (2005). Interaction with the unfolded protein response reveals a role for stargazin in biosynthetic AMPA receptor transport. *J. Neurosci* 25, 1095-1102.
- Vivier, E., Nunès, J. A., et Vély, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306, 1517-1519.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., et Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol* 9, 503-510.
- Vodrazka, P., Korostylev, A., Hirschberg, A., Swiercz, J. M., Worzfeld, T., Deng, S., Fazzari, P., Tamagnone, L., Offermanns, S., et Kuner, R. (2009). The semaphorin 4D-plexin-B signalling complex regulates dendritic and axonal complexity in developing neurons via diverse pathways. *Eur. J. Neurosci* 30, 1193-1208.

## W

---

- Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K., et Mueller, B. K. (2000). Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J. Cell Biol* 149, 263-270.
- Watanabe, Y., Someya, T., et Nawa, H. (2010). Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models. *Psychiatry Clin. Neurosci* 64, 217-230.
- Wayman, G. A., Impey, S., Marks, D., Saneyoshi, T., Grant, W. F., Derkach, V., et Soderling, T. R. (2006). Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron* 50, 897-909.
- Weissman, A. M., Baniyash, M., Hou, D., Samelson, L. E., Burgess, W. H., et Klausner, R. D. (1988). Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239, 1018-1021.
- Wenthold, R. J., Petralia, R. S., Blahos J, I. I., et Niedzielski, A. S. (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J. Neurosci* 16, 1982-1989.
- Whitford, K. L., Dijkhuizen, P., Polleux, F., et Ghosh, A. (2002a). Molecular control of cortical dendrite development. *Annu. Rev. Neurosci* 25, 127-149.
- Whitford, K. L., Marillat, V., Stein, E., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Chédotal, A., et Ghosh, A. (2002b). Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron* 33, 47-61.
- Williams, D. W., et Truman, J. W. (2004). Mechanisms of dendritic elaboration of sensory neurons in *Drosophila*: insights from in vivo time lapse. *J. Neurosci* 24, 1541-1550.
- Williams, J. M., Guévremont, D., Mason-Parker, S. E., Luxmanan, C., Tate, W. P., et Abraham, W. C. (2007). Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors during long-term potentiation in awake adult animals. *J. Neurosci* 27, 14171-14178.
- Wilson, C. B., Rowell, E., et Sekimata, M. (2009). Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol* 9, 91-105.

Witke, W., Sutherland, J. D., Sharpe, A., Arai, M., et Kwiatkowski, D. J. (2001). Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *98*, 3832-3836.

Witte, H., et Bradke, F. (2008). The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr. Opin. Neurobiol* *18*, 479-487.

Wu, G. Y., Zou, D. J., Rajan, I., et Cline, H. (1999). Dendritic dynamics in vivo change during neuronal maturation. *J. Neurosci* *19*, 4472-4483.

---

## X

---

Xu, H., Chen, H., Ding, Q., Xie, Z., Chen, L., Diao, L., Wang, P., Gan, L., Crair, M. C., et Tian, N. (2010). The immune protein CD3zeta is required for normal development of neural circuits in the retina. *Neuron* *65*, 503-515.

---

## Y

---

Yashiro, K., et Philpot, B. D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* *55*, 1081-1094.

Yi, Z., Petralia, R. S., Fu, Z., Swanwick, C. C., Wang, Y., Prybylowski, K., Sans, N., Vicini, S., et Wenthold, R. J. (2007). The role of the PDZ protein GIPC in regulating NMDA receptor trafficking. *J. Neurosci* *27*, 11663-11675.

Yoshimura, T., Arimura, N., Kawano, Y., Kawabata, S., Wang, S., et Kaibuchi, K. (2006). Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *340*, 62-68.

Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., et Kaibuchi, K. (2005). GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* *120*, 137-149.

Yu, W., Cook, C., Sauter, C., Kuriyama, R., Kaplan, P. L., et Baas, P. W. (2000). Depletion of a microtubule-associated motor protein induces the loss of dendritic identity. *J. Neurosci* *20*, 5782-5791.

Yuan, X., Jin, M., Xu, X., Song, Y., Wu, C., Poo, M., et Duan, S. (2003). Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat. Cell Biol* *5*, 38-45.

Yuste, R., et Bonhoeffer, T. (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci* *5*, 24-34.

---

## Z

---

Zhang, L., Kirschstein, T., Sommersberg, B., Merkens, M., Manahan-Vaughan, D., Elgersma, Y., et Beck, H. (2005). Hippocampal synaptic metaplasticity requires inhibitory

- autophosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II. *J. Neurosci* *25*, 7697-7707.
- Zhao, J., Peng, Y., Xu, Z., Chen, R., Gu, Q., Chen, Z., et Lu, W. (2008). Synaptic metaplasticity through NMDA receptor lateral diffusion. *J. Neurosci* *28*, 3060-3070.
- Zhong, W., et Chia, W. (2008). Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr. Opin. Neurobiol* *18*, 4-11.
- Zhou, J., Stanners, J., Kabouridis, P., Han, H., et Tsoukas, C. D. (1998). Inhibition of TCR/CD3-mediated signaling by a mutant of the hematopoietically expressed G16 GTP-binding protein. *Eur. J. Immunol* *28*, 1645-1655.
- Zhou, L., Martinez, S. J., Haber, M., Jones, E. V., Bouvier, D., Doucet, G., Corera, A. T., Fon, E. A., Zisch, A. H., et Murai, K. K. (2007). EphA4 signaling regulates phospholipase C $\gamma$ 1 activation, cofilin membrane association, and dendritic spine morphology. *J. Neurosci* *27*, 5127-5138.
- Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y., et Malinow, R. (2000). Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat. Neurosci* *3*, 1098-1106.
- Zhu, J. J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., et Malinow, R. (2002). Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* *110*, 443-455.
- Ziff, E. B. (2007). TARPs and the AMPA receptor trafficking paradox. *Neuron* *53*, 627-633.
- Zohar, O., Reiter, Y., Bennink, J. R., Lev, A., Cavallaro, S., Paratore, S., Pick, C. G., Brooker, G., et Yewdell, J. W. (2008). Cutting edge: MHC class I-Ly49 interaction regulates neuronal function. *J. Immunol* *180*, 6447-6451.
- Zolessi, F. R., Poggi, L., Wilkinson, C. J., Chien, C., et Harris, W. A. (2006). Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo. *Neural Dev* *1*, 2.

## Rôle de la molécule immune CD3 $\zeta$ dans le développement neuronal et les fonctions cérébrales

*Le développement neuronal se construit selon une succession d'étapes aboutissant à la formation d'un réseau fonctionnel. Des données récentes montrent que des molécules bien décrites dans le système immunitaire (SI) possèdent également un rôle non immun dans certaines étapes du développement cérébral. Nous avons cherché à identifier la fonction de la protéine CD3 $\zeta$ , constituant majeur du complexe CD3 des lymphocytes T, au cours de la neuritogenèse et de la différenciation dendritique.*

*Au cours du développement neuronal précoce, nos analyses immunohistochimiques sur des neurones différenciés à partir de cellules souches neurales montrent que le CD3 $\zeta$  est présent dès la naissance des neurones et est impliqué dans l'émergence des premiers prolongements neuronaux. Des approches combinées de perte et de gain de fonction révèlent qu'au cours de la formation des neurites, le CD3 $\zeta$  joue un rôle inhibiteur sur la formation des neurites, en stabilisant l'émergence fines structures immatures, appelées filopodes, via la protéine Rho GEF Vav2. De façon intéressante, cette action inhibitrice de CD3 $\zeta$  est conservée à des stades de développement plus tardifs lors de la dendritogenèse. A ce stade, CD3 $\zeta$  régule négativement la croissance dendritique.*

*Notre étude a permis d'identifier un rôle inédit de la protéine CD3 $\zeta$  dans le système nerveux central. Nous avons montré que CD3 $\zeta$  agit comme un frein moléculaire dans l'élaboration des prolongements neuronaux. Ces résultats sont particulièrement importants pour appréhender les effets potentiels neuropathologiques sur le système nerveux central lors de thérapies ciblant le SI.*

*Mots clés : CD3 $\zeta$ , filopode, neurite, Vav2, dendrites, croissance.*

## Role of the immune molecule CD3 $\zeta$ in neuronal development and cerebral functions

*Neuronal development is achieved by a complex process leading to the formation of a functional network. Recent data showed that well-known molecules previously characterized in the immune system have also non immune functions in critical stages of cerebral development. The aim of our study was to identify the function of CD3 $\zeta$ , a major component of the CD3 complex in T lymphocytes, during neuritogenesis and dendrite differentiation.*

*Upon neuronal differentiation from neural stem cells, immunohistochemical studies showed that CD3 $\zeta$  was expressed as soon as neuronal birth, and was involved in the emergence of the first neurites. A combination of loss- and gain-of-function experiments revealed that CD3 $\zeta$  played an inhibitory role on neurite formation by stabilizing the emergence of thin immature structures, called filopodia, through a Rho GEF VAV2-dependant mechanism. Interestingly, this inhibitory action was conserved at latter stages of neuronal development, during neuritogenesis. At this stage, CD3 $\zeta$  negatively regulated dendritic outgrowth.*

*Our study revealed an unexpected role of CD3 $\zeta$  in the central nervous system. We showed that CD3 $\zeta$  acts as a molecular brake in the establishment of neuronal extension. Moreover, our results point out of potential neuropathological consequences on cerebral functions of therapies targeted the immune system.*

*Key words : CD3 $\zeta$ , filopodia, neurite, Vav2, dendrite, growth.*