

Université de Nantes
Faculté de Médecine

Le développement neuronal :
rôle de la protéine adaptatrice CD3zeta
et mécanismes régulant la fonction du
récepteur de chimiokine CXCR4

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Biologie Santé

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Neurobiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Stéphane BAUDOUIN

Le 30 janvier 2008, devant le jury ci-dessous:

Président : Pascal DERKINDEREN, Professeur des Universités, Nantes

Rapporteurs: Ann LOHOF, Professeur des Universités, Paris
William ROSTENE, Directeur de Recherche, Paris

Examineur: Alain BESSIS, Chargé de Recherche, Paris

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

SOMMAIRE

Abréviations utilisées.....	3
Liste des figures	5
Liste des tableaux	6
Avant propos.....	7
INTRODUCTION	10
1 Le développement neuronal	11
1-1 La mise en place des structures anatomiques du cerveau.....	11
1-2 La migration neuronale	13
1-3 Spécification de la polarité neuronale	15
1-4 Des sous structures essentielles au développement : cône de croissance et filopode	18
1-4-1 Définitions.....	18
1-4-2 Dynamique des composants du cytosquelette et des microtubules dans la croissance	20
1-5 Facteurs régulant la formation des prolongements	24
1-5-1 Les facteurs intrinsèques.....	24
1-5-2 Les facteurs extrinsèques	30
1-6 L'établissement des contacts synaptiques	35
1-7 Une classe de molécules émergente dans le développement du système nerveux central : les molécules du système immunitaire	37
1-7-1 Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et les molécules associées	38
1-7-2. Les molécules à domaines ITAM et ITIM	42
1-7-3. Les molécules du complément.....	43
1-7-4. Les récepteurs toll-like	44
2 CD3 ζ : molécule adaptatrice dans les systèmes immunitaire et nerveux.....	46
2-1 Structure de CD3 ζ	46
2-2 Les récepteurs couplés à CD3 ζ et les fonctions associées.	49
2-3 Signalisation intracellulaire déclenchée par l'activation de CD3 ζ	55
2-4 CD3 ζ dans le système nerveux central	58
3 La chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4	60
3-1 Les chimiokines et leurs récepteurs.....	60
3-2 La chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4 dans le SNC	61
3-2-1 La chimiokine SDF-1	61
3-2-2 Le récepteur CXCR4.....	62
3-2-3 Rôles physiologiques de SDF-1 et CXCR4 dans le cerveau	63
3-3 La régulation de l'expression par les voies d'endocytose.	66
Objectifs de l'étude	69

RESULTATS.....	71
Article n°1: La protéine adaptatrice de signalisation CD3 ζ est un régulateur négatif du développement des dendrites dans les neurones immatures ..	72
Article n°2: Redistribution sélective au niveau des dendrites du récepteur de chimiokine CXCR4 suite à une stimulation agoniste.....	87
DISCUSSION et PERSPECTIVES	98
Conclusion	113
BIBLIOGRAPHIE.....	114

Abréviations utilisées

+TIP : plus end tracking protein

Actine-F/G : actine filamenteuse/globulaire

BAT-3 : antigen-b-associated 3

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

CBP: CREB binding protein

CMH I : complexe majeur d'histocompatibilité de type I

CREB : cAMP response element binding

CREST : calcium-response transactivator

Dscam : Down syndrome-related cell adhesion molecule

ECM : éléments de la matrice extracellulaire

ERK : extracellular signal-regulated kinase-1

Fc/Ig : fragment constant (Fc) des immunoglobulines (Ig)

GAP: protéines activatrices des GTPases

GEF : facteurs d'échange de la guanine

GFP: green fluorescent protein

GITR : glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related

GRK : G-proteins kinases coupled receptor

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif

LAT : linker for activation of T cells

LRR : leucine-rich repeat

LT : lymphocyte T

MAC : molécules d'adhésion cellulaire

MAP/MAP2 : microtubules associated molecules

MAPK : mitogen-activated protein kinases

NFAT : nuclear factor of activated T-Cell

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NgCAM : molécule d'adhésion cellulaire neurone-glie

NGF : nerve growth factor

NGL : noyau géniculé latéral

NK : natural killer

NT-3/NT-4 : neurotrophine-3/-4

P75NTR : récepteur aux neurotrophines p75

PDZ : PSD-95 discs large zona occludens-1
PI3K : phosphoinositide-3-kinase
PLCg : phospholipase C g
PKC/aPKC: protéine kinase C, PKC atypique
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate
PP2 : 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine
PSD : densité post-synaptique
PSD-95 : protéine de la densité post-synaptique-95
RCPG : récepteur couplé aux protéines G
SDF-1 : Stromal Derived Factor-1
Sema3A : sémaphorine 3A
SH2/SH3 : src homology domain 2/3
SI : système immunitaire
SNC : système nerveux central
Syk : spleen tyrosine kinase
TCR : récepteur des cellules T
Trk : récepteur tyrosine kinase
TTX : tétrodotoxine
VAMP2 : protéine membranaire associée aux vésicules 2
ZAP70 : ζ -associated protein

Liste des figures

Figure 1 Dessin de neurone par Dieters	7
Figure 2 Neurulation chez l'embryon humain	12
Figure 3 Polarisation neuronale <i>in vivo</i>	16
Figure 4 Etablissement de la polarisation neuronale <i>in vitro</i>	17
Figure 5 Organisation du cône de croissance en sous-domaines structuraux	18
Figure 6 Composition moléculaire d'un filopode	19
Figure 7 Etapes de l'élongation du cône de croissance	22
Figure 8 Voies de signalisation induites par la fixation des neurotrophines à leurs récepteurs	31
Figure 9 Modèle d'établissement de stabilisation et d'élimination des contacts synaptiques	36
Figure 10 La voie réticulo-géniculée	39
Figure 11 Modèle d'élimination synaptique reposant sur la fonction de DAP12 et du CMH I	41
Figure 12 Structure de CD3 ζ	46
Figure 13 Les récepteurs associés à CD3 ζ dans le système immunitaire	51
Figure 14 L'activation de CD3 ζ suite à la liaison de SDF-1 avec CXCR4	54
Figure 15 Les voies de signalisation induites par la phosphorylation de CD3 ζ suite à la fixation du CMH I au TCR	57
Figure 16 Défaut de développement chez les souris CD3 ζ -/-	58
Figure 17 Classification structurale des différentes chimiokines	60
Figure 18 Les voies de signalisation SDF-1/CXCR4 et leurs regulations	63
Figure 19 Schéma synthétisant les différentes étapes de l'endocytose des RCPGs.....	67
Figure 20 Modèle de travail tiré de l'étude portant sur la fonction de CD3 ζ au cours du développement neuronal	99
Figure 21 Modèle de travail tiré de l'étude portant sur la régulation de la fonction de SDF-1 par l'internalisation de CXCR4 au cours de la formation des prolongements neuronaux	109

Liste des tableaux

Tableau 1 Exemple de facteurs intrinsèques influençant la croissance des prolongements	24
Tableau 2 Exemple de facteurs extrinsèques influençant la croissance des prolongements	30
Tableau 3 Molécules recrutées suite à la phosphorylation de CD3 ζ	48

Avant propos

En 1865, dans un ouvrage posthume de Otto Friedrich Karl Deiters (figure 1), fut proposé le premier modèle de cellule nerveuse individualisée composé d'un corps cellulaire, d'un axone et de dendrites. A la suite de cette découverte fut établie par Santiago Ramón y Cajal (prix Nobel en 1906) la doctrine neuronale qui présente le neurone comme une unité développementale autonome dont le corps cellulaire est le centre génétique, nutritif et fonctionnel, l'axone le pôle émetteur et les dendrites le pôle récepteur. De plus cette théorie soutenait que le réseau neuronal est formé de neurones communiquant entre eux par l'intermédiaire de synapses. L'établissement de la doctrine neuronale posa alors les bases nécessaires à la compréhension des mécanismes cellulaires du développement neuronal. Aujourd'hui on peut schématiquement distinguer quatre phases principales pour ce développement. Durant l'embryogénèse, la première phase est une différenciation des cellules souches neurales contenues dans le tube neural en neurones. La seconde étape est la migration des neurones nouvellement formés vers leur région cérébrale appropriée. Cette étape est concomitante de la troisième au cours de laquelle les neurones forment un prolongement axonal puis des prolongements dendritiques. Bien après que les neurones aient atteint leur région cérébrale, les axones et les dendrites vont continuer de se développer et, grâce à une bonne balance entre des processus de guidage et de croissance, vont entrer en contact pour former des synapses. La formation et la maturation des synapses constituent la dernière étape du développement en permettant la formation d'un réseau de communication fonctionnel organisant les fonctions cérébrales.

Dans les années 1950 Rita Lévi-Montalcini (prix Nobel en 1986) mit en évidence le nerve growth factor (NGF), un des tous premiers facteurs moléculaire impliqué dans le développement neuronal. Depuis ont été mis en évidence de nombreux autres facteurs pouvant inhiber ou favoriser ce développement. Ces

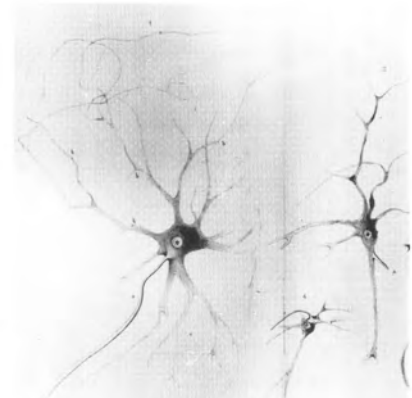


Figure 1 Dessin de neurone par Dieters

Dans son ouvrage posthume de 1865, Dieters décrits le premier le neurone comme une cellule composée d'un corps cellulaire, d'un axone et de dendrites.

facteurs sont classés par famille selon une nomenclature qui reflète bien souvent la fonction qu'ils exercent au cours du développement. Parmi ces grandes familles on peut citer les facteurs de croissance dont fait parti le NGF, les facteurs de guidage, les molécules d'adhésion ou les molécules d'échafaudage. Au-delà de la fonction qui transparaît par leur nom, ces molécules présentent bien souvent, comme nous le verrons, des fonctions multiples et ne sont pas restreintes à une seule action au cours du développement. Une action coordonnée et séquentielle de l'ensemble de ces facteurs permettra une régulation extrêmement fine, nécessaire pour l'accomplissement du développement neuronal.

Il est apparu ces dernières années que certaines molécules que l'on pensait originellement restreintes au système immunitaire (SI) ont été mises en évidence dans le système nerveux central (SNC) où elles jouent en particulier un rôle au cours du développement cérébral normal dans un contexte non inflammatoire. Le SNC et le SI partageant de nombreux points communs sur des aspects de différenciation, de communication et de reconnaissance cellulaire, il n'est finalement pas étonnant de retrouver des mécanismes moléculaires communs aux deux systèmes. Ces molécules joueraient donc des fonctions non immunes dans le cerveau, pour servir des fonctions propres au SNC tout en utilisant des mécanismes similaires au SI.

Mieux décrypter l'impact de ce type de molécules dans le développement neuronal est important sur le plan fondamental et se révèle être aussi pertinent sur le plan médical. Au cours du développement neuronal, des anomalies peuvent survenir aboutissant parfois à des dysfonctions cérébrales et des pathologies neurodéveloppementales lourdes comme l'autisme et la schizophrénie. Il apparaît au travers de différentes études épidémiologiques que la survenue de ces maladies pourrait être due en partie à des infections au cours du développement fœtal (Stubbs, Ash & Williams 1984; Brown et coll. 2000). Ces infections entraînent chez le fœtus comme chez la mère une réaction immunitaire qui est souvent associée à une inflammation. Une hypothèse actuelle est que dans certains cas les agents infectieux et des molécules inflammatoires atteignent des cellules cérébrales du fœtus avant que la barrière hémato-encéphalique ne se soit complètement formée. Certains auteurs voient dans ce processus une source d'explication des dysfonctions intervenant dans l'étiologie des maladies neurodéveloppementales. En effet, comme il existe une

fonction non immunitaire et non inflammatoire de certaines molécules immunitaires exprimées dans le cerveau normal, on peut supposer qu'une inflammation déclenchée à proximité de cellules neurales peut amener un dérèglement des fonctions normales des protéines en question. Au regard de ces données, l'étude de molécules du système immunitaire intervenant dans des fonctions de régulation du développement neuronal peut donc s'avérer particulièrement intéressante (Boulanger & Shatz 2004).

Le premier volet de ce manuscrit de thèse concerne l'introduction, qui sera divisée en trois parties. Dans une première partie sera posé le cadre général du développement neuronal au niveau cellulaire allant de la différenciation neuronale à la mise en place des connexions synaptiques. Mon sujet de thèse portant sur la formation des prolongements neuronaux, cette étape sera particulièrement détaillée sur les plans cellulaires et moléculaires. Dans la deuxième partie d'introduction seront détaillées les données actuelles sur les fonctions de CD3 ζ dans le système immunitaire ainsi que les études récentes sur ses fonctions dans le système nerveux central. Dans une troisième partie seront présentés les rôles de la chimiokine SDF-1 et de son récepteur CXCR4 dans le système nerveux central ainsi que le mécanisme d'endocytose par lequel CXCR4 est internalisé.

Le second volet de ce mémoire de thèse permettra de présenter les résultats que j'ai obtenus. Je présenterai dans un premier temps l'étude ayant menée à la mise en évidence du rôle de CD3 ζ dans la régulation négative du développement dendritique. Dans une seconde partie je détaillerai le travail qui a abouti à la mise en évidence d'une redistribution différentielle de CXCR4 dans les dendrites et les axones suite à un traitement par SDF-1 au cours de la formation des prolongements neuronaux.

Enfin, je terminerai par une discussion des différents résultats présentés qui seront confrontés aux éléments actuels de la littérature pouvant apporter un éclairage sur le rôle et la régulation des fonctions de CD3 ζ , de SDF-1 et de CXCR4 dans le développement neuronal.

INTRODUCTION

1 Le développement neuronal

La fenêtre de temps au cours de laquelle a lieu le développement neuronal correspond à un stade particulier du développement cérébral durant lequel sont sécrétés des facteurs moléculaires spécifiques. La réponse des neurones à ces stimuli que représentent les facteurs extrinsèques est dépendante du statut intrinsèque des neurones. S'établit alors une communication entre milieu extérieur et intérieur au neurone conditionnant le déroulement du développement neuronal. Ce chapitre abordera tout d'abord la mise en place des structures anatomiques du cerveau puis présentera les étapes du développement neuronal : de la genèse des précurseurs neuronaux jusqu'à l'établissement de la polarité neuronale permettant la formation d'un réseau fonctionnel.

1-1 La mise en place des structures anatomiques du cerveau

L'embryon se développe à partir de quelques cellules contenues dans la paroi interne du blastocyste. Son architecture précoce est déterminée par le processus de gastrulation qui correspond à l'invagination de cellules externes aboutissant à la formation d'un embryon à trois feuillets possédant un axe rostrocaudal et un axe dorsoventral. Deux semaines après la fécondation le processus de gastrulation amène à la différenciation de trois couches distinctes : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. Au niveau du mésoderme va se former une ligne médiane sur toute la longueur de l'embryon qui, en s'individualisant, donnera la corde dorsale. La corde est essentielle à la différenciation nerveuse ultérieure. Elle permet l'induction de la neurulation qui correspond à la transformation d'une partie des cellules ectodermiques sous-jacentes en neuroectoderme destiné à donner le système nerveux.

Les mécanismes de la neurulation se déroulent en quatre stades distincts qui se chevauchent dans le temps et l'espace. A partir de la troisième semaine après la fécondation, l'ectoderme formé au niveau de la face dorsale de l'embryon s'épaissit et se différencie en une plaque neurale. Une modification de la forme des cellules de la région médiodorsale, associée à des forces extrinsèques exercées par l'ectoderme, provoque une incurvation de la plaque neurale qui se creuse en une gouttière dont les bords latéraux se rapprochent et fusionnent sur la ligne médiane. Enfin, la fusion progressant de part et d'autre, il se forme un tube neural creux et ouvert aux deux extrémités qui se fermera au cours de la quatrième semaine après fécondation. En se séparant de l'ectoderme, le tube neural isole les cellules des crêtes neurales groupées en deux bandes longitudinales en position dorsolatérale. Le tube neural donnera naissance au système nerveux central, les crêtes neurales au système nerveux périphérique somatique et végétatif. Une troisième source de tissu nerveux est constituée par les placodes sensorielles, au nombre de neuf à dix paires chez les vertébrés. Elles ont pour origine des épaissements ectodermiques dans la région céphalique et donneront les ganglions centraux des nerfs crâniens et les organes sensoriels de la tête (Figure 2, Delhaye-Bouchaud 2001).

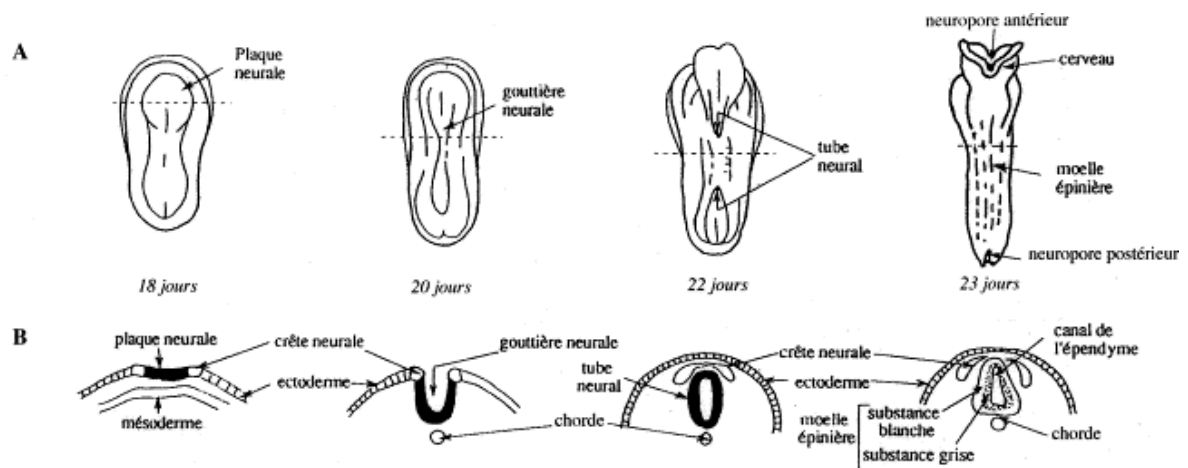


Figure 2 Neurulation chez l'embryon humain

A: vue dorsale de l'embryon à différents stades; B: coupes transversales correspondantes aux niveaux indiqués.

Au sein du tube neural vont alors avoir lieu les mécanismes de différenciation des cellules du tube neurale en cellules neurales. Peu après la fermeture du tube, les cellules columnaires disposées en une seule assise qui forment sa paroi (neuroépithélium) commencent à se diviser de façon répétitive. Au cours des cycles mitotiques, le noyau des cellules du neuroépithélium effectue des mouvements de va et vient de la face externe marginale du tube neural où a lieu la synthèse d'ADN, vers la face interne ventriculaire où a lieu la division cellulaire. Les cellules filles peuvent, soit entamer un nouveau cycle mitotique, soit cesser de se diviser devenant ainsi des neuroblastes ou des précurseurs de cellules gliales. Cette multiplication cellulaire est cruciale car elle est à la base de la dilatation de l'extrémité antérieure du tube neural qui se renfle d'avant en arrière en 3 vésicules appelées prosencéphale (ou cerveau antérieur), mésencéphale (ou cerveau moyen) et rhombencéphale (ou cerveau postérieur), ébauches primaires du cerveau. De ces cellules souches vont aussi se différencier un grand nombre de neuroblastes, environ 250 000 cellules par minute, neuroblastes qui vont ensuite chacun migrer au sein de la structure cérébrale appropriée.

1-2 La migration neuronale

Au sein des structures cérébrales en développement, les neuroblastes nés de la division des cellules souches neuroépithéliales migrent en périphérie du tube neural. Ils forment une nouvelle couche, la couche du manteau, future substance grise du SNC. Cette étape est cruciale pour la structuration fonctionnelle du cerveau car l'emplacement définitif des cellules nerveuses postmitotiques permet d'établir les relations de communication entre groupes de neurones au sein des structures cérébrales. En effet, les relations spatiales spécifiques entre groupes de neurones permettent de définir au sein des différentes populations neuronales les éléments pré- et postsynaptiques entre eux. On connaît assez bien la mécanique des mouvements qui conduit le neurone de son lieu de naissance jusqu'à sa destination finale. Selon leurs régions d'origine dans le système nerveux, les neurones qui migrent adoptent deux méthodes différentes. Les cellules des crêtes neurales sont principalement

guidées le long de leur voie de migration par des molécules d'adhérence spécialisées dans la reconnaissance des protéines de la matrice extracellulaire. A l'inverse, dans de nombreuses régions, dont le cortex, le cervelet, l'hippocampe et la moelle, les neurones se dirigent en rampant le long de la glie radiaire qui sert de guide cellulaire, ce mécanisme est appelé migration radiaire. Ces neurones une fois arrivés au niveau approprié dans le cerveau, vont être soumis à un ensemble de signaux produit par le microenvironnement cellulaire. Par exemple, les cellules de Cajal-Retzius, dont l'origine reste en grande partie inconnue (Yoshida et coll. 2006), induisent sur les neurones en migration un signal répulsif, par la sécrétion de reeline, permettant l'organisation des neurones au sein du cortex (Supèr et coll. 2000). Ces signaux leur permettent de se détacher de la glie radiaire et de rejoindre leurs positionnements définitifs au sein du parenchyme cérébral par un mécanisme de migration tangentielle. Ils vont alors se développer et former deux compartiments cellulaires distincts, l'axone et les dendrites.

Comme présenté en introduction à ce chapitre, la migration est une étape cruciale du développement car elle permet de sélectionner des neuroblastes spécifiques afin de les faire intégrer des régions cérébrales précises. Au niveau moléculaire, c'est la présence ou non des récepteurs aux différents signaux d'attraction qui permettra la sélection de cellules spécifiques. Parmi ces molécules d'attraction, certaines sont impliquées dans les mécanismes de développement neuronal. C'est le cas de certains membres de la famille des chimiokines comme le stromal derived factor-1 (SDF-1) et son récepteur CXCR4, dont nous parlerons par la suite dans le chapitre 3, qui participent à la migration, au guidage axonal et à la croissance des prolongements neuronaux (pour revue Li & Ransohoff 2008). Le déroulement normal de la migration permet donc la sélection de certains types cellulaires, sensibles à des signaux d'attractions spécifiques, signaux qui pourront devenir par la suite cruciaux dans le développement de ces neurones. L'existence de ces mécanismes moléculaires communs montre que les processus de migration et de croissance ne sont pas isolables les uns par rapport aux autres, qu'ils partagent des mécanismes moléculaires communs, dans le but probablement d'un développement coordonné.

1-3 Spécification de la polarité neuronale

La définition de la polarisation neuronale est une étape clé du développement au cours de laquelle sont définis les différents compartiments du neurone. L'axone est généralement le prolongement le plus long et le plus fin du neurone, les dendrites étant relativement courts et épais. Au cours du développement les axones et les dendrites vont former des contacts synaptiques nécessaires à la communication entre neurones. Dans le système nerveux central, le modèle général de fonctionnement présente l'axone comme le pôle émetteur de l'influx électrique. Cette activité électrique est transmise vers les dendrites des neurones contactés par l'action des neurotransmetteurs libérés au niveau des synapses. Les différences morphologiques et moléculaires entre les axones et les dendrites sont à la base des différences fonctionnelles entre ces deux compartiments. L'établissement de cette polarité neuronale se fait au cours de la croissance neuronale.

En effet, *in vivo* comme *in vitro* les neurones en croissance vont d'abord émettre leurs premiers prolongements, les neurites primaires, à partir desquels vont se définir l'axone et les dendrites. *In vivo* dans le cortex la mise en place de la polarisation neuronale a lieu lors de la migration radiaire. Après différenciation, les neurones corticaux migrent le long de la glie radiaire, étape lors de laquelle ils vont rapidement former des neurites primaires et présenter une morphologie bipolaire. Le prolongement de tête restera attaché à la glie permettant la migration du neurone tandis que le prolongement de queue se développera rapidement pour former l'axone, alors même que le corps cellulaire du neurone est encore en migration. Une fois la migration radiaire terminée, le prolongement de tête deviendra le dendrite primaire. Ce dendrite se développera à la fin de la migration tangentielle lorsque la région cérébrale appropriée sera atteinte (figure 3, Barnes, Solecki & Polleux 2008). Dans le cervelet, où ce mécanisme est aussi 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.

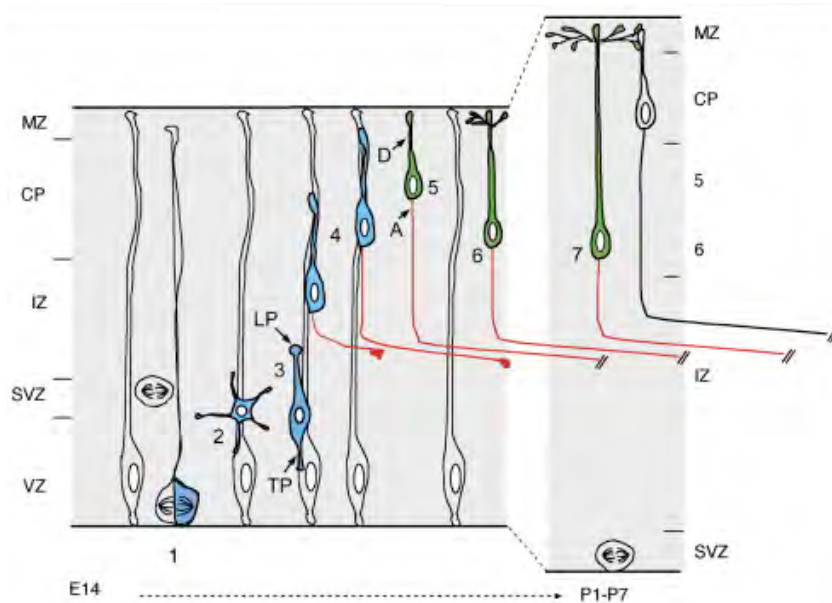


Figure 3 Polarisation neuronale *in vivo*

L'émergence de l'axone des neurones corticaux a lieu lors de la migration radiaire au sein de la zone intermédiaire (IZ) à partir du prolongement de queue (TP). L'émergence du dendrite a lieu à la fin de la migration radiaire à partir du prolongement de tête, au sein des couches 5 et 6.

VZ : zone ventriculaire; SVZ : zone sous ventriculaire; IZ : zone intermédiaire; CP : lame corticale; MZ : zone moléculaire.

L'un des modèles de développement *in vitro* le plus couramment utilisé est le modèle décrit par Banker. A partir de neurones d'hippocampes *in vitro* ces auteurs ont décrit un patron général de développement à partir de critères morphologiques (Craig & Banker 1994; Dotti, Sullivan & Banker 1988). Dans ce modèle, la mise en place de la polarisation neuronale se fait selon le même schéma que celui observé *in vivo*. Quelques heures après ensemencement des cellules, des filopodes vont être émis à partir du corps cellulaire (stade 1) et donner 4 à 5 petits prolongements appelés neurites mineurs (stade 2). Un de ces neurites va croître en premier pour former l'axone (stade 3), les autres neurites se développeront 1 à 2 jours après pour devenir les dendrites et former l'arborisation dendritique (stade 4) (figure 4, Arimura & Kaibuchi 2007).

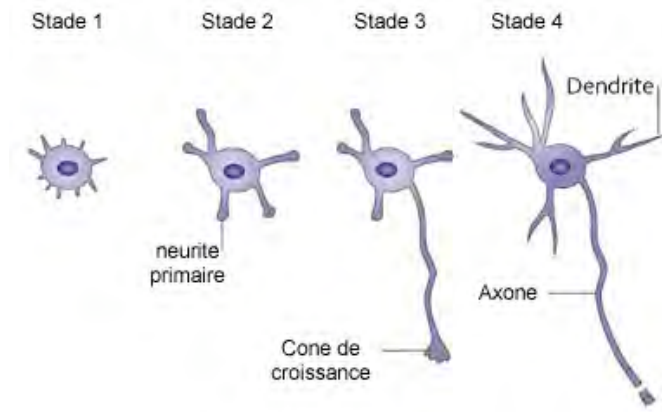


Figure 4 Etablissement de la polarisation neuronale *in vitro*

L'établissement de la polarisation de neurones d'hippocampe de rat *in vitro* suit 4 étapes. Le corps cellulaire tout d'abord émet les filopodes (stade 1) desquels vont émerger les neurites mineurs (stade 2). L'une d'entre elles va se différencier en axone (stade 3). Les autres formeront les dendrites (stade 4).

In vitro et *in vivo*, l'apparition de l'axone est l'évènement premier qui permet la polarisation des neurones. Au niveau moléculaire, la pousse neuritique est stoppée rapidement suite à l'établissement d'un équilibre entre les effets de signaux inhibant la pousse et de signaux l'activant. L'apparition de l'axone a lieu à la suite de la rupture de cet équilibre, par un excès de signaux positifs par exemple (Ye & Jan 2006; Arimura & Kaibuchi 2007). A partir des autres neurites se développeront ensuite les dendrites. L'identité de ces signaux positifs n'est pas encore connue mais l'existence d'une polarisation *in vitro* suppose fortement l'implication de facteurs majoritairement intrinsèques (Jan & Jan 2003, Arimura & Kaibuchi 2007). En effet, la comparaison entre les modèles *in vitro* et *in vivo* montre que la mise en place de la polarisation suit un décours similaire avec schématiquement l'apparition en premier des neurites primaires, puis de l'axone et enfin des dendrites, laissant supposer que la croissance neuronal suit un programme établi.

L'établissement de la polarité neuronale représente la première étape de la formation de l'axone et des dendrites. Le développement coordonné de ces deux compartiments neuronaux est déterminant pour assurer au final la mise en place adéquate des connexions synaptiques dans le cerveau.

1-4 Des sous structures essentielles au développement : cône de croissance et filopode

Il est maintenant bien établi que les différences de composition moléculaire entre l'axone et les dendrites permettent une action régulatrice spécifique de chacun des deux compartiments. Cependant il existe des sous-structures communes aux dendrites et aux axones qui jouent un rôle fondamental dans la croissance : les cônes de croissance et les filopodes. La croissance des neurites, de l'axone et des dendrites ne se fait pas sans la spécification d'une zone particulière, le cône de croissance, située à l'extrémité des prolongements et par laquelle les neurites vont pousser. Au cours de la pousse, des prolongements secondaires vont se former et se développer le long du prolongement principal. L'apparition de ces embranchements est dépendante de l'existence le long des neurites de petites structures très dynamiques, trouvées aussi dans le cône de croissance, les filopodes, à partir desquels les embranchements vont être générés.

1-4-1 Définitions

1. Le cône de croissance

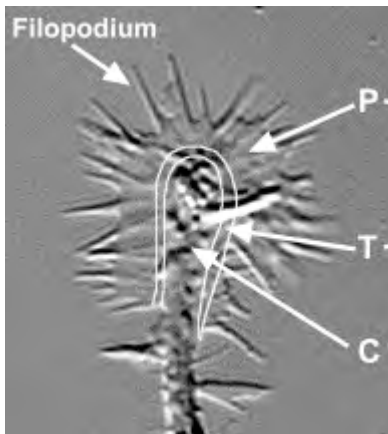


Figure 5 Organisation du cône de croissance en sous-domaines structuraux

P : domaine périphérique riche en actine contenant les filopodes et les lamellipodes.

T : domaine transitoire.

C : domaine central riche en microtubules, organelles et vésicules.

Le cône de croissance a été observé pour la première fois sur des axones en 1909 par Cajal dans la moelle épinière d'un embryon de poulet. Cajal notait déjà une extrême motilité du cône de croissance, motilité qui fut confirmée par les observations de Harrison (1907-1908) sur les mêmes cellules *in vitro*. On apprendra bien plus tard que c'est la composition moléculaire particulièrement riche en actine et en microtubules qui rend le cône de croissance si mobile (Mallavarapu & Mitchison 1999). Le cône de croissance est une structure divisée en trois domaines, périphérique (P), transitoire (T) et central (C), définis par leur composition moléculaire (figure 5, Dent & Gertler 2003). La région P est riche en actine et contient les lamellipodes et les filopodes. La région C est riche en microtubules et est aussi composée de nombreuses organelles et vésicules. La région T constitue une région transitoire entre les deux précédentes. Du point de vue ultrastructural, l'extrémité du cône de croissance est composée de deux compartiments essentiels, les lamellipodes et les filopodes (figure 6, Huber et al. 2003), qui contiennent des microfilaments d'actine et de myosine pouvant s'allonger ou se rétracter en fonction du milieu extracellulaire.

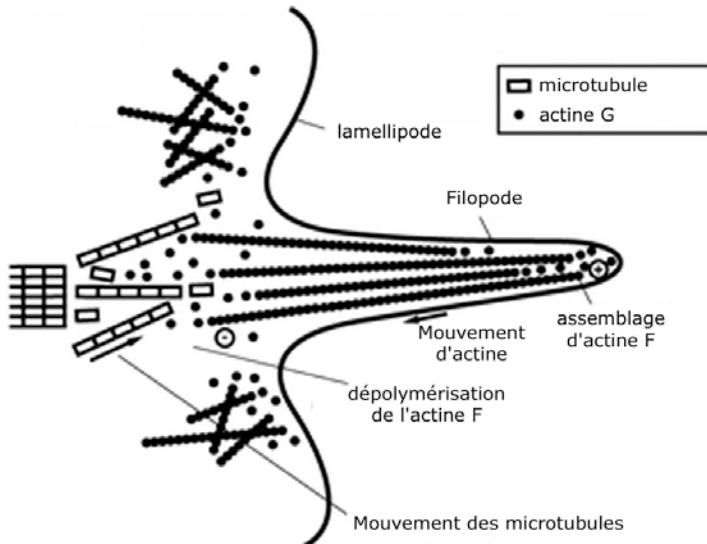


Figure 6 Composition moléculaire d'un filopode

Un filopode est composé de filaments d'actines très mobiles. Ces filaments d'actine sont en contact avec les microtubules mobiles contenus dans la région T du cône de croissance ou dans le tronc des dendrites et des axones.

2. Les filopodes

Les filopodes sont des protrusions ressemblant à un doigt. Ils sont riches en actine polymérisée qui forme une structure moléculaire filamenteuse (actine F), disposée parallèlement au sein des filopodes. Les filopodes sont présents comme décrit précédemment sur le cône de croissance mais aussi le long des axones et

des dendrites. Dû à leur richesse en actine F, les filopodes sont extrêmement mobiles et décrivent d'incessants mouvements d'exploration de l'environnement. L'actine contenue dans les filopodes est en relation avec les microtubules contenus dans le tronc des dendrites. Au sein des cônes de croissance, l'actine des filopodes est en contact avec les microtubules du domaine T. C'est la coordination entre la dynamique de l'actine et des microtubules contenus dans ces différents domaines qui permet la croissance des prolongements.

1-4-2 Dynamique des composants du cytosquelette et des microtubules dans la croissance

Les premières expériences sur des neurones de poulet ont montrées que la croissance est un mécanisme dépendant de l'organisation des filaments d'actine au sein des filopodes et des microtubules au cœur du cône de croissance (Yamada, Spooner & Wessells 1970). L'implication des microtubules dans la croissance a été par la suite confirmée par des études qui ont montrées que l'application d'inhibiteurs de polymérisation des microtubules, le nocodazole et la colchicine, empêche la pousse neuritique, sans affecter cependant l'apparition des filopodes (Keith 1990). A l'inverse, le rôle de l'actine dans la croissance est apparu moins évident. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de l'actine, les cytochalasines, sur des neurones en culture n'a pas montré d'inhibition de la pousse neuritique, mais un défaut de formation et de motilité des filopodes (Marsh & Letourneau 1984; Dent & Kalil 2001). Il apparaît aujourd'hui que les mécanismes de croissances reposent plus sur une interaction de l'actine avec les microtubules que sur un rôle direct de ces deux molécules.

1-4-2-1 Définitions

1. L'actine.

Les monomères d'actine (appelés aussi actine globulaire ou actine G) existent sous trois formes, liés à l'ADP, à l'ADP-pi (ADP liée au phosphate inorganique) et et à l'ATP. L'association de ces monomères forme l'actine F. La dynamique de

formation de l'actine est la suivante : liée à l'ATP elle s'associe pour former les filaments, l'ATP est hydrolysé en ADP-pi et finalement en ADP, poussant les filaments à se dépolymériser. L'extrémité où a lieu la polymérisation est appelée « extrémité - » et l'autre « extrémité + ». Dans les filopodes « l'extrémité + » est tournée vers l'intérieur du cône de croissance (figure 6). L'actine F par sa liaison à la myosine peut fixer différentes molécules mais aussi des organelles qui vont se mouvoir le long du filament.

2. Les microtubules.

Les microtubules sont assemblés à partir de sous unités, a et b; ces sous unités sont composées de tubuline du même nom. Il existe 6 gènes codant pour la tubuline a et 7 pour la tubuline b, leurs associations variables confèrent aux microtubules une grande variabilité structurelle. La polymérisation, qui nécessite l'hydrolyse de GTP, s'effectue au pôle positif, dit pôle stable, tandis que la dépolymérisation a lieu au pôle négatif, instable. Les microtubules, par leur association à d'autres protéines, les molécules associées aux microtubules (MAP), ont un rôle central dans le transport intracellulaire des vésicules et des mitochondries en particulier. Les molécules stabilisant l'organisation des microtubules les plus connues sont la Microtubule Associated Protein 2 (MAP2) ainsi que les membres de la famille plus end tracking protein (+TIP) (Howard & Hyman 2003). Le mécanisme de régulation de la dynamique des microtubules s'appuie sur des phénomènes de déstabilisation ou de stabilisation de l'organisation des microtubules.

1-4-2-2 Contrôle de l'avancée du cône de croissance.

Le contrôle de la croissance neuritique passe par une modulation de l'organisation des microtubules et de l'actine. Sur ce point, le contrôle de la croissance axonale est beaucoup plus documenté 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 de l'organisation de l'actine et des microtubules dans les cônes de croissance (figure 7, Dent & Gertler 2003). La croissance du cône suit trois étapes (Goldberg & Burmeister 1986). Tout d'abord, une synthèse d'actine va provoquer l'allongement du cône par son extrémité et former une protrusion lamellaire

entre les filopodes. Cette protrusion va ensuite être envahie par les microtubules, amenant dans leur sillage des vésicules membranaires et des organelles (mitochondries, réticulum endoplasmique), c'est l'étape d'engorgement. La consolidation, qui vise à stabiliser le système, se fait ensuite lorsque l'actine F entourant les microtubules disparaît, permettant à la membrane plasmique d'entourer le réseau de microtubules. Le même mécanisme amène à la formation des embranchements le long de l'axone et des dendrites à partir des filopodes (Dent & Gertler 2003).

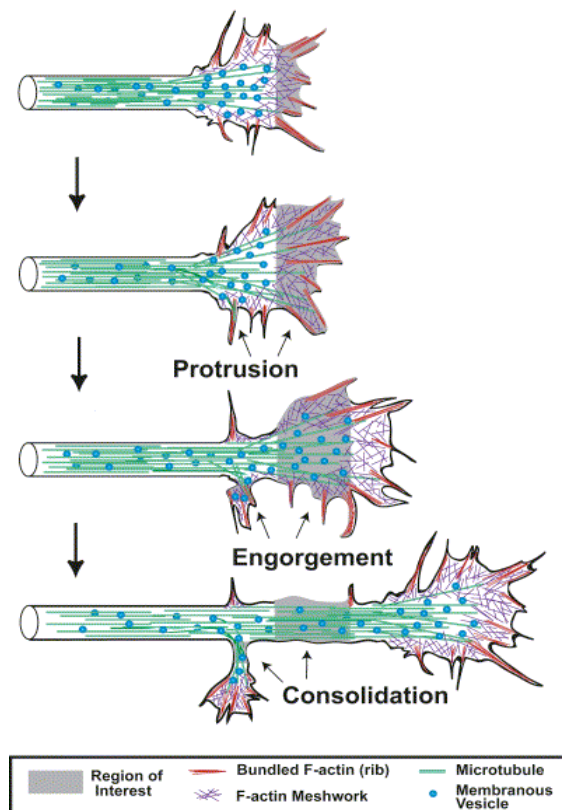


Figure 7 Etapes de l'élongation du cône de croissance

Trois étapes de croissance ont été décrites et nommées: étapes de protrusion, d'engorgement et de consolidation. La protrusion est l'extension du cône de croissance, suivie par l'invasion des microtubules au sein du cône qui est l'étape d'engorgement. Enfin, la consolidation permet la stabilisation du cytosquelette d'actine et des microtubules.

1-4-2-3 Modèle de croissance basé sur l'organisation du cytosquelette et des microtubules

Dans un modèle de croissance que l'on pourrait qualifier de classique, les fonctions de l'actine et des microtubules sont décrites comme découplées. Le cytosquelette d'actine est généralement présenté comme le médiateur intracellulaire final impliqué dans le guidage des prolongements. En effet, son important dynamisme permet de soutenir une réponse rapide du cône de croissance et des filopodes aux signaux de guidage. Le choix de l'orientation est

immédiatement suivi par la croissance du prolongement impliqué. Ces mécanismes ont une dynamique plus lente que l'on met en correspondance avec les caractéristiques dynamiques des microtubules.

Il apparaît cependant l'existence d'une coordination entre ces deux mécanismes, guidage et croissance. Cette coordination sur le plan moléculaire s'appuie sur l'existence d'une classe de microtubules particuliers, nommés microtubules pionniers, qui établissent probablement des interactions directes entre l'actine contenue dans les filopodes et le réseau de microtubules. En effet, ces microtubules pionniers, qui ont la capacité d'explorer de manière constante le réseau d'actine (Schaefer, Kabir & Forscher 2002), permettent la stabilisation du cytosquelette suite à l'application de facteurs de guidage attractifs (Suter, Schaefer & Forscher 2004). A l'inverse, l'application de facteurs de guidage répulsifs provoque le reflux de ces microtubules et amplifie la déstabilisation du cytosquelette (Zhou, Waterman-Storer & Cohan 2002). Ces études montrent que la stabilisation du cytosquelette d'actine passe en partie par l'activité de microtubules particuliers qui pourront établir un lien direct avec le réseau de microtubules, favorisant la croissance. Le modèle classique présenté plus haut et basé sur des observations morphologiques ne semble donc pas recouvrir la totalité des mécanismes moléculaires mis en jeu, en particulier concernant le rôle de l'actine et des microtubules. Il semble plutôt s'établir un mécanisme de communication, basé sur une interrelation actine/microtubules, sur lequel les différents systèmes de régulation de la croissance auront un impact.

1-5 Facteurs régulant la formation des prolongements

1-5-1 Les facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques au neurone peuvent agir soit directement sur la croissance, en ciblant par exemple les microtubules et l'actine, soit indirectement par l'activation de certains gènes. Ce chapitre vise à présenter le fonctionnement de certains régulateurs moléculaires clés de la croissance des prolongements neuronaux. Cette présentation permettra de mettre en évidence le rôle de ces différents régulateurs entre eux mais aussi leurs fonctions de coordinateur du développement neuronal en général.

Famille moléculaire	Protéine	Compartiment cellulaire ciblé	Effet trophique	Interaction moléculaire Connue
Facteurs de transcription	CREST	axone	N.D.	- calcium - Ras
		dendrite	+	
	CREB	axone	N.D.	
		dendrite	+	
	NeuroD	axone	Aucun	
		dendrite	+	
	NFAT	axone	+	
		dendrite	+	
Petites protéines G	RhoA	axone/dendrite	+/-	- microtubules - actine
		dendrite	-	
	Rac1	axone	-	
		dendrite	+	
Protéines d'échafaudage	PSD95, Densin180, Homer	dendrite principalement (axone aussi pour Homer)	-	- microtubules - actine. Modulation de l'effet de récepteurs et protéines d'échafaudage
	Shank, GRIP1		+	

Tableau 1 Exemple de facteurs intrinsèques influençant la croissance des prolongements

1. Les facteurs de transcription

La croissance est un processus qui nécessite la production constante et importante de nouvelles protéines. Parce que le développement est un processus qui suit des étapes définies, cette production est hautement régulée. Il est donc logique d'imaginer que les facteurs de transcription ont un rôle important dans la régulation de ces mécanismes. Ces facteurs sont très nombreux et certainement pas encore tous décrits. Mon propos n'est pas d'en faire une revue exhaustive mais de présenter les plus étudiés et leur importance dans les mécanismes de croissance.

Les facteurs cAMP response element binding (CREB) et calcium-response transactivator (CREST) sont deux facteurs de transcription sensibles au calcium. L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire induit la phosphorylation de CREB. Cette phosphorylation permet au facteur CREB de s'associer à son coactivateur CREB binding protein (CBP) et d'activer ainsi des gènes impliqués dans la croissance (Liu, Chrivia & Latchman 1998). La voie d'activation de CREST dans les neurones est encore inconnue, on sait cependant que lorsqu'il est activé, CREST se lie à CBP pour induire la transcription de certains gènes clés du développement (Aizawa et coll. 2004). CREB et CREST partagent donc le même coactivateur, CBP, ainsi qu'une fonction trophique 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.

L'activité des facteurs de transcription de la famille nuclear factor of activated T-Cell (NFAT) est aussi régulée par la libération de calcium intracellulaire. NFAT est central dans les mécanismes de développement : il a été montré que la liaison des neurotrophines et des facteurs de guidage avec leurs récepteurs respectifs peut induire l'activation de NFAT (Graef et coll. 2003). La liaison de ces molécules induit notamment une augmentation de calcium intracellulaire qui peut activer la calcineurine. La calcineurine déphosphoryle alors NFAT qui va pouvoir se lier à différents coactivateurs puis à l'ADN pour activer la transcription génique. NFAT est un acteur central dans les mécanismes de développement car il participe à l'activation génique au cours des mécanismes de guidage et de croissance. Ces résultats présentent aussi l'existence d'une coordination transcriptionnelle au cours des mécanismes de développement.

NeuroD est un facteur de transcription qui, lorsqu'il est activé, se lie directement à l'ADN pour moduler l'expression génique. NeuroD est impliqué dans les mécanismes de développement dendritique uniquement (Gaudillière et coll. 2004). Il semblerait donc que, contrairement à la majorité des autres facteurs de transcription, NeuroD soit un facteur spécifique du développement dendritique.

2. Les GTPases

Les protéines de la superfamille des GTPases sont principalement connues pour réguler la dynamique d'assemblage des protéines du cytosquelette, via en particulier l'activité des protéines RhoA et Rac1 de la famille GTPases Rho, et pour médier l'activation de facteurs de transcription, via l'activation de Ras. Ayant décrit la fonction des facteurs de transcription dans le paragraphe précédent, ce paragraphe se focalisera d'avantage sur le lien entre les GTPases et le cytosquelette, et donc sur la fonction des GTPases Rho.

RhoA est un acteur central dans la régulation de la croissance axonale, mais son action est différente selon le modèle étudié. RhoA est essentiel à la régulation positive de la croissance axonale des neurones d'hippocampe de rat (Ahnert-Hilger et coll. 2004). A l'inverse, chez la drosophile, l'activation de RhoA provoque une inhibition de la croissance axonale (Brouns, Matheson & Settleman 2001). Sans exclure des différences entre espèces on peut souligner l'apparente contradiction d'action de RhoA, reflétant certainement une adaptation de l'action de RhoA en fonction du contexte physiologique. Sur la croissance dendritique, le rôle de RhoA n'apparaît pas si versatile. Que ce soit chez les mammifères (Nakayama, Harms & Luo 2000; Ahnert-Hilger et coll. 2004; Pilpel & M. Segal 2004) ou non (Ruchhoeft et coll. 1999 chez *Xenopus* ; Lee et coll. 2000 chez la drosophile) RhoA possède une fonction dans la régulation négative de la croissance.

Rac1 peut provoquer un arrêt de la croissance axonale (Luo et coll. 1994) et même dans certains cas une rétraction axonale (Luo et coll. 1996) ainsi qu'une diminution de la complexité de l'arborisation axonale (Kim et coll. 2003). Par contre son effet est inversé au niveau des dendrites, puisque son activation induit une augmentation de longueur et de complexité de l'arborisation dendritique (Ng et coll. 2002).

Le mécanisme d'action des petites protéines G est fondé sur un passage rapide entre une forme inactive et une forme active. Ces protéines ont un site de liaison au GTP qu'elles vont pouvoir hydrolyser en GDP. La protéine est activée lorsqu'elle est liée au GTP et inactivée lorsqu'elle est liée au GDP. Les régulateurs de l'activité lytique sont les facteurs d'échange de la guanine (GEFs, activateur) et les protéines activatrices des GTPases (GAPs, inhibiteur) (Luo, 2002). Ces facteurs d'échanges ont un rôle crucial dans la régulation fonctionnelle de Rac1 comme de RhoA et peuvent expliquer ces différents mécanismes d'action. La kalirin, une protéine GEF, possède deux domaines de liaison à des GTPases Rho, l'un spécifique de RhoA et l'autre de Rac1 (Penzes et coll. 2001). L'activation de RhoA ou de Rac1 par la kalirin aura des effets opposés, respectivement inhibiteurs et facilitateurs de la croissance dendritique. Ainsi, une même molécule régulatrice des protéines GTPases Rho peut induire des effets contraires selon qu'elle active la voie RhoA ou Rac1. La fonction de régulation de la kalirin apparaît donc comme centrale dans ce mécanisme et dans le choix de la protéine RhoGTPase impliquée.

Leurs capacités de régulation du cytosquelette d'actine leur confèrent plusieurs rôles qui couvrent différents aspects du développement. Elles participent aux mécanismes de guidage du cône de croissance (Wahl et coll. 2000) et aux mécanismes d'exocytose vésiculaire nécessaires à la sécrétion des facteurs de croissance et à l'expansion de la membrane cytoplasmique (Ridley 2001). On constate donc que les GTPases sont des protéines centrales dans la coordination des mécanismes moléculaires sous-tendant le développement neuronal.

3. Les protéines d'échafaudage de la densité post-synaptique

Les protéines d'échafaudage présentent une fonction dans l'organisation moléculaire interne de la cellule. Leur capacité à former des liens moléculaires est due à la présence sur les protéines d'échafaudage de nombreux domaines de liaison protéine-protéine tels que PSD-95 discs large zona occludens-1 (PDZ), Src homology 3 (SH3), guanylate kinase-like, leucine-rich repeat (LRR) et sterile alpha motif domain (Kim & Sheng 2004). La formation de réseaux moléculaires par les protéines d'échafaudage permet notamment l'organisation des molécules de signalisation nécessaire à la formation de signalosomes. Parmi les molécules d'échafaudage, la famille des protéines de la densité post-synaptique (PSD) est

particulièrement importante dans la formation et l'organisation moléculaire de la synapse. Jusqu'à récemment on pensait le rôle de ces protéines entièrement dédié à la formation et au fonctionnement synaptique mais il a été montré que plusieurs de ses membres participent aussi à des étapes de développement plus précoce notamment dans la formation des prolongements neuronaux.

La protéine de la densité post-synaptique-95 (PSD-95), Homer et Shank présentent des fonctions de régulateurs négatifs du développement dendritique (Charych et coll. 2006; Quitsch et coll. 2005; Tanaka et coll. 2006). L'activité inhibitrice de PSD-95 passe par une interaction avec les protéines snapin. A l'inverse, l'interaction de ce complexe avec les molécules cypin induit une augmentation de la croissance dendritique. PSD-95, cypin et snapin forment donc un complexe moléculaire modulant la croissance dendritique (Charych et coll. 2006). La protéine Homer en modulant la concentration de calcium intracellulaire exercerait un effet positif sur le guidage axonal et négatif sur la croissance dendritique (Foa et coll. 2001; Tanaka et coll. 2006), ce qui tendrait à montrer que la fonction des protéines de la PSD peut être dépendante du compartiment cellulaire.

Shank exerce un effet positif sur la croissance dendritique via l'activation de la voie Rac et la réorganisation du cytosquelette d'actine (Proepper et coll. 2007). Shank n'exerce pas son effet seul mais grâce à son interaction avec d'autres molécules, avec la Densin-180 notamment. La Densin-180 est une autre protéine de la PSD, qui suite à sa liaison avec la δ -caténine induit une diminution de la croissance dendritique (Quitsch et coll. 2005). La Densin-180 interagit avec la δ -caténine pour moduler l'activité des GTPases Rho et inhiber la croissance dendritique (Martinez et coll. 2003). L'activation de Shank permet l'inhibition de la liaison entre la Densin-180 et la δ -caténine (Quitsch et coll. 2005) et l'augmentation de la croissance dendritique. Il s'établit donc entre ces protéines une communication moléculaire qui peut permettre la régulation fine de la croissance dendritique.

Ces études montrent l'importance nouvelle des protéines d'échafaudage de la PSD dans les mécanismes de croissance dendritique et axonale. L'intérêt particulier de ces résultats est de suggérer que les protéines d'échafaudage permettraient une coordination entre les mécanismes de croissance des prolongements, de la formation des synapses et de leur fonctionnement.

4. Conclusion sur le rôle des facteurs intrinsèques

Ce chapitre a permis de montrer qu'il existe une spécificité d'action de facteurs de régulation intrinsèques. Ces protéines présentent bien souvent une fonction différente dans l'axone et dans les dendrites et rarement une action sélective sur uniquement l'axone ou uniquement les dendrites. Cela nous a aussi permis de montrer que la fonction d'une molécule dans la croissance est en lien avec le rôle d'autres molécules mais aussi en lien avec d'autres fonctions du développement neuronal. Certaines molécules peuvent par exemple avoir un rôle dans la croissance des prolongements et la synaptogénèse. Au niveau de la régulation intrinsèque du développement il existe donc une coordination des différents mécanismes moléculaires permettant la mise en place d'un réseau fonctionnel.

1-5-2 Les facteurs extrinsèques

De nombreux facteurs extrinsèques agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques pour réguler la formation des axones et des dendrites. Cette action permet de moduler l'activation des nombreux facteurs intrinsèques présentés au chapitre précédent et de contrôler ainsi la croissance. Ce chapitre vise à présenter de façon non exhaustive les différentes familles de facteurs extrinsèques ainsi que leurs fonctions dans la formation des prolongements neuronaux.

Famille moléculaire	Compartiment cellulaire impliqué	Effet trophique	Cibles moléculaires connues
Neurotrophines	axone et dendrite	+	- Activation génique - Cytosquelette d'actine et microtubules
Molécules d'adhésion	axone et dendrite	+	Potentialise l'effet des neurotrophines
Molécules de guidage	axone et dendrite	+ (Slit)	N.D.
		+ (Semaphorines)	Potentialise l'effet du NGF
Activité	Dendrite	+	Calcium

Tableau 2 Exemple de facteurs extrinsèques influençant la croissance des prolongements

1. Neurotrophines

Parmi les facteurs impliqués dans la croissance, les neurotrophines sont de loin les plus étudiées et présentent un exemple intéressant de molécules sécrétées capables de réguler la morphologie des dendrites comme des axones. C'est dans les années 50 que Rita Lévi-Montalcini mit en évidence le premier de ces facteurs, le NGF, qui lui valu le prix Nobel en 1986. A la suite de cette découverte furent mises en évidence 3 autres neurotrophines : le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) et les neurotrophines 3 et 4/5 (NT-3 et NT-4/5). Ces facteurs

jouent un rôle dans les mécanismes de survie, de guidage et de croissance neuronale.

Les neurotrophines possèdent deux grands types de récepteur, les récepteurs tyrosine kinase (Trk) qui sont de forte affinité, et le récepteur aux neurotrophines p75 (p75NTR), qui est un récepteur de faible affinité et aussi dans certains cas un co-activateur pour les récepteurs Trk. La liaison aux récepteurs Trk induit l'activation notamment de la voie de signalisation Ras qui est impliquée en particulier dans la fonction trophique via l'activation de facteurs de transcription (figure 8, Reichardt 2006). La liaison des neurotrophines à p75NTR permet de moduler la croissance en induisant une polymérisation du cytosquelette d'actine via l'activation de RhoA.

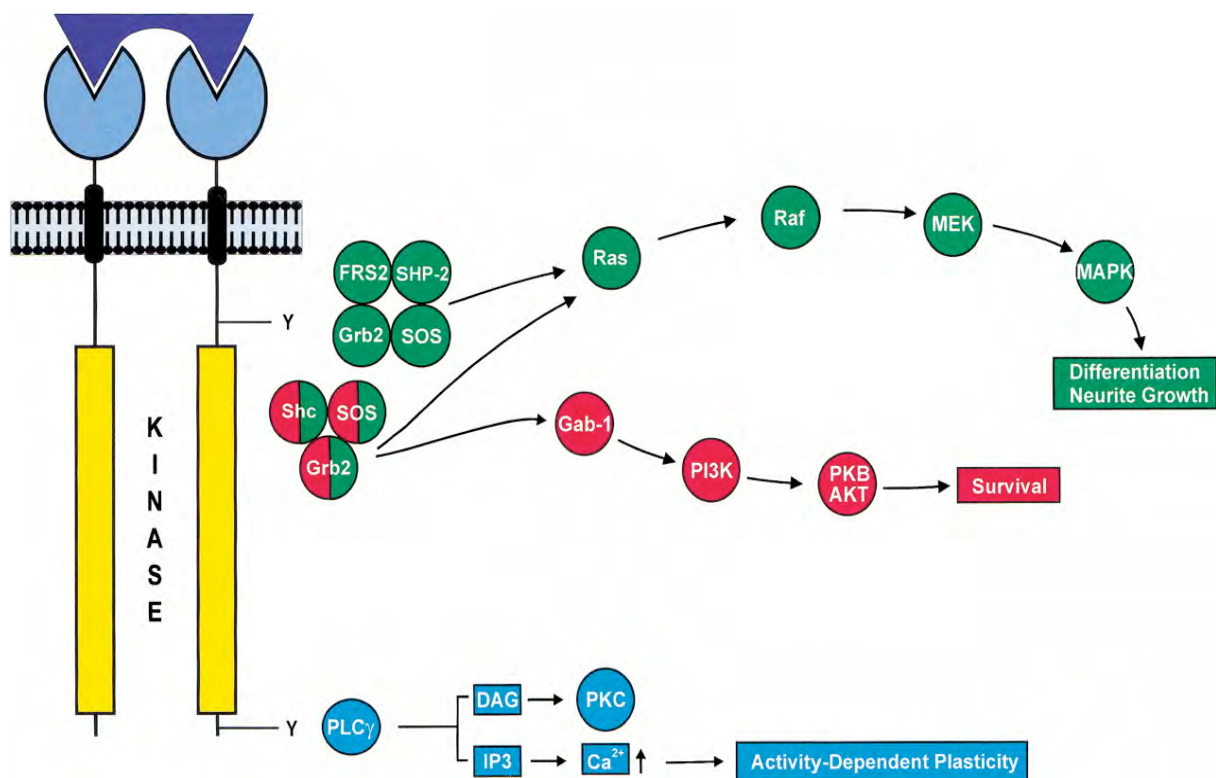


Figure 8 Voies de signalisation induites par la fixation des neurotrophines à leurs récepteurs

La fixation des neurotrophines à leurs récepteurs Trk induit l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt, Ras/MAPK et PLCγ. Ces voies permettent une activation des fonctions de survie, de différenciation et de modulation de la plasticité synaptique par une activation génique et/ou une interaction directe avec des protéines impliquées dans la croissance.

Dans les mécanismes de croissance, les neurotrophines n'exercent pas un rôle sur tous les neurones, leur fonction est dépendante en particulier du type cellulaire impliqué. Pour exemple, NT3 stimule la croissance dendritique des neurones de la couche 4 du cortex alors qu'elle n'a aucun effet sur ceux de la couche 5. 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 certains coactivateurs. Le NGF par exemple n'est pas capable d'induire à lui seul une augmentation de la croissance dendritique des neurones du système périphérique (Lein et coll. 1995). Son effet trophique n'est possible qu'en présence de co-récepteurs de la superfamille du TNF notamment, comme p75NTR (Davies, Lee & Jaenisch 1993; Mahadeo et coll. 1994) et glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related (GITR) (O'Keeffe et coll. 2008).

2. Les molécules d'adhésion

La famille des intégrines présente la particularité de pouvoir se lier à des molécules membranaires et aux éléments de la matrice extracellulaire comme la laminine, la fibronectine ou le collagène. La liaison des intégrines aux éléments de la matrice extracellulaire (ECM) présente une importance cruciale dans les mécanismes de croissance. Via leur fixation aux intégrines, les ECM ont une action coordonnée avec les neurotrophines permettant une régulation efficace de la croissance axonale (Goldberg et coll. 2002; Liu et coll. 2002). En effet, les intégrines activées par les ECM interagissent avec les voies phosphoinositide-3-kinase (PI3K) et Ras/extracellular signal-regulated kinase-1 (ERK) activées par les récepteurs aux neurotrophines. Cette interaction permet de moduler l'activation des microtubules et une activation génique (pour revue French-Constant & Colognato 2004). Par ces différentes voies de signalisation, la liaison des ECM aux intégrines a un effet positif sur la croissance axonale.

Les molécules d'adhésion cellulaire (MAC) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ces molécules sont des complexes protéiques transmembranaires capables d'interactions avec de multiples ligands extracellulaires. Par leur domaine intracellulaire, les MAC ont en particulier une capacité de liaison avec le cytosquelette d'actine. Les MAC peuvent s'associer aux intégrines et donc réguler les voies de signalisation qui leur sont associées.

L1-CAM par exemple en s'associant à la β -integrine 1 active la voie de signalisation PI3K (Schmid, Pruitt & Maness 2000; Schmid et coll. 2004).

Certains types de molécules d'adhésion sont impliqués dans les mécanismes d'adhésion intercellulaire, comme la Down syndrome-related cell adhesion molecule (Dscam) 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 génique il inhibe l'élongation des dendrites primaires (Sestan, Artavanis-Tsakonas & Rakic 1999) et à l'inverse augmente le niveau de ramification de ces mêmes dendrites (Redmond et coll. 2000; Breunig et coll. 2007). Ces résultats sont intéressants car ils montrent que les mécanismes de croissance dendritique et de développement de l'arborisation dendritique sont indépendants l'un de l'autre.

Les molécules d'adhésion Dscam présentent la caractéristique chez la drosophile d'avoir dix mille isoformes différentes générées par épissage alternatif. L'originalité du système Dscam repose sur une reconnaissance homophile de forte affinité, chacune des isoformes ayant la capacité de reconnaître spécifiquement sa jumelle sur une autre cellule (Zipursky, Wojtowicz & Hattori 2006). Les molécules Dscam participent chez la drosophile à la croissance des axones et au développement des embranchements axonaux (Wang et coll. 2002). Elles sont aussi nécessaires à l'arrêt de la croissance dendritique (Hughes et coll. 2007; Matthews et coll. 2007; Soba et coll. 2007). Chez les mammifères, le fait que Dscam ne présente pas autant d'isoformes et que les mutants présentent des phénotypes moins altérés que chez la drosophile laissent supposer l'intervention de mécanismes de régulation annexes.

3. Les molécules de guidage

Les molécules de guidage ont été originellement caractérisées pour leur action d'attraction ou de répulsion de l'axone. Cependant, il s'avère que pour bon nombre d'entre elles, leur action ne se limite pas à l'axone, mais qu'elles sont aussi impliquées dans le guidage et la croissance des dendrites. Parmi ces molécules, Slit en se liant à son récepteur Robo induit une répulsion de l'axone (Nguyen Ba-Charvet et coll. 1999) et régule le guidage dendritique (Furrer et coll. 2003). En parallèle de cet effet, la liaison Slit-Robo induit une augmentation de la croissance et du nombre d'embranchements des dendrites (Whitford et coll. 2002). Ces résultats sont intéressants car ils suggèrent l'existence d'une

coordination entre les mécanismes de guidage et de croissance qui se base sur l'activité de molécules communes.

Parmi les molécules de guidage, la sémaphorine 3A (sema3A) présente la particularité d'exercer deux fonctions opposées, la répulsion de l'axone et l'attraction des dendrites (Polleux et coll. 1998; Polleux, Morrow & Ghosh 2000). Cette fonction est originale car elle confère à sema3A un rôle dans l'organisation spatiale coordonnée du guidage axonal et dendritique. Ajouté à ces fonctions dans le guidage, sema3A joue un rôle dans la croissance neuronale en inhibant une partie de la voie de signalisation activée lors de la liaison NGF-TrkA (Ben-Zvi et coll. 2008). Des travaux montrent qu'il pourrait exister un découplage entre les voies de transductions intracellulaires médiant les fonctions de croissance et de guidage de sema3A (Togashi, Schmidt & Strittmatter 2006). Ces études montrent que sema3A peut agir à différents niveaux au cours du développement. Cette fonction de sema3A dans la croissance supporte aussi une idée tout à fait nouvelle d'une coordination entre les mécanismes moléculaires de croissance et de guidage axonale pouvant permettre de réguler finement le développement neuronal.

4. L'activité neuronale

En plus des facteurs trophiques et des molécules d'adhésion, l'activité neuronale joue un rôle crucial dans le développement axonal comme dendritique. L'activité neuronale sur des neurones des ganglions rachidiens et de l'hippocampe stimule l'expression du récepteur aux facteurs neurotrophiques TrkB en réponse à une augmentation de l'AMPc (Meyer-Franke et coll. 1998; Goldberg et coll. 2002). L'action du BDNF est alors augmentée ce qui induit une augmentation de la longueur de l'axone. L'importance de l'activité neuronale dans la formation des prolongements neuronaux a également été établie *in vivo*. Des manipulations génétiques sur le poisson-zèbre ont mis en évidence d'une coopération entre les cellules des ganglions rachidiens. En effet, quand l'activité d'une sous population de neurone est abolie, la croissance de ses axones est diminuée uniquement lorsque l'activité du neurone voisin est elle aussi abolie. Il a aussi été montré que lors d'une section de l'axone, une stimulation électrique peut accélérer sa régénération (Al-Majed et coll. 2000; Brushart et coll. 2005). En résumé, *in vitro* comme *in vivo* les résultats suggèrent fortement que l'activité neuronale est capable de moduler la croissance axonale durant le développement.

5. Conclusion sur le rôle des facteurs extrinsèques

Il apparaît donc que les différents facteurs extrinsèques présentent des fonctions spécifiques au cours de la croissance des prolongements. Les fonctions spécifiques d'une molécule s'établissent souvent en coopération avec la fonction d'autres molécules. Par exemple, le rôle central et connu depuis longtemps du NGF dans la croissance passe par une association fonctionnelle avec différents coactivateurs. La fonction des neurotrophines en général est partie intégrante d'un mécanisme de régulation complexe pouvant faire intervenir des molécules d'adhésion comme des molécules de guidage. Comme pour les facteurs intrinsèques il apparaît surtout une coordination entre les différents mécanismes de migration, croissance, guidage et connectivité synaptique menant à la formation d'un réseau neuronal fonctionnel au sein du cerveau.

1-6 L'établissement des contacts synaptiques

Les synapses permettent la communication entre neurones, communication qui est essentielle dans les différentes fonctions cérébrales. Des défauts de régulations lors de la synaptogénèse peuvent induire des troubles de l'apprentissage ou de la mémoire malgré l'existence d'un réseau neuronal fonctionnel.

A la croissance des prolongements succède donc une étape d'établissement des connexions synaptiques lors de laquelle les axones vont former des contacts avec des compartiments spécialisés des dendrites, localisés au niveau des épines dendritiques dans le cas des synapses excitatrices glutamatergiques. Au niveau de l'axone se forme des terminaisons nerveuses correspondant au compartiment pré-synaptique faisant synapse avec le compartiment post-synaptique. De nombreuses études ont été menées pour parvenir à identifier les molécules nécessaires à l'établissement précoce de la connectivité neuronale et la formation des compartiments pré et post synaptiques (pour revue Scheiffele 2003 et Waites, Craig & Garner 2005). Il est intéressant de signaler que parmi ces molécules, bon nombre d'entre elles participent aussi aux mécanismes de croissance tels le BDNF (Alsina, Vu & Cohen-Cory 2001) et les protéines de la PSD (pour revue Vessey & Karra 2007).

Ceci montre donc la nécessité d'une coordination entre les mécanismes de croissance et de synaptogénèse pour parvenir à l'établissement des compartiments pré et post synaptiques.

La définition de ces compartiments implique le recrutement de récepteurs et de molécules de signalisation spécifiques. Les molécules présentes de part et d'autre de la synapse en formation permettent l'établissement d'une communication interneuronale primaire. Le niveau de communication entre les neurones détermine d'abord si la connexion formée est pertinente ou non. L'activité neuronale est un exemple de signal de communication pouvant favoriser l'établissement des synapses. Si les signaux électriques de part et d'autre de la synapse sont coordonnés, alors la synapse sera renforcée, si au contraire ils ne le sont pas, la synapse sera éliminée. Les fonctions cérébrales complexes comme la mémoire ou l'apprentissage se basent sur le fonctionnement de synapses spécifiques ainsi sélectionnées (figure 9, Scheiffele 2003).

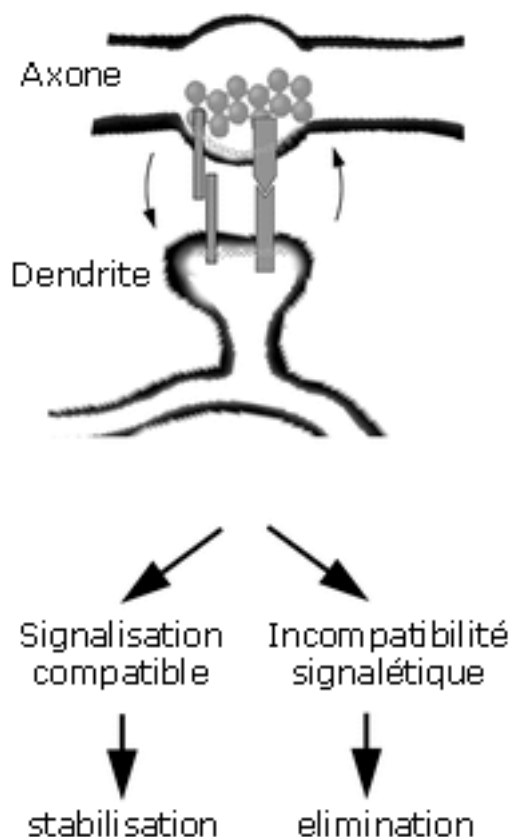


Figure 9 Modèle d'établissement de stabilisation et d'élimination des contacts synaptiques

Le contact qui s'établit au niveau des épines dendritiques induit la formation de part et d'autre de la synapse d'un compartiment pré-synaptique sur l'axone et post-synaptique sur le dendrite.

Une communication interneuronale s'établit. Si les signaux sont compatibles alors la synapse sera stabilisée, si les signaux sont incompatibles elle sera éliminée.

1-7 Une classe de molécules émergente dans le développement du système nerveux central : les molécules du système immunitaire

Outre les molécules que j'ai présentées dans le chapitre précédent et qui sont classiquement reconnues pour leur rôle dans le développement neuronal, un ensemble de molécules originellement caractérisées dans le SI se révèle présenter de nouvelles fonctions dans le système nerveux central. En 1948, Sir Peter Medawar, prix Nobel en 1960, observait que des coupes de peau de lapin, transplantées sur la peau d'un autre lapin, sont bien rejetées; pourtant ces mêmes tissus, transplantés à la surface du cerveau de l'animal receveur, sont tolérés (Medawar, 1948). Cette observation marquait l'origine du concept de privilège immunologique du SNC (Barker & Billingham 1977). De cette théorie découleront deux postulats importants. Le premier est que certains tissus dans l'organisme sont exclus de la surveillance immunologique. Le second établit un déficit en molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) dans le cerveau. Ces deux postulats, même s'ils restent en partie vrais, ont été révisés ces dernières années. En effet, plusieurs molécules classiquement considérées comme spécifiques du SI se sont révélées être également exprimées dans le système nerveux central normal, hors de tout contexte inflammatoire. L'expression de ces molécules n'est pas restreinte à un type cellulaire particulier et a été observée dans les neurones et les cellules gliales. Le fait que le cerveau soit un organe normalement exclu de la surveillance immunitaire posait la question de la signification fonctionnelle de l'expression de telles molécules immunes dans le cerveau. Les données de ces dernières années convergent pour indiquer que ces molécules peuvent jouer un rôle non immun et sont impliquées dans des étapes fondamentales du développement cérébral, telles que l'établissement des connexions neuronales et l'élimination synaptique. De façon intéressante, un certain nombre de ces molécules utilise dans le cerveau les mêmes mécanismes que ceux empruntés dans le SI pour servir des fonctions apparentées. En effet, la formation des contacts neuronaux et des synapses est basée sur des mécanismes de reconnaissance cellulaire ciblée permettant la

consolidation ou l'élimination du contact. Ces mécanismes sont également largement utilisés dans le SI comme par exemple lors d'une reconnaissance antigénique entre les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène. J'ai sélectionné quatre grands types de famille moléculaire pour lesquelles des avancées importantes ont été réalisées ces dernières années.

1-7-1 Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et les molécules associées

Le CMH I a la capacité de fixer des peptides issus de la protéolyse des protéines de la cellule et de les présenter à la surface cellulaire, rendant compte ainsi du profil moléculaire de chaque cellule. Ce complexe moléculaire permet la surveillance immunitaire par les lymphocytes T (LT) cytotoxiques. Le groupe de Wekerle fut le premier à mettre en évidence l'expression du CMH I dans les neurones (Neumann et coll. 1995; Neumann et coll. 1997). Ces études montrent que l'expression neuronale du CMH I est induite par la suppression de l'activité neuronale et par l'interféron γ (IFN γ), une cytokine mimant une situation inflammatoire. Depuis, sans doute grâce aux techniques de détection de plus en plus sensibles, l'ARNm et les protéines correspondantes du CMH I ont été détectés dans le cerveau de rongeurs et de primates, notamment au niveau des neurones, et dans des conditions normales. Ainsi, le CMH I a été observé dans diverses populations neuronales de la moelle épinière, du tronc cérébral (Lidman, Olsson & Piehl 1999; Lindå et coll. 1998; Lindå et coll. 1999), de la substance noire pars compacta (Huh et coll. 2000; Lindå et coll. 1999; Lidman, Olsson & F Piehl 1999; Rölleke et coll. 2006) et dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Corriveau, Huh & Shatz 1998) et du cortex (Corriveau, Huh & Shatz 1998; Huh et coll. 2000). La régulation de l'expression neuronale du CMH I par l'activité neuronale a été confirmée par plusieurs études, chez l'adulte comme au cours du développement, suggérant que le CMH I pourrait intervenir dans des mécanismes dépendants de l'activité neuronale tels que la plasticité des réseaux neuronaux (Corriveau, Huh & Shatz 1998; Håvik et coll. 2007).

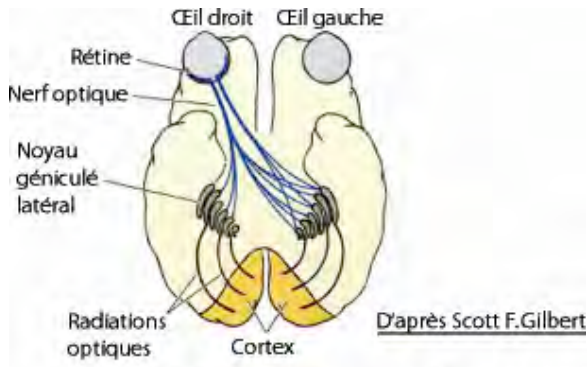


Figure 10 La voie réticulo-géniculée

Les neurones de la rétine émettent leurs projections au niveau des noyaux géniculés latéraux présents dans le thalamus.

C'est l'équipe de Carla Shatz qui proposa pour la première fois une fonction non immune du CMH I dans les neurones et qui démontra son importance dans le fonctionnement cérébral. Le CMH I possédant de multiples isoformes différentes et potentiellement redondantes, la production de souris déficientes dans l'expression du CMH I passe par l'inactivation des gènes codant pour la $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$) et la Phosphatase Tobacco Acid 1 (TAP1), deux molécules essentielles à l'expression membranaire du CMH I. Les souris double KO $\beta 2m^{-/-}$ TAP1 $^{-/-}$ peuvent donc être considérées comme des souris invalidées pour l'expression fonctionnelle du CMH I. L'étude chez ces souris des projections des neurones de la rétine sur les neurones du noyau géniculé latéral, leur cible principale (figure 10), montre un défaut de ségrégation des afférences et un établissement des connexions dans des régions ectopiques (Huh et coll. 2000). En plus de ces défauts développementaux, ces souris présentent des anomalies de plasticité synaptique dans les neurones de l'hippocampe. En effet, les enregistrements électrophysiologiques montrent que la potentialisation à long terme (LTP) est facilitée alors que la dépression à long terme (LTD) est inhibée (Huh et coll. 2000; Barco et coll. 2005). Les auteurs ont recherché si des molécules fonctionnellement reliées au CMH I dans le SI étaient également requises dans leur modèle. Dans le SI, un récepteur du CMH I est le récepteur des cellules T (TCR), qui fait parti d'un complexe protéique contenant notamment la molécule adaptatrice CD3 ζ . Les auteurs ont donc examiné les souris CD3 $\zeta^{-/-}$ et ont observé que ces souris présentent un phénotype similaires à cells invalidées pour le CMH I (cf chapitre 2-2 et Huh et coll. 2000). Il y aurait donc un lien fonctionnel entre le CMH I et CD3 ζ dans le cerveau (pour revue, Boulanger, Huh & Shatz 2001; Boulanger & Shatz 2004). Cependant ce lien fonctionnel ne requiert pas le TCR puisque l'analyse de souris TCR $\beta^{-/-}$ ne montre pas d'anomalie développementale et que l'analyse des transcrits du TCR β dans le

SNC, au cours du développement comme au stade adulte, montre la présence d'un ARNm immature et une absence d'expression protéique (Syken & Shatz 2003; Nishiyori et coll. 2004). PirB, un récepteur moins classique du CMH I, pourrait être l'un des récepteurs médiant certaines fonctions du CMH I neuronal, notamment celles liées à la stabilisation de certains réseaux neuronaux en fonction de l'activité (Syken & Shatz 2006). Cependant, il est important de noter que l'engagement du CMH I n'est pas conservé dans toutes les structures. Bien qu'il soit exprimé dans le cervelet, le CMH I ne joue pas de rôle dans la restriction des connexions synaptiques sur les cellules de Purkinje par les fibres grimpantes (Letellier et coll. 2008).

Outre son rôle dans l'établissement des réseaux neuronaux au cours du développement, le CMH I a également été décrit pour son rôle dans la formation des prolongements neuronaux, sans distinguer toutefois s'il s'agissait des dendrites ou des axones (Zohar et coll. 2008). L'application d'anticorps ciblant deux isotypes spécifiques du CMH I de souris induit une augmentation de la croissance neuritique des neurones corticaux de souris en culture sans affecter la survie neuronale (Zohar et coll. 2008). Les auteurs de cette étude montrent que l'application sur les mêmes neurones d'un anticorps dirigé contre Ly49, un récepteur du CMH I décrit sur les cellules NK, induit une diminution de la croissance neuritique, et augmente la survie neuronale suggérant l'hypothèse que l'un des récepteurs du CMH I neuronal, particulièrement impliqué dans la régulation de la croissance des neurites, pourrait être Ly49.

La distribution cellulaire du CMH I a été examinée sur des cultures de neurones d'hippocampe à des stades matures (Goddard, Butts & Shatz 2007). Le CMH I est enrichi au niveau des structures post-synaptiques excitatrices contenant la PSD-95. En corrélation avec cette localisation synaptique, les souris $\beta 2m^{-/-}$ TAP1 $^{-/-}$ (déficientes pour l'expression membranaire du CMH I) présentent une augmentation de la transmission synaptique excitatrice et du nombre de densités postsynaptiques perforées (Goddard, Butts & Shatz 2007). Le CMH I semble donc intervenir dans la morphologie et la régulation de la transmission excitatrice.

Le CMH I joue également un rôle dans les processus d'élimination synaptique intervenant après lésions axonales. Dans un modèle d'axotomie des nerfs périphériques, les souris $\beta 2m^{-/-}$ TAP1 $^{-/-}$ présentent une élimination synaptique plus importante au niveau de la moelle épinière que les souris WT

(Oliveira et coll. 2004; Thams, Oliveira & Cullheim 2008). De plus, cette élimination synaptique exacerbée est majoritairement observée pour les synapses de type inhibitrices. Outre son expression au niveau synaptique, le CMH I est aussi exprimé par les cellules microgliales (Streit, Graeber & Kreutzberg 1989a; Streit, Graeber & Kreutzberg 1989b). Il est donc concevable que ce phénomène d'élimination synaptique fasse intervenir le CMH I neuronal synaptique mais aussi le CMH I présent sur la microglie. Cullheim et coll. ont alors proposé un modèle d'élimination synaptique incluant ces différents paramètres (figure 11 et Cullheim & Thams 2007).

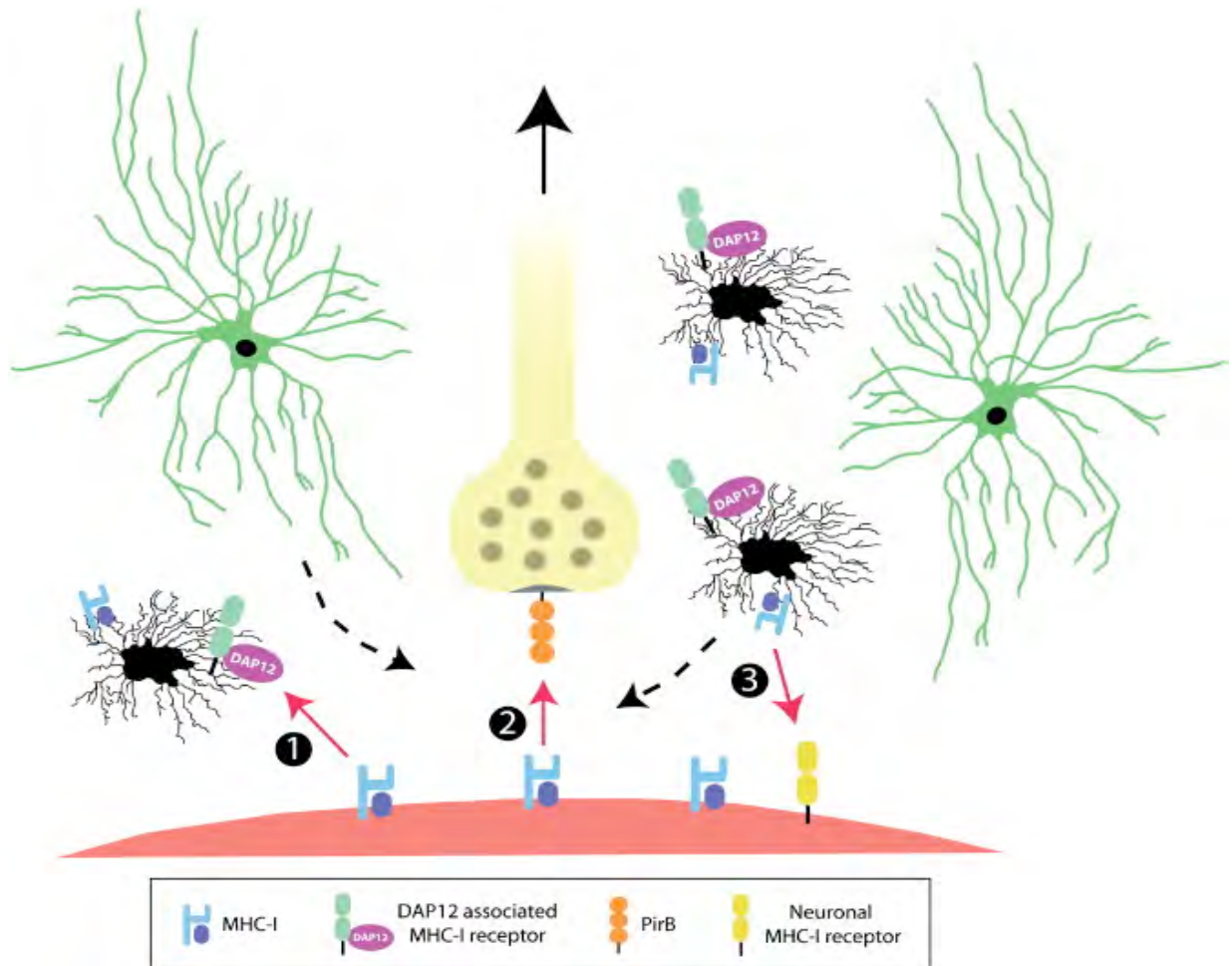


Figure 11 Modèle d'élimination synaptique reposant sur la fonction de DAP12 et du CMH I

Résumé des molécules impliquées dans l'élimination synaptique médiée par la microglie. DAP12 associé à un récepteur et le CMH I sont présents sur la microglie, le CMH I est quand à lui exprimé au niveau présynaptique. Le récepteur de DAP12 pourra se lier au CMH I synaptique (1), ou le CMH I microglial se fixer à un récepteur neuronal (2). A noter que le CMH I présynaptique peut se lier à PirB (3). La reconnaissance entre les récepteurs des microglies et des synapses peut aboutir à l'élimination synaptique.

Dans leur ensemble, ces données permettent de proposer un rôle du CMH I dans les mécanismes liés au développement et à la plasticité neuronale. La recherche des récepteurs, des protéines adaptatrices et des voies de signalisation recrutés permettra à terme de déterminer les mécanismes d'action du CMH I et dans quelle mesure les mécanismes cellulaires et moléculaires faisant intervenir le CMH I sont conservés entre le SI et le SNC.

1-7-2. Les molécules à domaines ITAM et ITIM

Les molécules à domaine immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), impliquées dans la médiation de signaux activateurs, et à domaines immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM), impliquées dans la médiation de signaux inhibiteurs, représentent des récepteurs et des molécules adaptatrices de premier ordre dans le SI. Les domaines ITAM et ITIM contiennent des motifs contenant des tyrosines pouvant être phosphorylées par des tyrosines kinases (voir détails pour les ITAMs au chapitre 2-1). Ces phosphorylations permettent le recrutement de protéines tyrosines kinases sur les domaines ITAMs et de protéines tyrosines phosphatases sur les domaines ITIMs. L'activation des tyrosines kinases constitue donc un signal d'activation des voies de signalisation intracellulaires et à l'inverse l'activation des phosphatases un signal d'inhibition de ces voies. Les molécules à domaine ITAM et ITIM ne sont encore que peu caractérisées dans le SNC. Fonctionnellement, les domaines ITAM/ITIM permettent le recrutement et l'amarrage de protéines signalétiques participant à la régulation de la réponse cellulaire.

Les sous-unités du complexe CD3 associées au TCR, le récepteur majeur du CMH I, sont toutes des molécules à motif ITAM. Le rôle de la sous-unité CD3 ζ dans le développement et la plasticité synaptique a été mentionné dans le paragraphe précédent et sera plus particulièrement présenté dans le chapitre 2-5. Une autre sous-unité de ce complexe, CD3 ϵ , a récemment été détectée dans les neurones et les astrocytes du cervelet et a été impliquée dans la formation des dendrites et la plasticité synaptique (Nakamura et coll. 2007). Par rapport aux souris témoins, les souris CD3 ϵ ^{-/-} présentent une diminution de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje et une diminution du nombre de terminaisons nerveuses des fibres parallèles faisant synapse sur les cellules

de Purkinje. Cet effet morphologique est corrélé avec une diminution de la probabilité de libération au niveau de ces terminaisons synaptiques. Dans cette même étude, les souris $Fc\gamma RIIB^{-/-}$, un récepteur du fragment Fc des immunoglobulines à domaine ITIM, ont été analysées et montrent des phénotypes similaires à ceux observés pour les souris $CD3\epsilon^{-/-}$. Ces résultats sont surprenants compte tenu des fonctions de signalisation opposées des domaines ITAM et ITIM décrites dans le système immunitaire.

DAP12 (DNAX activating protein 12) possède deux motifs ITAMs et est exprimé essentiellement par les macrophages et les cellules NK dans le SI et par la microglie dans le SNC. DAP12 est une protéine de signalisation associée à divers types de récepteurs selon le type cellulaire considéré. Dans la microglie, DAP12 est associé au récepteur TREM-2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells-2), appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Bouchon et coll. 2001). Des études ont montré que la signalisation médiée par l'association TREM2/DAP12 participe à la phagocytose des neurones apoptotiques *in vitro* (Takahashi, Rochford & Neumann 2005), mais également *in vivo* dans le processus de mort neuronale intervenant au cours du développement (Wakselman et coll. 2008). Le rôle de DAP12 dans le cerveau semble cependant plus complexe qu'il n'y paraît. En effet, les souris exprimant une forme mutée non fonctionnelle de DAP12 montrent des altérations de la transmission synaptique glutamatergique et une diminution sélective de l'expression de la sous unité GluR2 du récepteur glutamate AMPA et du récepteur au BDNF TrkB au niveau des densités postsynaptiques de l'hippocampe (Roumier et coll. 2004). Il semblerait donc exister un lien entre l'expression microgliale de DAP12 et une capacité de maintenance de certaines synapses (figure 11).

1-7-3. Les molécules du complément

Les molécules du complément font parties du système immunitaire inné. Lorsque l'une d'entre elles, C1q, se lie à des pathogènes ou à des cellules mortes, il s'ensuit une cascade d'évènements moléculaires, médiée notamment par C3, aboutissant à la lyse ou à la phagocytose des cellules ciblées par les cellules myéloïdes. Ainsi, une cellule ou un débris cellulaire étiqueté par C1q sera éliminé. L'équipe de Barnes a montré que ce mécanisme était utilisé dans le SNC

pour cibler l'élimination de certaines synapses au cours du développement (Stevens et coll. 2007). Leur modèle d'étude est la voie rétino-géniculée dans laquelle les axones des cellules ganglionnaires de la rétine projettent dans des aires spécifiques du noyau géniculé latéral. Les souris déficientes pour C1q ou C3 présentent une augmentation du nombre de synapses au niveau du noyau géniculé, suggérant l'existence d'une rétention anormalement élevée des connexions synaptiques dans ce système. Compte tenu que C1q est exprimé au niveau de certaines synapses et que le récepteur du complément est exprimé par la microglie, l'hypothèse proposée est une opsonisation des synapses étiquetées par C1q, qui seraient alors phagocytées par la microglie. Il apparaît donc que la machinerie moléculaire du complément est conservée entre SI et SNC, servant des fonctions propres à chaque système.

1-7-4. Les récepteurs toll-like

La famille des récepteurs toll-like (TLR ; 11 membres chez l'homme) est classiquement impliquée dans l'immunité innée immédiate et participe à la première défense d'un organisme lors d'une agression. Ces récepteurs reconnaissent un petit nombre de structures moléculaires propres aux micro-organismes et communes à de nombreux pathogènes. Ils sont impliqués soit dans l'internalisation des micro-organismes pour leur destruction, soit dans l'activation des cellules immunitaires. Les TLRs peuvent aussi être activés par des ligands endogènes physiologiques, libérés par la cellule endommagée. Plusieurs TLRs sont exprimés dans le SNC, par les neurones, la microglie et les astocytes, où ils contribuent à la protection immunologique du SNC (Kielian 2006). Cependant, des données récentes indiquent qu'ils ont également un rôle dans la formation et le développement des neurones. Il a été montré *in vitro* comme *in vivo* que le TLR2 facilite la neurogenèse dans l'hippocampe de souris adulte alors que le TLR4 l'inhibe (Rolls et coll. 2007). Un autre sous-type de TLR, TLR8, est abondamment exprimé dans le cerveau de souris aux stades embryonnaires E14-E18 et post-natal P1-P7. Il est exprimé par les neurones, le long des prolongements incluant les cônes de croissance, et son activation dans un modèle de culture neuronale induit une inhibition de l'élongation des neurites

(Ma et coll. 2006). Le TLR3 a également été détecté dans le cerveau et associé aux neurones. Son activation *in vitro*, comme *in vivo* induit une inhibition de la pousse axonale (Cameron et coll. 2007).

2 CD3 ζ : molécule adaptatrice dans les systèmes immunitaire et nerveux

Dans le système immunitaire, de nombreux récepteurs ne possèdent qu'une petite partie intracellulaire. Pour transduire les signaux d'activation, ils se lient à des molécules adaptatrices, l'association adaptateur/récepteur étant non covalente et spécifique. CD3 ζ , appelé aussi TCR ζ , est une molécule adaptatrice de signalisation. Ses fonctions ont en grande partie été décrites à travers son association avec le TCR dans les LT où elle joue un rôle central dans la réponse antigénique.

2-1 Structure de CD3 ζ

CD3 ζ a été identifié pour la première fois dans les LT en 1986 (Weissman, et al. 1986). Même si l'on sait depuis que CD3 ζ est exprimé par d'autres types cellulaires du système immunitaire, c'est dans ces lymphocytes qu'il a été le mieux caractérisé. Dans les LT, CD3 ζ fait parti du complexe CD3, complexe signalétique du TCR formé de 4 sous-unités : ζ , δ , ϵ et γ . Ces trois dernières présentent des homologies de séquences et leurs gènes correspondants sont tous présents sur le chromosome 11 chez l'humain (et 9 chez la souris). La sous

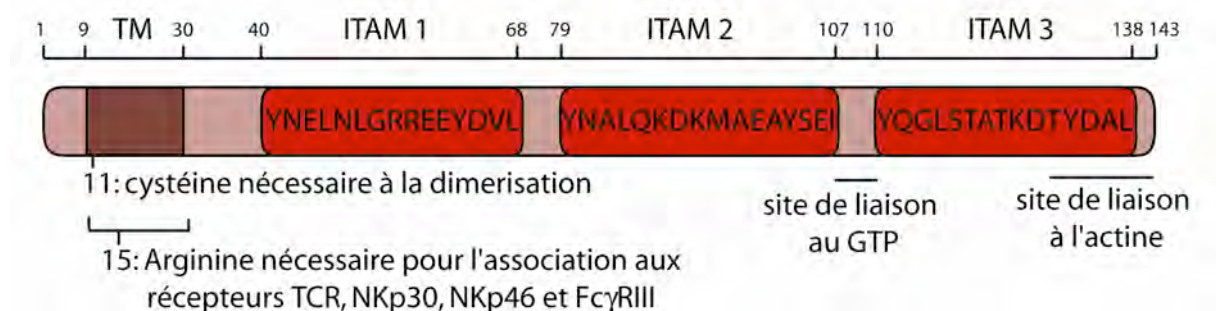


Figure 12 Structure de CD3 ζ

CD3 ζ présente dans sa partie transmembranaire (TM) un site de dimérisation et un site d'association à différents récepteurs. Dans sa partie intracellulaire, CD3 ζ porte trois sites ITAMs, un site de liaison au GTP et un site de liaison à l'actine.

unité CD3 ζ est quant à elle structurellement différente des 3 autres et le gène la codant est présent sur le chromosome 1. Malgré ces divergences, toutes les sous-unités présentent une homologie de fonction due à la présence de domaines ITAMs.

1. Les ITAMs, recrutement des protéines tyrosine kinase

Les domaines ITAMs possèdent des sites de phosphorylation sur tyrosine très conservés et caractérisés par une séquence consensus classique (D/E)YxxL/I-(x)₆₋₈-YxxL/I(L/I) (Y étant la tyrosine, I l'isoleucine, L la leucine, D l'aspartate, E le glutamate et x n'importe quel acide aminé) (figure 12). Alors que les sous-unités CD3 δ , ϵ et γ possèdent un seul domaine ITAM dans leur partie intracellulaire, CD3 ζ en possède trois. Les domaines ITAMs sont phosphorylés sur leurs tyrosines par des kinases de la famille Src, en particulier lck et fyn. La phosphorylation des tyrosines représente un signal moléculaire permettant le recrutement et la liaison des protéines tyrosine kinase à domaine SH2, spleen tyrosine kinase (Syk) et ζ chain-associated protein kinase of 70 kDa (ZAP70) (Iwashima et coll. 1994; Chan et al. 1994). De ce complexe ainsi formé naîtra une cascade d'évènements intracellulaires décrits dans le paragraphe 2-3.

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 ζ . Ainsi, ZAP70 recruté suite à la phosphorylation d'un résidu tyrosine de CD3 ζ va pouvoir induire par rétrocontrôle positif la phosphorylation des autres résidus tyrosine contenus dans les ITAMs, créant ainsi une amplification du système et le recrutement possible d'autres molécules ZAP70 (Steinberg et coll. 2004). Au contraire de ZAP70, Syk ne possède pas cette activité de rétrocontrôle positif et ne permet donc pas l'amplification de l'activité de la voie de signalisation médiée par CD3 ζ (Steinberg et coll. 2004).

2. Les autres molécules recrutées

Les domaines ITAMs sont de loin les domaines fonctionnels les mieux caractérisés. Cependant, CD3 ζ par ses fonctions adaptatrices possède des

capacités de liaison multiples, et donc des sites de fixation à différentes molécules (figure 12).

- La liaison à l'actine

CD3 ζ a la capacité de se lier directement à l'actine dans sa partie C-terminale (Caplan et coll. 1995; Rozdzial et al. 1995). Cette liaison est dépendante de la phosphorylation de la tyrosine en partie C-terminale contenue dans l'ITAM lui aussi situé en partie C-terminale (tableau 3, d'après Pitcher & van Oers 2003; Rozdzial, Malissen & Finkel 1995). Cette capacité de liaison directe à l'actine 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 lymphocyte et la cellule présentatrice d'antigène.

- La liaison au TCR

L'association avec le TCR se fait par la liaison entre un résidu arginine (chargé positivement) du TCR et un résidu acide aspartique (chargé négativement) de CD3 ζ (Call et coll. 2002). Ces résidus sont aussi nécessaires à l'homodimérisation de CD3 ζ .

- La liaison au GTP

Il a aussi été découvert un site de liaison de CD3 ζ au GTP (Franco et coll. 1994). La fonction spécifique de cette liaison reste encore inconnue mais elle pourrait participer à l'activation des protéines G induite par CD3 ζ (Stanners et coll. 1995; Zhou et coll. 1998).

Molécule associée	Fonction dans les lymphocytes T
ZAP70	Activation
Syk	Activation
p85	Activation
Fyn	Activation
TRIM	Expression du récepteur
Unc-119	Activation Src PTK
Shc	Activation
SLAP2	Régulation négative expression TCR
CTLA-4	Signal d'inhibition
Actin	Polymerisation de l'actine

Tableau 3 Molécules recrutées suite à la phosphorylation de CD3 ζ .

La phosphorylation de CD3 ζ permet le recrutement de molécules activatrices ou inhibitrices de la voie de signalisation. En plus de cette fonction, CD3 ζ se lie directement à l'actine et à des molécules adaptatrices (SLAP2 et TRIM).

Ces différents sites de liaison ont en commun d'avoir été relativement peu étudiés. Cependant ils présentent des voies d'activations potentielles,

indépendantes des ITAMs, et sont donc d'un intérêt potentiel non négligeable dans l'analyse fonctionnelle de CD3 ζ .

2-2 Les récepteurs couplés à CD3 ζ et les fonctions associées.

Selon le type cellulaire considéré, CD3 ζ est associé à différents récepteurs. Il est associé au TCR et au récepteur de chimiokine CXCR4 dans les LT et aux récepteurs Nkp46, Nkp30 et Fc γ RIII dans les cellules Natural Killer (NK) (figure 13; Lanier 2003; A. Moretta et coll. 2001). Même si la fonction attribuée à CD3 ζ dépend du type cellulaire qui l'exprime et du récepteur associé, le modèle d'activation de CD3 ζ semble être conservé quels que soit les systèmes.

1. Le TCR

CD3 ζ est une molécule centrale dans l'activité du TCR, celui-ci étant un récepteur essentiel à la reconnaissance antigénique médiée par les LT. Cette reconnaissance constitue la base de l'immunité dite acquise. On distingue deux grands types de LT: les LT CD8⁺ qui reconnaissent de manière spécifique un antigène porté par le CMH I, et les LT CD4⁺ qui reconnaissent un antigène porté par le CMH II. Alors que le CMH I est présent à la surface de toutes les cellules nucléées, le CMH II 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 CMH I le co-récepteur du TCR est le CD8, tandis que dans le cas du CMH II le co-récepteur est le CD4. L'antigène présenté est une véritable signature moléculaire de la cellule le présentant et correspond à un peptide de 8 à 11 acides aminés dans le cas du CMH I et de 11 à 20 acides aminés dans le cas du CMH II. 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.

Au niveau moléculaire, le TCR est composé de deux chaînes α et β qui s'associent pour former le récepteur. Associées, elles vont être exprimées à la membrane, expression essentielle à la fonction des LT. Cette expression est

dépendante de l'association avec CD3 ζ . La séquence d'assemblage du TCR avec le complexe CD3 se fait très tôt dans l'appareil de Golgi et comprend tout d'abord une dimérisation des deux chaînes α et β du TCR, suivie de l'association avec CD3 ζ puis de la formation du complexe définitif par l'association avec les autres sous-unités CD3 (Minami et coll. 1987; Dietrich et coll. 1999).

L'absence de CD3 ζ induit une dégradation massive des récepteurs, bien qu'une faible expression du TCR lié aux autres unités CD3 soit tout de même observée (Sussman et coll. 1988; Shores, Van Ewijk & Singer 1994). De plus, l'expression de CD3 ζ à la membrane est aussi nécessaire pour la stabilisation du complexe TCR. En effet, dans des modèles cellulaires n'exprimant pas CD3 ζ , il a été montré que la réexpression de CD3 ζ diminuait la vitesse d'internalisation du complexe TCR (D'Oro et coll. 2002). Il apparaît donc que l'expression de CD3 ζ est essentielle pour l'expression et la régulation du TCR à la surface des LT, elle-même essentielle à la reconnaissance antigénique par les LT.

2. Les récepteurs des cellules Natural Killer (NK)

Les cellules NK sont capables de reconnaître des cellules ne présentant pas de CMH I ou un CMH I ayant une structure altérée, lorsque la cellule est cancéreuse ou infectée par un virus par exemple. Chez l'humain cette fonction est dépendante de l'expression des immunorécepteurs NKp46, NKp30 et Fc γ RIII, et de leur association avec CD3 ζ (Lanier 2003). NKp30 comme NKp46 s'associent avec des homodimères CD3 ζ alors que Fc γ RIII présente la particularité unique de s'associer avec un hétérodimère formé de CD3 ζ et de Fc ϵ RI, une molécule adaptatrice portant un motif ITAM (cf chapitre 2-1). On ne connaît que très peu les ligands des récepteurs NKp, seul l'antigen-b-associated 3 (BAT3) a récemment été montré comme liant le récepteur NKp30 (Pogge von Strandmann et coll. 2007). Fc ϵ RI est un récepteur au fragment constant (Fc) des immunoglobulines (Ig). L'association moléculaire et fonctionnelle de CD3 ζ avec de nombreux immunorécepteurs rend sa fonction centrale dans les mécanismes de reconnaissance immunitaire.

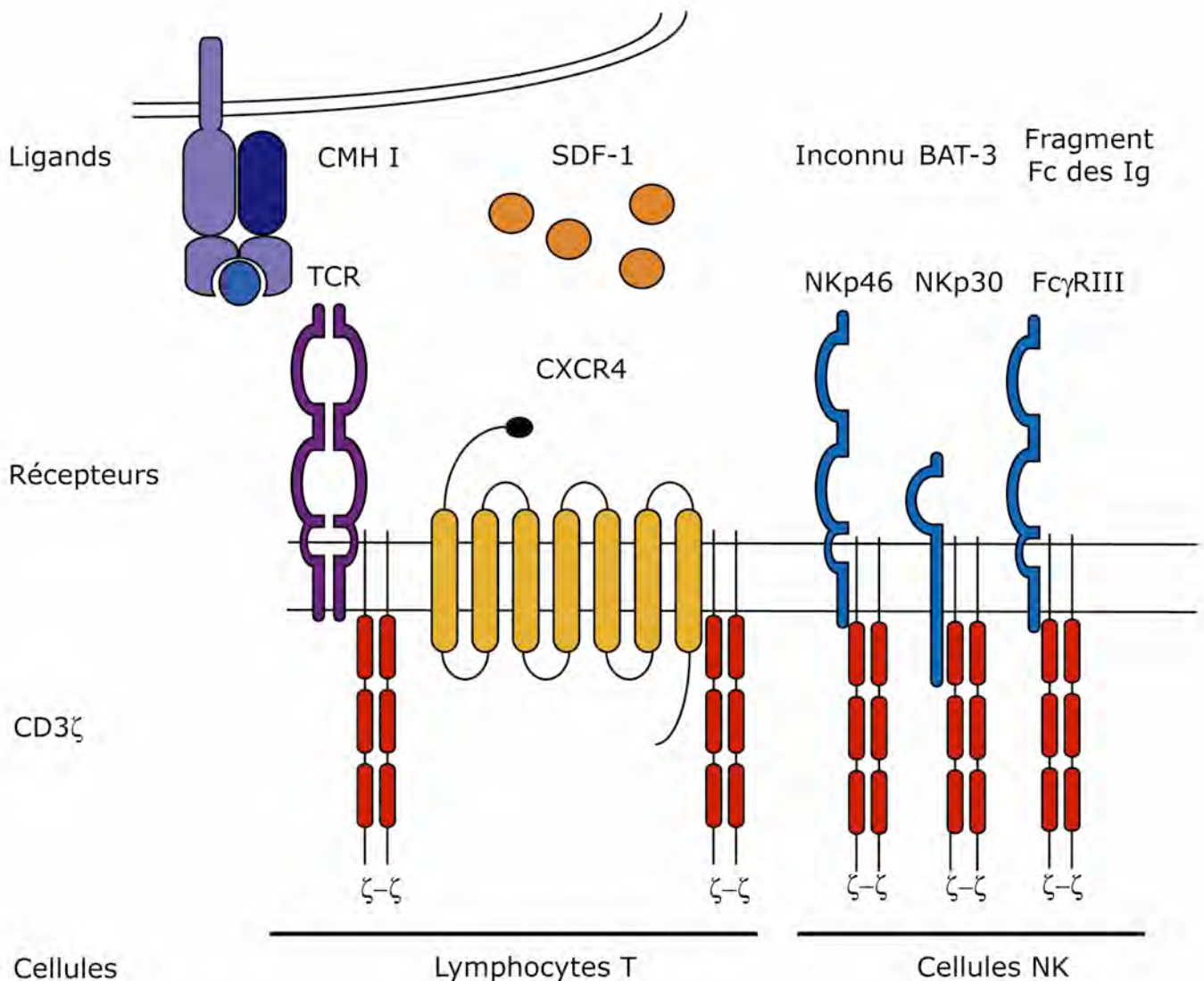


Figure 13 Les récepteurs associés à CD3 ζ dans le système immunitaire

Dans les lymphocytes T, CD3 ζ se lie au TCR et au récepteur CXCR4. CD3 ζ joue un rôle pivot dans la signalisation intracellulaire activée suite à la liaison du CMH I avec le TCR ou de SDF-1 avec CXCR4. Dans les cellules NK, CD3 ζ est associé aux récepteurs NKp46, NKp30 et Fc γ RIII.

3. CXCR4

Récemment, deux groupes indépendants ont montré l'importance de CD3 ζ dans le fonctionnement d'un récepteur de type récepteur couplé aux protéines G (RCPG), une famille de récepteurs qui jusqu'à présent n'était pas connue pour recourir à des molécules ITAMs. Il s'agit du récepteur de chimiokine CXCR4 qui possède un ligand unique, CXCL12 appelé aussi Stromal Derived Factor-1 (SDF-1). Dans les LT, la liaison récepteur/ligand est impliquée dans des fonctions d'adhésion, de chimiotactisme et de costimulation. Il est à noter que le couple CXCR4/SDF-1 est aussi largement exprimé dans le SNC où il joue notamment un rôle important dans le développement cérébral, point qui sera détaillé dans le chapitre 3-2.

Ces deux groupes ont montré que la fonction chimiotactique de SDF-1 sur les LT est dépendante de l'activation de CD3 ζ et de ZAP70 (Kremer et coll. 2003; Patrussi et coll. 2007). Ces études aboutissent à deux hypothèses différentes pour expliquer l'interaction fonctionnelle existant entre CD3 ζ et le récepteur CXCR4 suite à l'activation par son ligand SDF-1. Les études menées par le groupe de Hedin montrent que l'activation de CXCR4 par SDF-1 induit une interaction directe entre CXCR4 et CD3 ζ (Kumar et coll. 2006). Cette équipe a montré que dans ce contexte, ZAP70 est associé au CD3 ζ phosphorylé, constituant ainsi un complexe de signalisation opérationnel lié au TCR. Les auteurs postulent que l'activation du récepteur CXCR4 induit un recrutement de ce complexe de signalisation permettant un renforcement des voies de signalisation qui lui sont associées (figure 14a). L'équipe de Baldari a montré que la liaison de SDF-1 sur son récepteur CXCR4 provoque la phosphorylation de Ick puis de CD3 ζ et enfin de ZAP70 (Patrussi et coll. 2007). Les auteurs postulent donc que l'activation de CXCR4 induit une activation indirecte de CD3 ζ via la kinase Ick (figure 14b). 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 des LT.

Ces études ont apporté de nouvelles données importantes en montrant que des molécules à domaines ITAMs ne sont pas seulement impliquées dans la signalisation du TCR et d'immunorécepteurs mais peuvent également être recrutées par des RCPGs. Ces résultats pointent un mécanisme dans le système immunitaire qui jusqu'ici n'avait pas été décrit, et l'existence d'une fonction de

CD3 ζ en dehors d'une association avec un immunorécepteur. Ils permettent également d'élaborer de nouvelles hypothèses sur mon travail de thèse en proposant une communication moléculaire entre CD3 ζ et CXCR4 dans les neurones.

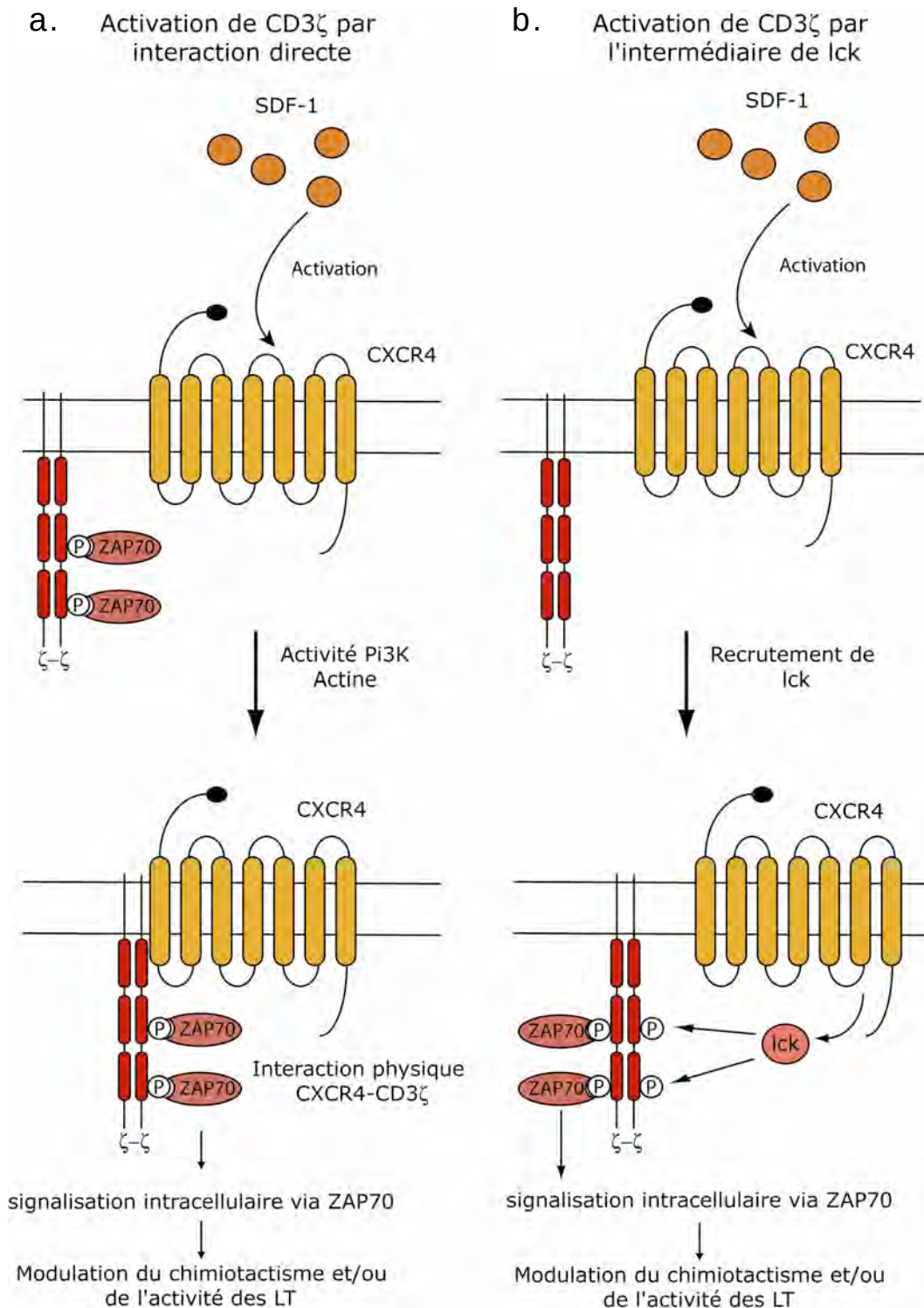


Figure 14 L'activation de CD3 ζ suite à la liaison de SDF-1 avec CXCR4

La fixation de SDF-1 sur son récepteur CXCR4 induit une activation de CD3 ζ puis de la voie de signalisation médiée par ZAP70. Cette activation pourrait se faire selon deux modes. a) CXCR4 activé pourrait recruter CD3 ζ par interaction directe. b) cette activation pourrait être dépendante de l'activation intermédiaire de lck, une kinase qui phosphoryle CD3 ζ et permet le recrutement de ZAP70. Dans les deux cas, l'activation de CD3 ζ aboutit à la modulation du chimiotactisme et de l'activité des LT.

2-3 Signalisation intracellulaire déclenchée par l'activation de CD3 ζ .

Le rôle de CD3 ζ est central dans les fonctions cellulaires car il est un relais indispensable entre les signaux extérieurs, reconnus par les récepteurs auxquels il se lie, et l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Les événements premiers nécessaires à l'activation de cette signalisation qui ont été décrits précédemment (paragraphe 2-1) permettent le recrutement des tyrosines kinases lck et fyn qui vont phosphoryler CD3 ζ sur ses ITAMs. Ceci induit alors le recrutement et la phosphorylation de protéines kinases de la famille ZAP70/Syk. Une fois activé, ZAP70/Syk va induire la phosphorylation de deux protéines distinctes, Linker for activation of T cells (LAT), une protéine adaptatrice, et la SRC homology 2 (SH2)-domain- containing leukocyte protein of 76kDa (SLP76). La phosphorylation de SLP76 va activer Vav et Nck puis différents effecteurs de la famille des GTPases Rho permettant la polarisation du cytosquelette d'actine (figure 15, Baniyash 2004). En parallèle, LAT permet le recrutement et l'activation de la Phospholipase C γ (PLC γ). La PLC γ activée va permettre une activation génique via la mobilisation des voies mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) ou NFAT. LAT peut aussi activer SLP76 et la voie de signalisation associée.

Il est intéressant de noter que parallèlement à cette fonction activatrice classique, CD3 ζ présente aussi une fonction inhibitrice médiée par les domaines ITAMs, qui dans ce cas induit le recrutement de phosphatases (Stefanová et coll. 2003). La fonction activatrice implique une liaison de forte affinité entre le ligand et son récepteur, comme par exemple lors de la reconnaissance entre le TCR et le CMH I portant un peptide du non soi. La fonction inhibitrice implique à l'inverse une liaison de faible affinité entre ligand et récepteur. Dans ce dernier cas, des phosphatases à domaine SHP-1 sont recrutées (Dittel et coll. 1999) et induisent une déphosphorylation de lck, qui devient alors inapte à phosphoryler CD3 ζ , stoppant ainsi la voie de signalisation (Stefanová et coll. 2003). La reconnaissance d'un ligand présentant une faible affinité pour le récepteur couplé à CD3 ζ induit donc un rétrocontrôle négatif bloquant la voie signalisation intracellulaire.

Les mécanismes moléculaires impliquant directement CD3 ζ sont ainsi réglables selon différents degrés. Ces modulations d'activité en fonction du ligand et de la kinase impliquée sont tout à fait intéressantes dans le cadre des mécanismes de reconnaissance intercellulaire, que ce soit dans le système immunitaire ou dans le système nerveux central, car elles aident à mieux comprendre le comportement d'une même cellule vis-à-vis de cibles cellulaires différentes et à l'inverse de différentes cellules vis-à-vis d'une même cible.

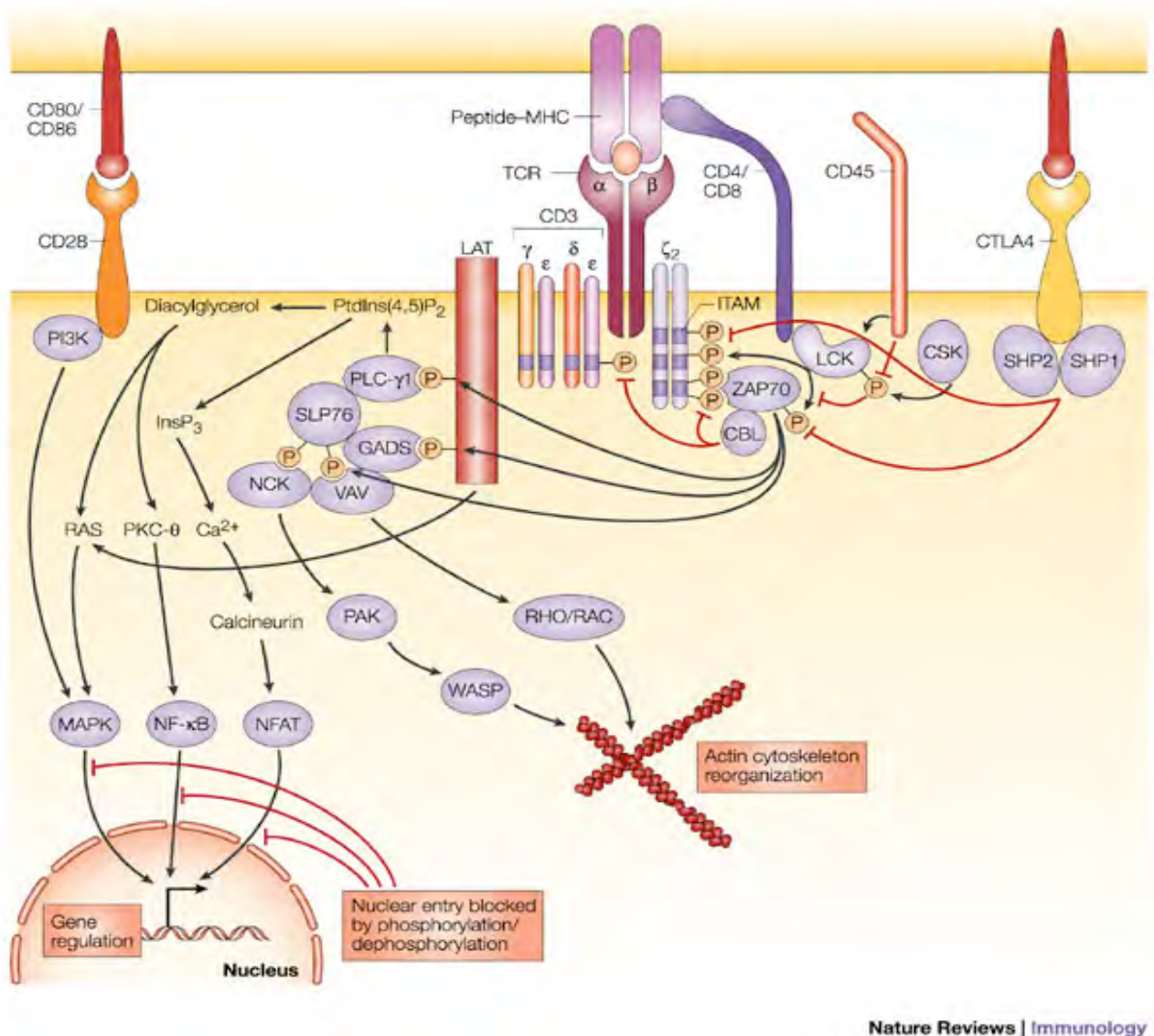


Figure 15 Les voies de signalisation induites par la phosphorylation de CD3 ζ suite à la fixation du CMH I au TCR

La liaison du CMH I au TCR induit une activation des kinases de la famille Src, Ick en particulier, qui phosphorylent CD3 ζ . Cette phosphorylation permet le recrutement et l'activation des kinases de la famille Syk/ZAP70 qui vont à leur tour activer différentes voies de signalisation. Ces voies de signalisation permettent la modulation de l'expression génique (MAPK, NF κ B et NFAT) ou la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine (Rho/Rac et WASP).

2-4 CD3 ζ dans le système nerveux central

Des études menées par le groupe de Carla Shatz ont montré que le CMH I participe au développement dans le système visuel et à la plasticité synaptique dans l'hippocampe (chapitre 1-7-1). Les auteurs ont recherché si des molécules fonctionnellement reliées au CMH I dans le SI étaient également requises dans ces effets. C'est ainsi que l'ARNm de CD3 ζ a été mis en évidence dans le thalamus, et notamment le NGL, et l'hippocampe (Corriveau, Huh & Shatz 1998). L'expression cérébrale de CD3 ζ au niveau protéique a également été montrée par Western blot au cours du développement postnatal (Sourial-Bassillious et coll. 2006). L'utilisation de souris CD3 ζ -/- a permis par la suite de préciser le rôle fonctionnel de CD3 ζ dans le SNC. Ces souris présentent des déficits immunitaires comme attendu (Love et coll. 1993), mais également un défaut de développement du système visuel. Dans les souris CD3 ζ -/-, les afférences rétiniennes du le noyau géniculé latéral établissent des connexions dans des zones ectopiques (figure 16, Huh et coll. 2000). Ce résultat montre qu'en absence de CD3 ζ la régulation de la ségrégation normale des afférences rétiniennes est altérée.

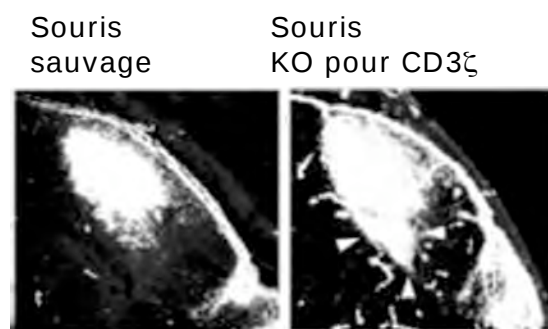


Figure 16 Défaut de développement chez les souris CD3 ζ KO

Les souris KO pour CD3 ζ présentent une augmentation de la zone de projection des afférences rétiniennes dans le NGL (Huh et al. 2000).

En plus de ces anomalies développementales, les auteurs montrent chez ces souris CD3 ζ -/- des anomalies de plasticité synaptique, et plus précisément une augmentation de la potentialisation à long terme (LTP) et une disparition de la dépression à long terme (LTD), résultats confirmés en 2005 par l'équipe de Kandel (Barco et coll. 2005). Il est possible que les effets centraux observés chez les animaux CD3 ζ -/- aient une origine périphérique. La production de souris CD3 ζ -/- conditionnelles dans

lesquelles l'expression de CD3 ζ serait sélectivement supprimée dans le SNC

permettrait de clarifier ce point. Néanmoins, ces résultats restent importants parce qu'ils présentent l'implication d'une nouvelle molécule dans des mécanismes cérébraux. Et ils sont aussi tout à fait originaux parce qu'ils présentent le rôle de CD3 ζ dans des mécanismes extérieurs au système immunitaire ouvrant la voie à un nouveau champ d'investigation.

3 La chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4

3-1 Les chimiokines et leurs récepteurs

Les chimiokines constituent le plus important groupe de molécules connues pour réguler les fonctions de chimiotactisme. Dans le système immunitaire elles régulent le trafic leucocytaire, dans le cadre de la surveillance immunitaire comme au cours de l'inflammation (Ransohoff & Tani 1998; Glabinski et coll. 1996; Rossi & Zlotnik 2000; Proudfoot 2002). Leur rôle ne se limite pas à cet aspect chimiotactique, elles participent aussi à la différenciation et à l'homéostasie des cellules immunitaires, à l'angiogénèse et à de nombreux processus développementaux. Une cinquantaine de chimiokines ont été identifiées, avec des homologies de séquences d'acides aminés allant de 20 à 90%. Ces protéines présentent aussi une homologie de structure impliquant la présence de quatre cystéines. Les chimiokines sont subdivisées en quatre classes selon l'écartement en acides aminés entre les deux premiers résidus cystéine de la portion N-terminale : CX3C, CXC, CC, C (figure 17).

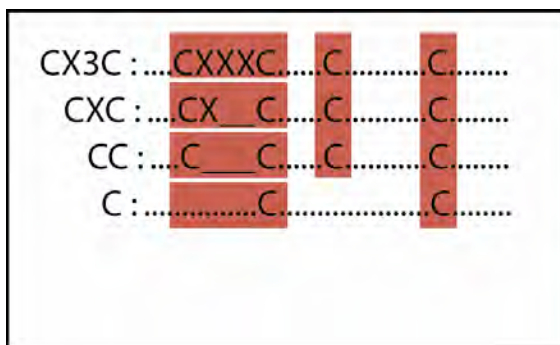


Figure 17 Classification structurale des différentes chimiokines

C : cystéine
 X : acide aminé autre que cystéine
 (d'après Bajetto et al. 2001)

Les chimiokines exercent leurs effets biologiques en interagissant avec des récepteurs qui appartiennent à la famille des RCPGs à sept domaines transmembranaire (Horuk 2001). Jusqu'à présent, une vingtaine de récepteurs de chimiokines ont été identifiées. La nomenclature des récepteurs suit celle des classes de chimiokines, les récepteurs étant désignés CX3CRn, CXCRn, CCRn et

XCRn respectivement à la liaison avec leurs ligands CX3C, CXC, CC et C. En règle générale, une chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs et inversement, entraînant une importante redondance fonctionnelle. Ces interactions permettent au niveau biologique un renforcement et une modulation des processus d'action, rendant par ailleurs leur étude plus compliquée. Il est également intéressant de noter que les récepteurs aux chimiokines des classes CXC et CC sont aussi capables d'homo ou d'hétérodimérisation (pour revue Springael, Urizar & Parmentier 2005).

3-2 La chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4 dans le SNC

3-2-1 La chimiokine SDF-1

La chimiokine SDF-1, aussi nommée CXCL12, est comme toutes les chimiokines une protéine fortement basique (Crump et coll. 1997). Huit acides aminés de l'extrémité N-terminale ainsi que les acides aminés 12-17 forment un site de liaison au récepteur CXCR4, les deux premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale (Lysine et Proline) étant indispensables pour l'activation du récepteur (Crump et coll. 1997). *In vitro*, SDF-1 est capable de se dimériser (Dealwis et coll. 1998) et de se lier *in vivo* aux héparanes sulfates de la bicouche lipidique membranaire. Cette interaction avec des constituants de la membrane plasmique a deux effets :

- 1) concentrer SDF-1 à certains endroits de la membrane plasmique, augmentant ainsi son activité (Amara et coll. 1999),
- 2) protéger SDF-1 de la dégradation et ainsi limiter son inactivation (Sadir et coll. 2004).

SDF-1 est inactivée par clivage enzymatique aux extrémités COOH ou NH₂-terminales (Delgado et coll. 2001; Valenzuela-Fernández et coll. 2002; Villalba et coll. 2003; De La Luz Sierra et coll. 2004). Chez l'homme, SDF-1 existe sous deux isoformes α et β (Shirozu et coll. 1995) produites par épissage alternatif. Ces deux isoformes se lient au même récepteur CXCR4 par leur

extrémité N-terminale (Crump et coll. 1997). Une troisième isoforme a aussi été clonée chez la souris : le SDF-1 γ (Gleichmann et coll. 2000). L'isoforme α est très conservée entre les différentes espèces: il y a 95% d'homologie de séquence entre le SDF-1 α de rat et ses homologues présents chez l'humain, le chat et la souris (Pillarisetti & S. K. Gupta 2001). SDF-1 est un ligand du récepteur CXCR4 mais également du récepteur CXCR7 dont les fonctions sont encore peu caractérisées.

3-2-2 Le récepteur CXCR4

Au contraire de la majorité des autres récepteurs de chimiokines, le récepteur CXCR4 possède un ligand unique, SDF-1 (Bleul et coll. 1996; Oberlin et coll. 1996). Le récepteur fut cloné pour la première fois en 1991 à partir de l'ADN complémentaire du Locus Coeruleus de cerveau de boeuf (Rimland et coll. 1991). CXCR4 est codé par un gène situé sur le chromosome 21 chez l'homme. La séquence primaire du gène codant pour CXCR4 est bien conservée au sein des espèces, présentant pour exemple 90% d'homologie entre l'homme et le rat. Par épissage alternatif, le gène CXCR4 peut produire un second transcrit, appelé CXCR4-Lo, retrouvé préférentiellement dans les poumons et la rate (Gupta & Pillarisetti 1999). Dans le système immunitaire, la signalisation intracellulaire médiée suite à la liaison de SDF-1 sur son récepteur est essentiellement dépendante des protéines G qui lui sont associées, G12/13 mais surtout Gi. L'activation des protéines G induit l'activation de la phospholipase C aboutissant à la libération de Ca²⁺ intracellulaire (Boutet et coll. 2001). CXCR4 peut aussi induire l'activation de la voie Akt aboutissant à l'activation du facteur de transcription NFkB (Bajetto et coll. 2001; Han et coll. 2001; Fernandis et coll. 2004; Lee et coll. 2004; Alvarez et coll. 2005; Kukreja et coll. 2005; Tullio Florio et coll. 2006) et des voies MAPK, ERK, JNK et p38 (Bajetto et coll. 2001; Han et coll. 2001; Fernandis et coll. 2004; Alvarez et coll. 2005) (figure 18, Li & Ransohoff 2008). L'activation des protéines G permet de lever l'inhibition de l'endocytose du récepteur, voie que nous détaillerons par la suite. Dans le système immunitaire la liaison SDF-1/CXCR4 participe à la régulation des fonctions cellulaires de prolifération, de migration et de survie. Dans le système

nerveux central CXCR4 joue un rôle analogue sur les cellules nerveuses mais aussi dans la croissance des prolongements neuronaux.

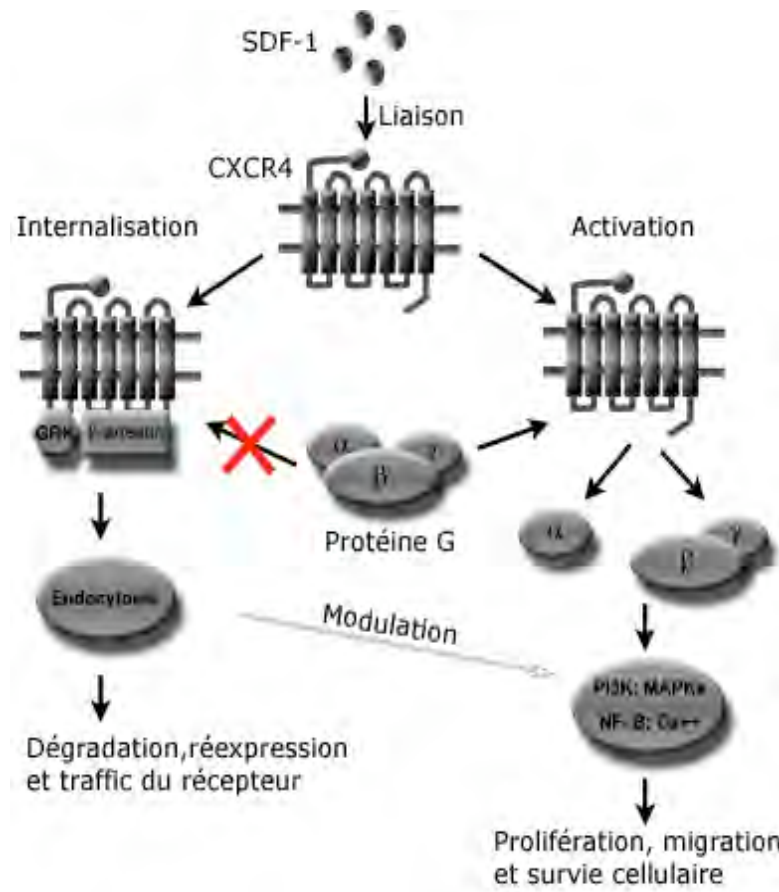


Figure 18 Les voies de signalisation SDF-1/CXCR4 et leur régulation

La liaison de SDF-1 avec CXCR4 active les voies de signalisation dépendante des protéines G (PI3K, MAPKs et NFκB) qui induit un relargage de Ca^{2+} intracellulaire. Ces voies de signalisation sont impliquées dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire. La liaison de SDF-1 avec son récepteur CXCR4 peut aussi induire un recrutement de GRK et de la β -arrestine, ce qui lève l'inhibition de l'endocytose induite par les protéines G. Ce recrutement permet aussi une internalisation du récepteur par la voie de la clathrine induisant un trafic du récepteur, le destinant à une dégradation ou à un recyclage.

3-2-3 Rôles physiologiques de SDF-1 et CXCR4 dans le cerveau

Au cours du développement embryonnaire, l'expression de l'ARNm de SDF-1 et CXCR4 est retrouvée dans l'ensemble des tissus fœtaux (Lu et coll. 2005). L'invalidation des gènes codant pour SDF-1 ou CXCR4 chez la souris est létale, en grande partie due à une malformation cardiaque (Lu et coll. 1998; Ma et coll. 1998; Zou et coll. 1998). L'analyse cérébrale des embryons montre de surcroît de nombreuses malformations du cervelet, conséquence d'anomalies de migration et/ou de prolifération cellulaire (Ma et coll. 1998; Zou et coll. 1998).

Dans le cerveau adulte, la chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4 sont exprimés de manière constitutive dans différents types cellulaires tels que les cellules endothéliales et gliales, et les neurones (Ohtani et coll. 1998; Bajetto et coll. 1999; Banisadr et coll. 2000; Lazarini et coll. 2000; Tham et coll. 2001; Banisadr et coll. 2002; Stumm et coll. 2003). Chez l'adulte, SDF-1 joue un rôle de neuromodulateur dans la transmission dopaminergiques de la voie nigro-striée (Skrzydelski et coll. 2007). Dans la régulation du système endocrinien par le système nerveux, il participe au contrôle de la balance hydrique et de la prise alimentaire (Callewaere et coll. 2007)

La fonction de SDF-1 et de son récepteur CXCR4 dans le fonctionnement cérébral apparaît donc être centrale, au cours du développement comme au stade adulte. Nous détaillerons ci-après son rôle dans les mécanismes liés au développement du cerveau.

1. Implication dans la prolifération cellulaire

CXCR4 est exprimé très précocement au cours du développement, sur les cellules souches neurales de souris (Kucia et coll. 2004) mais aussi sur les cellules progénitrices neuronales de rat (Lazarini et coll. 2000). Chez l'adulte, CXCR4 est exprimé dans les zones de neurogenèses que sont la zone sous ventriculaire et la zone sous granulaire du gyrus denté (Tran et coll. 2007). SDF-1 stimule la prolifération des cellules souches neurales adultes (Tran et coll. 2004; Dziembowska et coll. 2005 et Tran, Ren & Miller 2005). Chez l'humain, SDF-1 induit la quiescence et la survie des progéniteurs neuronaux (Kratzwohl & Kaiser 2004). Il exerce aussi un rôle dans la prolifération des cellules différenciées, notamment des astrocytes (Lazarini et coll. 2000; Bajetto et coll. 2001; Han et coll. 2001) et des oligodendrocytes (Kadi et coll. 2006).

2. Fonctions de régulation de la migration

Le couple SDF-1/CXCR4 est un élément clé de la migration cellulaire dans le système immunitaire comme dans le système nerveux central. La liaison de la chimiokine avec son récepteur régule la migration des astrocytes (Tanabe et coll. 1997; Odemis et coll. 2005), des oligodendrocytes (Maysami et coll. 2006), et des cellules progénitrices neuronales (Imitola et coll. 2004; Peng et coll. 2004). Chez l'embryon, SDF-1 et CXCR4 sont indispensables pour l'attraction des neurones menant à la formation du cervelet, du gyrus denté, du cortex, des

ganglions de la racine dorsale et des noyaux du tronc cérébral (Ma et coll. 1998, Zou et coll. 1998, Bagri et coll. 2002, M. Lu, Grove & Miller 2002, Stumm et coll. 2003, Belmadani et coll. 2005, Odemis et coll. 2005, Vilz et coll. 2005, Borrell & Marín 2006). Dans le cerveau, SDF-1 agit globalement comme un signal d'attraction. Il est sécrété aux stades embryonnaires dans les leptoméniges (Klein et coll. 2001, Tham et coll. 2001, Reiss et coll. 2002, Zhu et coll. 2002) et dans les zones sous ventriculaire et intermédiaire (Daniel et coll. 2005). Cette sécrétion est indispensable à la migration et à l'organisation spatiale des cellules de Cajal-Retzius (Borrell & Marín 2006; López-Bendito et coll. 2008) et des interneurons GABAergiques dans le cortex (Stumm et coll. 2003; Li et coll. 2008). Chez l'adulte, SDF-1 et CXCR4 ont un rôle direct dans le recrutement de cellules granulaires nouvellement formées dans l'hippocampe (Kolodziej et coll. 2008) comme dans le recrutement de nouveaux neurones sur le site lésionnel après ischémie (Imitola et coll. 2004; Thored et coll. 2006) tendant à montrer que chez l'embryon comme chez l'adulte la chimiokine SDF-1 est essentielle au déroulement correct des processus migratoires.

3 Rôle dans la formation des prolongements neuronaux

A des stades plus tardifs de la différenciation neuronale il a été montré que le couple SDF-1/CXCR4 joue un rôle dans la formation des axones en régulant le guidage, l'élongation et le degré de ramification. Sur un modèle *in vitro* de neurones de moelle épinière, SDF-1/CXCR4 exerce une action attractive sur le cône de croissance lors du guidage axonal en inhibant l'action répulsive des sémaphorines 3A, 3C et de Slit-2 (Chalasani et coll. 2003). De la même manière SDF-1 exerce un rôle attractif sur le guidage des axones des cellules granulaires du cervelet (Xiang et coll. 2002).

Sur les cellules granulaires du cervelet, SDF-1 a également une action sur la formation de prolongements neuronaux et régule de façon différentielle l'élongation axonale en fonction de la concentration : SDF-1 stimule la croissance axonale à faible concentration et au contraire l'inhibe à plus forte concentration (Arakawa et coll. 2003). Sur des neurones d'hippocampe et de cortex en culture, l'application de SDF-1 induit une augmentation de l'élongation axonale mais une diminution du nombre de ramifications axonales (Pujol, Kitabgi & Boudin 2005; Ohshima et coll. 2008). Ces effets sont dépendants de CXCR4 et spécifiques au compartiment axonal (Pujol, Kitabgi & Boudin 2005). Aucune donnée à ce jour ne

fait mention d'un rôle de SDF-1 sur le développement dendritique alors que son récepteur CXCR4 est pourtant exprimé dans le domaine somato-dendritique des neurones de plusieurs régions cérébrales.

En résumé, les fonctions de SDF-1/CXCR4 sont multiples, régulant différents aspects complémentaires du développement, de la prolifération à la croissance des prolongements neuronaux. Cette action n'est cependant pas homogène puisque selon la concentration employée, SDF-1 peut avoir un effet activateur ou inhibiteur sur le guidage axonal. Des actions différentes de SDF-1 sont également observées selon le compartiment neuronal considéré puisqu'un effet de SDF-1 est observé sur la croissance axonale sans modification de la croissance dendritique alors que le récepteur CXCR4 est présent dans ces deux domaines neuronaux. Ces différents rôles ne peuvent se comprendre sans analyser les mécanismes moléculaires régulant les fonctions de SDF-1 et de son récepteur.

3-3 La régulation de l'expression par les voies d'endocytose.

Parmi les mécanismes régulant la fonction de CXCR4, l'endocytose est l'un des plus étudiés. La liaison de SDF-1 sur son récepteur CXCR4 induit une signalisation intracellulaire mais provoque également l'endocytose du récepteur. La régulation de cette internalisation constitue un des systèmes de contrôle de l'activité du couple récepteur/ligand. Ce mécanisme a été bien documenté dans le système immunitaire, et suit les grands principes énoncés pour l'internalisation des récepteurs de la famille RCPG (figure 19, Neel et coll. 2005).

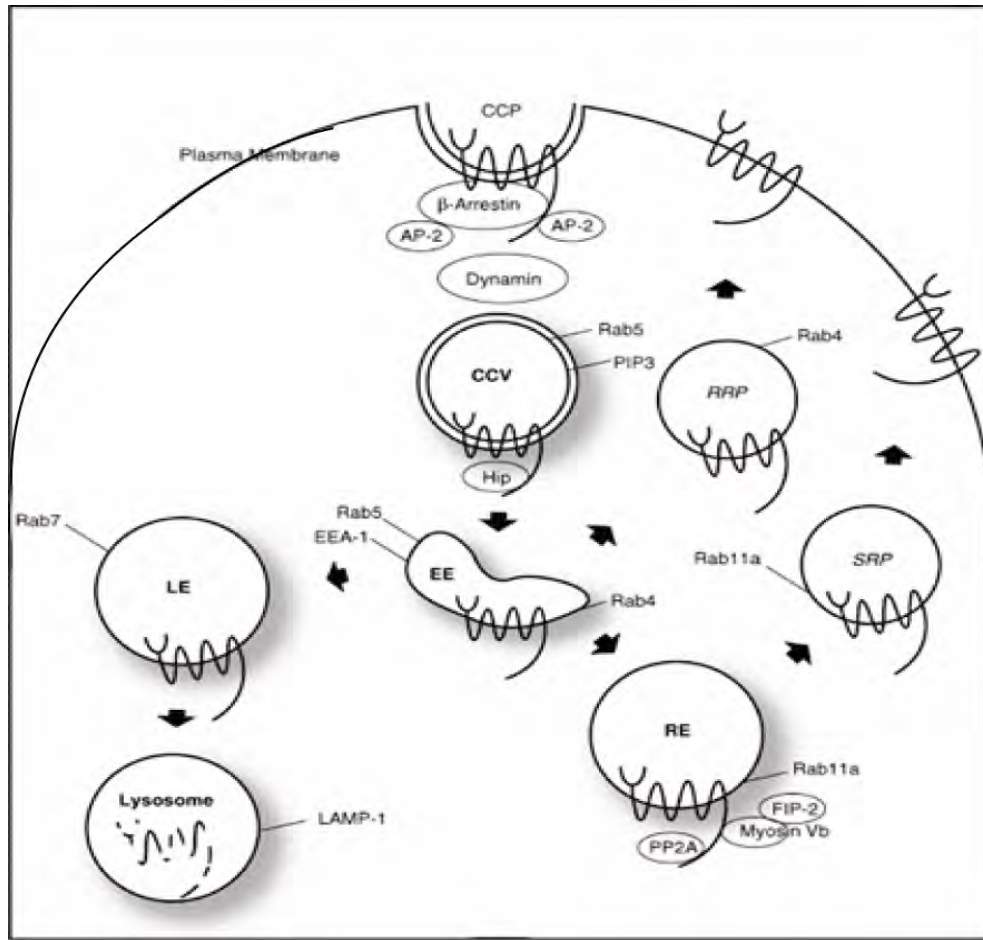


Figure 19 Schéma synthétisant les différentes étapes de l'endocytose des RCPGs

CCP: cavité couverte de clathrine, CCV: vésicule couverte de clathrine, EE: endosome précoce, LE: endosome tardif, RE: endosome de recyclage, RRP: voie de recyclage rapide, SRP: voie de recyclage lente. Protéines exprimées par les vésicules et endosomes : EEA-1: early endosomal antigen-1, FIP-2: Rab11-family interacting protein-2, LAMP-1: lysosomal-associated membrane protein-1.

Selon le schéma classique de l'internalisation des RCPGs médiée par l'activité, la liaison du ligand avec son récepteur induit le recrutement des kinases couplées aux RCPGs (GRK). Celles-ci vont phosphoryler le récepteur permettant alors le recrutement de la β -arrestine. La β -arrestine est une protéine du cytosol qui se lie aux RCPGs et qui permet le recrutement de la protéine adaptatrice AP-2 et de la clathrine. La formation de ce complexe moléculaire conduit à une invagination membranaire qui aboutira à la formation d'une vésicule contenant récepteur et ligand. La séparation de la membrane et de la vésicule est rendue possible par l'action de la dynamine. Dans le compartiment

endosomal, les vésicules ainsi formées fusionnent avec les endosomes précoces et peuvent suivre deux voies. Le récepteur contenu dans les endosomes peut être déphosphorylé, redirigé vers la membrane et être donc réexprimé à la surface cellulaire. S'il n'est pas recyclé, les vésicules fusionnent avec des endosomes tardifs (ou lysosomes) pour être dégradé. Dans le système immunitaire, CXCR4 est capable de se lier à la β -arrestine (Cheng et coll. 2000) comme à AP-2 (Heilker et coll. 1996), pouvant donc subir l'internalisation décrite selon le schéma précédent suite à sa liaison avec SDF-1. L'ensemble du complexe moléculaire reste cependant peu décrit, tout comme le devenir des vésicules contenant CXCR4. Fonctionnellement, ce processus d'internalisation permet une désensibilisation de la cellule à une stimulation par le ligand. A l'inverse, le maintien de l'expression du récepteur laisse la cellule cible sensible. L'absence d'internalisation de CXCR4 induit une augmentation d'activité des protéines G ainsi que le maintien d'une concentration calcique élevée (Haribabu et coll. 1997). Ces observations laissent donc supposer que ce mécanisme agit pour CXCR4, comme pour les autres RCPGs, comme un régulateur de la sensibilité de la cellule au stimulus extérieur.

Dans le SNC, plusieurs études récentes montrent que l'internalisation des récepteurs est un mécanisme important dans la régulation du développement neuronal. En effet, l'internalisation des récepteurs Robo et UNCC5H1 permet d'ajuster la sensibilité axonale à leur ligand Slit et Netrine-1 et ainsi de contrôler la répulsion axonale médiée par ces molécules de guidage (Keleman et coll. 2002; Williams et coll. 2003; Zimmer et coll. 2003). De la même manière, le degré d'internalisation des récepteurs Eph induit par la liaison des Ephrines est un mécanisme permettant de convertir un signal d'attraction cellulaire en un signal de répulsion (Cowan et coll. 2005). Concernant CXCR4, une étude a mis en évidence l'internalisation de ce récepteur dans les neurones des ganglions rachidiens dorsaux suite à une stimulation par SDF-1 (Bodner et coll. 2003). La possibilité d'un lien entre l'internalisation de CXCR4 induite par SDF-1 et le rôle de SDF-1/CXCR4 dans le développement neuronal reste à explorer.

Objectifs de l'étude

Le développement des neurones est comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit un ensemble de mécanismes moléculaires et cellulaires complexe qui permet la formation d'un réseau neuronal fonctionnel participant aux fonctions cérébrales. Parmi les molécules impliquées, une nouvelle classe de molécules émerge correspondant à des molécules originellement caractérisées dans le SI et que l'on pensait exclues du SNC. Des études récentes montrent que plusieurs d'entre elles sont en fait exprimées par les cellules neurales du SNC où elles jouent en particulier un rôle dans le développement neuronal. L'objectif général de la thèse est de définir les caractéristiques moléculaires, cellulaires et fonctionnelles de certaines de ces molécules.

Une des molécules que nous avons ciblée est la molécule adaptatrice signalétique CD3 ζ . Cette molécule est associée à différents récepteurs dans le SI et est en particulier impliquée dans la réponse antigénique médiée par les LT. Les souris CD3 ζ ^{-/-} présentent, en plus des dysfonctionnements attendus du système immunitaire, des anomalies dans le développement du cerveau et de la plasticité synaptique (Huh et al, 2000). Ces résultats suggéraient un rôle fonctionnel de CD3 ζ dans le développement et la transmission synaptique, dans un contexte normal non pathologique. Cependant, l'expression cérébrale de la protéine CD3 ζ tant à l'échelle régionale que cellulaire était encore inconnue. Nous avons donc tout d'abord cherché à caractériser la distribution de CD3 ζ dans le cerveau de rat. Nos analyses par immunohistochimie ont mis en évidence une expression majoritairement neuronale de CD3 ζ . Pour essayer de mieux comprendre la signification fonctionnelle de l'expression neuronale de CD3 ζ , nous avons dans un premier temps étudié à l'échelle cellulaire sa distribution au cours du développement des neurones dans un modèle de neurones d'hippocampe de rat, dont les différents stades de développement ont été bien décrits (Craig & Banker 1994; Dotti, Sullivan & Banker 1988). Compte tenu des anomalies développementales observées chez les souris CD3 ζ ^{-/-}, nous avons examiné sur ce même modèle de culture neuronale les conséquences de la surexpression, de l'activation et de l'inhibition de CD3 ζ sur le développement neuronal.

La chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4 hormis leurs rôles centraux dans le SI ont un rôle émergeant dans la coordination du développement

neuronal de part leurs fonctions dans la migration, le guidage et la formation des prolongements neuronaux. Une étude antérieure de notre groupe avait montré que SDF-1 régule spécifiquement la formation de l'axone en inhibant son élongation et en favorisant la formation de ses embranchements, mais n'avait aucun effet sur les autres neurites (Pujol et al. 2005). Ces données montrent donc l'existence d'une action différentielle de SDF-1 entre ces deux compartiments neuronaux. Un mécanisme permettant de réguler l'action de SDF-1, et qui a été largement caractérisé dans le SI repose sur l'internalisation de son récepteur CXCR4 suite à son activation. Nous avons donc posé l'hypothèse que la fonction différentielle de SDF-1 au cours de la formation des prolongements neuronaux repose sur une endocytose différentielle de son récepteur. Sur un modèle de culture de neurones de rat exprimant la protéine CXCR4 fusionnée avec la GFP nous avons analysé les modifications de la distribution cellulaire de CXCR4-GFP suite au traitement des neurones par SDF-1. Ces résultats nous ont permis d'établir un modèle d'action de SDF-1 en fonction de la régulation de la distribution de son récepteur CXCR4 par internalisation.

RESULTATS

Article n°1: La protéine adaptatrice de signalisation CD3 ζ est un régulateur négatif du développement des dendrites dans les neurones immatures

Stéphane J. Baudouin, Julie Angibaud, Gildas Loussouarn, Virginie Bonnamain, Akihiro Matsuura, Miyuki Kinebuchi, Philippe Naveilhan, et Hélène Boudin (2008)

The Signaling Adaptor Protein CD3 ζ Is a Negative Regulator of Dendrite Development in Young Neurons, Molecular Biology of the Cell, 19(6), 2444-56.

Résumé de l'étude:

Au cours de ce travail nous avons mis en évidence l'expression de CD3 ζ dans les neurones en développement au niveau des cônes de croissance et des filopodes *in vitro*. Par une étude fonctionnelle nous avons caractérisé la fonction de CD3 ζ dans la régulation négative du développement dendritique.

Des expériences de biochimie et d'immunohistochimie nous ont permis de mettre en évidence l'expression de CD3 ζ dans le cerveau. L'utilisation de marqueurs de cellules neurales nous a ensuite permis de montrer que l'expression de CD3 ζ est majoritairement associée à des neurones. Pour étudier la distribution cellulaire de CD3 ζ par immunofluorescence au cours du développement neuronal, nous avons utilisé un modèle de culture de neurones d'hippocampe et de cortex à faible densité cellulaire (Kaech et Banker 2006). Du premier au troisième jour de culture, CD3 ζ est exprimé dans les cônes de croissance des neurites et des axones. A partir du quatrième jour, correspondant au stade de maturation dendritique, l'expression de CD3 ζ est alors restreinte au domaine somatodendritique. Au sein de ces dendrites, CD3 ζ est exprimé au niveau des cônes de croissance et des filopodes et est colocalisé avec l'actine. L'inhibition de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine induit une dispersion de l'actine parallèlement à celle de CD3 ζ , celui-ci restant cependant colocalisé avec l'actine. L'utilisation de piceatannol, un inhibiteur des kinases Syk/ZAP70, induit de façon rapide une disparition de CD3 ζ . Ces résultats mettent en évidence une expression nouvelle de CD3 ζ dans les cônes de croissance et les

filopodes dendritiques dépendante de la polymérisation de l'actine et de l'activation des protéines kinase de la famille Syk/ZAP70.

Nous avons examiné l'existence d'un lien entre la localisation sélective de CD3 ζ au niveau des zones de croissance du neurone et une fonction dans le développement dendritique. Pour analyser cette fonction nous avons mis au point des approches *in vitro* de perte et de gain de fonction de CD3 ζ que nous avons utilisées pour traiter des neurones durant la période correspondant au début de croissance des dendrites (entre 3 et 5 jours en culture). Des expériences d'extinction de l'expression de CD3 ζ par siRNA ont mis en évidence une augmentation de la complexité de l'arborisation dendritique. A l'inverse, l'activation du CD3 ζ endogène par utilisation d'un anticorps reconnaissant la partie extracellulaire de CD3 ζ provoque une diminution du développement dendritique. Par mutation dirigée nous avons produit un plasmide codant pour un dominant négatif de CD3 ζ portant des ITAMs non fonctionnels. La surexpression de ce dominant négatif dans les neurones induit l'augmentation de la complexité de l'arborisation dendritique.

Ces données montrent une fonction de CD3 ζ dans la régulation négative du développement dendritique, fonction dépendante de la phosphorylation des ITAMs.

The Signaling Adaptor Protein CD3 ζ Is a Negative Regulator of Dendrite Development in Young Neurons

Stéphane J. Baudouin,^{*†‡} Julie Angibaud,^{*†‡} Gildas Loussouarn,^{‡§||}
Virginie Bonnamain,^{*†‡} Akihiro Matsuura,^{||} Miyuki Kinebuchi,^{||}
Philippe Naveilhan,^{*†‡} and Hélène Boudin^{*†‡}

INSERM, ^{*}U643 and [§]U915, Nantes, F44000 France; [†]CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes, F44000 France; [‡]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France; ^{||}Centre National de la Recherche Scientifique, ERL3147, F-44000, France; and ^{||}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 ζ , 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 ζ is mainly expressed in neurons. Distribution of CD3 ζ in developing cultured hippocampal neurons, as determined by immunofluorescence, indicates that CD3 ζ is preferentially associated with the somatodendritic compartment as soon as the dendrites initiate their differentiation. At this stage, CD3 ζ was selectively concentrated at dendritic filopodia and growth cones, actin-rich structures involved in neurite growth and patterning. siRNA-mediated knockdown of CD3 ζ in cultured neurons or overexpression of a loss-of-function CD3 ζ mutant lacking the tyrosine phosphorylation sites in the immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) increased dendritic arborization. Conversely, activation of endogenous CD3 ζ by a CD3 ζ antibody reduced the size of the dendritic arbor. Altogether, our findings reveal a novel role for CD3 ζ 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 ζ , 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 ζ 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 ζ is instrumental in these processes because it is required for receptor-mediated signal transduction through its three copies of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM; Pitcher and van Oers, 2003). Moreover, CD3 ζ also participates in intrathymic T-cell differentiation, which is arrested in mice lacking CD3 ζ (Malissen *et al.*, 1993). Brain analysis of these CD3 ζ -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 ζ 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: Hélène Boudin (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 ζ proteins and the identity of CD3 ζ -expressing cells have yet to be elucidated. In this study, we show that CD3 ζ is predominantly expressed in neurons where it selectively localized at dendritic growth cones and filopodia. CD3 ζ loss-of-function experiments in cultured neurons increased dendritic arborization, whereas activating endogenous CD3 ζ inhibited dendritic branching. Altogether, our findings reveal a novel role for CD3 ζ 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 ζ affinity-purified rabbit polyclonal antibodies were used for CD3 ζ immunodetection. 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 β -tubulin isotype III antibody (Tuj1, clone SDL3D10) and the mouse monoclonal anti-gial 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 BiotAtlantic (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°C until use. After Turbo DNase treatment (Invitrogen), 2 μg of RNA were reverse-transcribed with a MMLV-reverse transcriptase system (Invitrogen). The synthesized cDNA was denatured for 2 min at 92°C , and 100 ng was subjected to 35 cycles of PCR amplification (92°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 1 min, and a final extension step at 72°C for 5 min) in a total volume of 25 μl containing 0.4 μM of sense and antisense primers, 0.5 U of Taq polymerase (Invitrogen), and 200 μM of dNTP. For the amplification of CD3 ζ mRNA, the sense oligonucleotide primer was 5'-TC-GAGGAATTCACCATGAAGTGGACGGCATCAGTC-3' and the anti-sense oligonucleotide primer was 5'-TGACGACCGGTGCGGAGGGGGC-AGGGTCTG-3', giving rise to a 152-base pair fragment. Internal standards were generated by amplifying the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT) mRNA using the following set of primers: sense, 5'-TTCTCTCTCAGACCGCTTTT-3' and antisense, 3'-CTTATAGCCCCCTCTCAGCA-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°C in a solution of 15% sucrose in PBS and then 48 h at 4°C in 30% sucrose in PBS. Coronal sections (30 μm thick) were cut on a cryostat and collected in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4.

Cell Cultures

COS-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°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 3×10^4 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 35×10^3 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 18×10^3 cells/ cm^2 . For all other uses, cells were plated at 4×10^3 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 ζ -transfected COS-7 cells, 7 DIV cultured neurons, T lymphocytes, and rat forebrain and spleen were prepared. Briefly, cultured neurons and COS-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 μg 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 ζ 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_2O_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°C with Ab36 (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or Ab22 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) CD3 ζ 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°C with Ab36 CD3 ζ 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 ζ -expressing cells in the brain. For each animal, the number of CD3 ζ -positive cells was recorded in the neocortex from two slices (300 CD3 ζ -positive cells per slice), and the number of CD3 ζ -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 ζ antibody (2.5 μ g/ml) or CD90 antibody (3 μ g/ml) diluted in PBS containing 3% BSA. For double labeling, Ab36 CD3 ζ antibody was mixed with either MAP2 (1:200), tau-1 (1:500), or TuJ1 (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 ζ fused at the C terminus with enhanced green fluorescent protein (EGFP) was produced. The coding sequence of CD3 ζ 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 ζ -GFP expression plasmid.

To generate a mutant form of CD3 ζ with the six tyrosine residues substituted by phenylalanine in the three ITAMs, 100 ng of the following three primers bearing the mutations—5'-AACCAGCTCTTTAACCAGCTCAAT-CTAGGCGGAAGAGAGGAATTTGATGTTTG-3', (5'-AAGGCGTGTTCA-ATGCACTGCAGAAAGCAAGATGGCAGAGGCCTTCAGTGAGATT-3', and (5'-ACGGCCCTTTTCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCT-TTACGCCCTG-3'—were mixed with 100 ng of CD3 ζ -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 ζ 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'-GCAAAUUCAGCAGGAGUGt-3' and 5'-CACUCCUGCUGAAUUUGCt-3', siRNA1, nucleotides 276–294; 5'-GCUCUUAACGAGCUCAAUtt-3' and 5'-AUUGAGCUGGUUAUAGAGCtg-3'; siRNA2, nucleotides 329–347; 5'-GGUACAUGUAAUAG-GUCtt-3' and 5'-GACCUAUUACAUGUUACtt-3', siRNA3, nucleotides 1066–1084; and 5'-GGCGUGUACAUGACUGCtt and 5'-GCAGUG-CAUUGUACAGCctt; 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 ζ -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 ζ protein expression, COS-7 cells were cotransfected with 3 μ 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 ζ protein expression by Western blot.

Neuron transfection was performed at 3 DIV with 3 μ g of either CD3 ζ -GFP cDNA or 3 μ g of CD3 ζ -6Y6F-GFP or 3 μ g of membrane-targeted GFP (mGFP) cDNA [GAP-GFP(S65T), a gift from Dr. K. Moriyoshi, Kyoto University, Japan; Moriyoshi *et al.*, 1996], using 3 μ 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 μ g of mGFP cDNA and 50 nM of siRNA1 or siRNA3 using 3 μ 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 ζ double immunolabeling.

For antibody treatments, either 5 μ g/ml Ab22 CD3 ζ antibody or 5 μ 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 ζ distribution, neurons were treated at 7 DIV for 5, 15, 30, 60, and 120 min with 10 μ 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 lck, a protein tyrosine kinase of the Src family, 1 μ 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 ζ localization, neurons were treated for 30 min and 3 and 24 h with 1 μ M cytochalasin D (Sigma) added to the culture medium from a concentrated DMSO stock.

Quantification of CD3 ζ Expression and Neuronal Morphology Analysis

To quantify CD3 ζ or GAPDH expression in CD3 ζ -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 ζ 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 ζ immunofluorescence was measured with the Image J software in well-isolated GFP-positive neurons cotransfected with either control or CD3 ζ siRNAs and in nontransfected neurons located nearby the transfected cells. The intensity of CD3 ζ immunoreactivity was measured in the dendritic field, but excluding the cell body, because CD3 ζ 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 ζ 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 ζ -GFP, or CD3 ζ -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 μ m likely corresponded to filopodia and dendritic spines, whereas protrusions with a length >10 μ m were defined as dendritic branches (Jaworski *et al.*, 2005; Terry-Lorenzo *et al.*, 2005). Consequently, only the protrusions with a length >10 μ 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 ζ 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 coverslips) 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 ζ antibody on intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) in 7 DIV cultured neurons were assessed using the calcium-sensitive fluorescent probe Fluo-3 AM (Molecular Probes). Neurons were loaded with 4 μ M Fluo-3 AM in Tyrode (145 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 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 Ca²⁺-free Tyrode. A microperfusion system allowed for local application and rapid change of the different experimental media. Microperfusion solutions were identical to the Ca²⁺-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

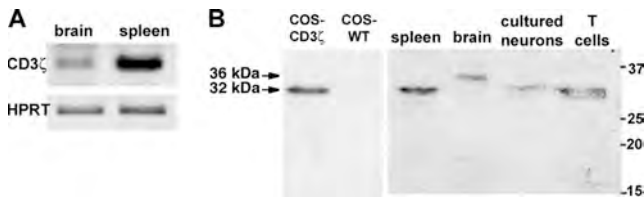


Figure 1. Expression of CD3 ζ in the rat brain and in cultured neurons. (A) Expression of CD3 ζ mRNA in the rat brain. PCR amplification of CD3 ζ mRNA extracted from adult rat brain and spleen (positive control). HPRT amplification products indicated that PCR was performed on comparable levels of RNA. (B) Identification of heterologously expressed and endogenous CD3 ζ by Western blot. Cell homogenates of nontransfected (COS-WT) and CD3 ζ -transfected (COS-CD3 ζ) 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 ζ antibody. An immunoreactive band can be observed at 32 kDa in CD3 ζ -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 ζ in the Rat Brain and in Cultured Neurons

To examine whether CD3 ζ mRNA was expressed in the brain, RT-PCR amplifications of CD3 ζ 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 ζ at the protein level was investigated by Western blot experiments under nonreducing conditions to preserve the disulfide bridge of the homodimer forms of CD3 ζ known to be prevalent in immune cells (Baniyash, 2004). Western blots of COS-7 cells transfected with rat CD3 ζ cDNA showed that the Ab36 CD3 ζ 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 ζ reported in hippocampus preparations (Sourial-Bassillious *et al.*, 2006). The characterization of the molecular forms of CD3 ζ expressed in heterologous COS-7 cell systems, splenocytes, and peripheral T-cells have been well established, which showed that the nonphosphorylated CD3 ζ 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 ζ detected in CD3 ζ -transfected COS-7 cells, spleen, T-cells, and cultured neurons likely corresponds to a nonphosphorylated CD3 ζ homodimer, the 36-kDa band detected in the brain might reflect the existence of a constitutively phosphorylated form of CD3 ζ in cerebral tissue.

We next examined the expression pattern of CD3 ζ protein in rat brain slices by immunohistochemistry with the anti-CD3 ζ antibodies Ab36 and Ab22. Using both antibodies, CD3 ζ immunoreactivity was widely distributed in numerous brain areas, including the cerebral cortex and hippocampus (Figure 2, A–F). Importantly, the distribution of CD3 ζ 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 ζ 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 ζ -expressing cells in brain slices was further analyzed in the neocortex by counting the number of CD3 ζ -positive cells that were also immunoreactive for NeuN (neuron), RIP (oligodendrocyte), or GFAP (astrocyte), or CD11b/c (microglia). The quantification indicated that 91 ± 2 and $4 \pm 1\%$ of the total CD3 ζ -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 ζ . 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 ζ in the brain and in cultured neurons.

CD3 ζ Is Selectively Enriched at Growth Cones and Filopodia during Neuronal Development

All of the following immunostaining experiments were performed with Ab36 CD3 ζ antibody. To determine at which stage of neuronal development CD3 ζ 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 ζ antibody and a tubulin β 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 ζ . Conversely, all of the CD3 ζ -immunopositive cells were additionally immunopositive for Tuj1, indicating that CD3 ζ was specifically expressed in newly differentiated neurons. Within these cells, CD3 ζ 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 ζ 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 ζ 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 ζ immunoreactivity at their tips (74 neurites

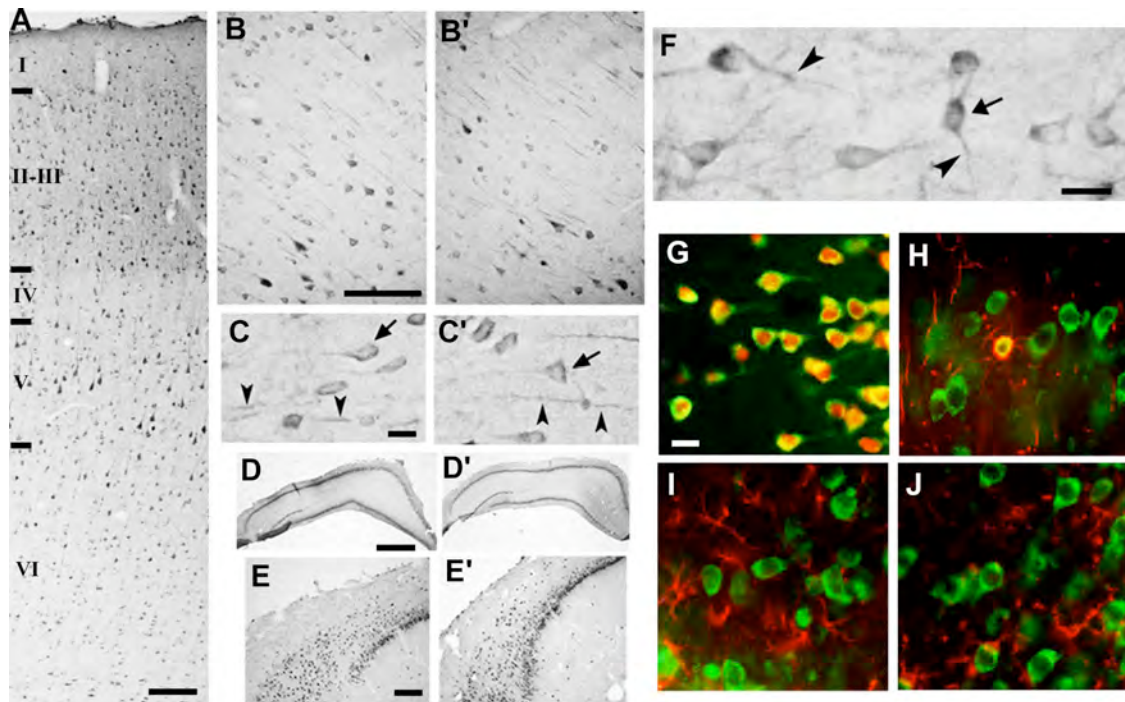


Figure 2. Distribution of CD3 ζ immunoreactivity in the rat brain. (A) In the parietal cortex, CD3 ζ -immunoreactive cells are detected throughout the six layers, but immunolabeled neuronal processes predominate in layers V and VI. (B–E') The comparison between the distribution of CD3 ζ immunoreactivity 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 ζ -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 ζ 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 μ m; (B and E) 75 μ m; (C, F, and G–J) 15 μ 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 ζ was still accumulated at the tip of the processes, with equal distribution observed for axons and minor neurites (Figure 3C). In addition, high CD3 ζ 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 ζ distribution was similar to that observed at 2 DIV, with a further specific enrichment of CD3 ζ immunoreactivity at the tips of processes. Nevertheless, unlike at 2 DIV, at 4–5 DIV CD3 ζ showed a marked preferential localization with dendrites than with axons (Figure 3D), as confirmed by double-labeling experiments of CD3 ζ with the dendritic marker MAP2 and the axonal marker tau-1 (Figure 4, A and B). Although CD3 ζ 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 ζ 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 ζ 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 ζ , and conversely a fraction of CD3 ζ clusters were colocalized with PSD-95 (Figure 3F'). To examine in detail the CD3 ζ cellular distribution within growth cones in young neurons, double-staining experiments on 3 DIV neurons were performed with Ab36 CD3 ζ antibody and either TRITC-phalloidin or anti-tubulin β III antibody, to visualize the respective F-actin- and microtubule-rich regions of the growth cone (Figure 4, C and D). CD3 ζ 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 ζ labeling (Figure 4D). Altogether, analysis of the developmental pattern of CD3 ζ 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 ζ immunoreactivity becomes mainly restricted to the somatodendritic compartment where it is enriched at synaptic sites.

CD3 ζ Clustering at the Tips of Neurites Is Dependent on Filamentous Actin and Protein Tyrosine Kinases of the Syk/ZAP-70 Family

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

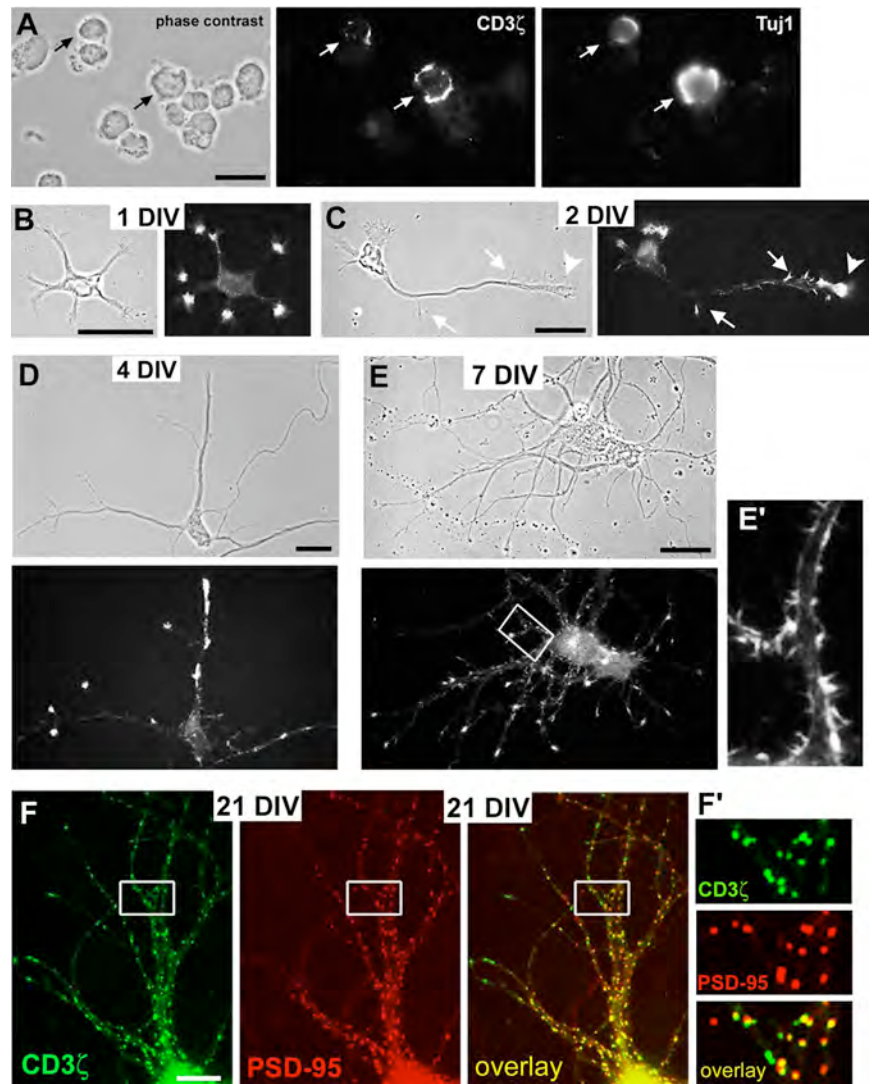


Figure 3. Developmental distribution of CD3 ζ in neurons derived from neural stem cells and in hippocampal neurons in culture from 1 to 21 DIV. (A) Neural stem cells cultured as neurospheres were dissociated, plated on glass coverslips, and fixed 2 h later in PFA for the immunodetection of CD3 ζ and Tuj1 (Tubulin β III), used as a neuronal marker. The immunopositive CD3 ζ 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 ζ . From 1–7 DIV, the paired phase-contrast image is shown to visualize cell morphology. At 1 and 2 DIV (B and C), CD3 ζ 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 ζ immunoreactivity is highly enriched at the tips of dendrites and short branches. At 7 DIV (E) CD3 ζ 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 ζ (green) and the postsynaptic marker PSD-95 (red). Numerous CD3 ζ 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 μ m; (C) 10 μ m; (D–F) 15 μ m.

nipulation caused a pronounced redistribution of CD3 ζ in numerous small puncta dispersed along dendrites but no longer concentrated at dendritic tips or filopodia (Figure 5A). Interestingly, the dispersed CD3 ζ clusters remained highly associated with the translocated F-actin puncta, suggesting a close molecular interaction between CD3 ζ 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 ζ was significantly reversed after 3 h of cytochalasin D washout (Figure 5A), supporting a major role of actin in the dynamic regulation of CD3 ζ 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 ζ 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 ζ accumulation at growth cones and filopodia. Neurons at 7 DIV were treated from 5 min to 2 h with 10 μ M piceatannol to inhibit Syk/ZAP-70, and CD3 ζ distribution was studied by immunofluorescence. As of 5 min of piceatannol treatment, the CD3 ζ immunoreactive clusters were completely dispersed, and a decrease in the overall staining intensity of CD3 ζ was observed (Figure 5C). The piceatannol-induced CD3 ζ 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 the Src protein tyrosine kinases family (including lck) with 1 μ M PP2 (Figure 5C) or a selective inhibition of lck with 100 nM damnacanthal, would affect CD3 ζ distribution similarly as piceatannol. As another control, neurons were also treated with the phosphoinositide 3-kinase inhibitor wortmannin (50 nM). No modification of CD3 ζ 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-

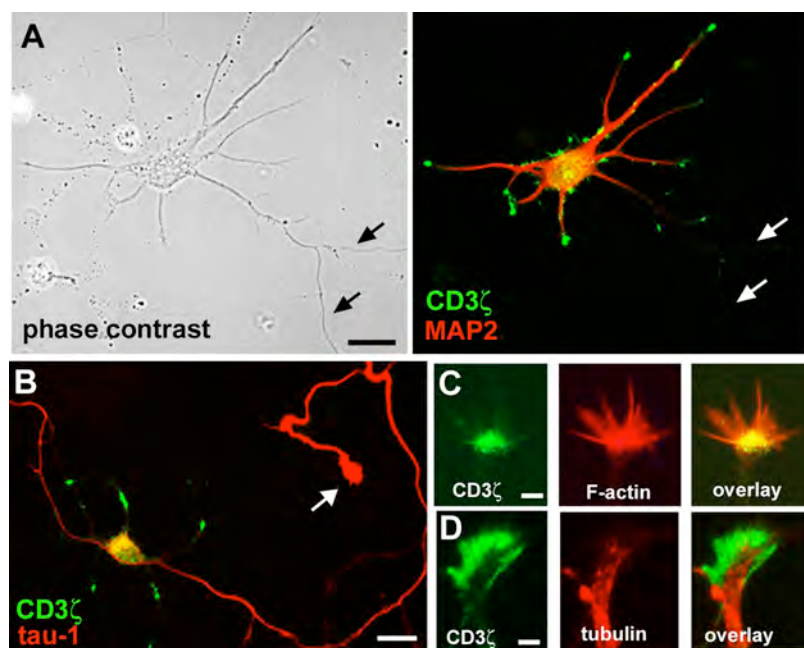


Figure 4. CD3 ζ is concentrated at dendritic tips and filopodia and is selectively associated with the peripheral region of the growth cone. (A) Neurons at 7 DIV were fixed and immunolabeled for CD3 ζ (green) and the dendritic marker MAP2 (red). CD3 ζ -immunoreactivity is mostly confined to the somato-dendritic compartment and is not detected in the axon, defined as a MAP2-negative process (arrows). (B) Double labeling of CD3 ζ (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 ζ immunoreactivity. (C) At growth cones of 2–3 DIV neurons, CD3 ζ 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 ζ immunoreactivity. Scale bars, (A and B) 20 μ m; (C and D) 2.5 μ m.

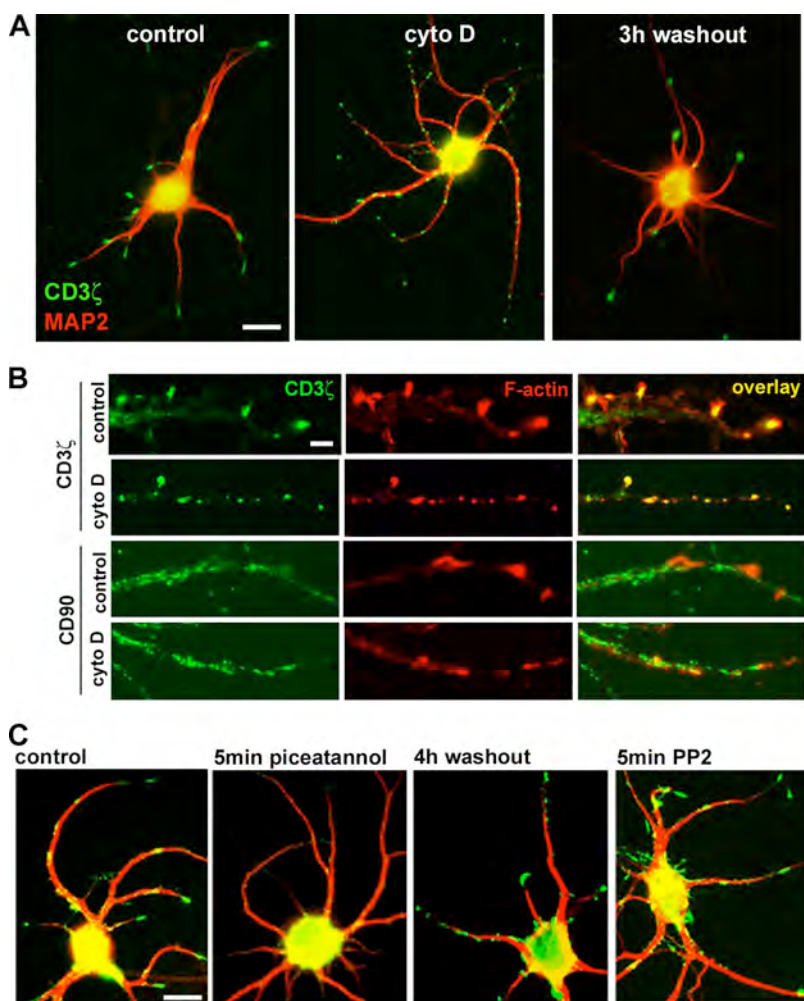


Figure 5. The selective concentration of CD3 ζ at dendritic tips depends on filamentous actin and on protein tyrosine kinases of the Syk/ZAP-70 family. (A) Neurons at 7 DIV were either left untreated (control) or were exposed for 24 h to 1 μ M of cytochalasin D to depolymerize actin (cyto D), and fixed and immunolabeled for CD3 ζ (green) and MAP2 (red). Cytochalasin D treatment induced a redistribution of the large CD3 ζ 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 ζ at dendritic tips (3-h washout). (B) Control neurons and cytochalasin D-treated neurons are double-labeled for either CD3 ζ or CD90 (green) and for F-actin with TRITC-phalloidin (red). In control neurons CD3 ζ strictly colocalizes to F-actin-rich subdomains identified as filopodia and dendritic tips. In cytochalasin-treated neurons, CD3 ζ 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 μ M piceatannol, an inhibitor of the protein tyrosine kinases of the Syk/ZAP-70 family, and were then immunolabeled for CD3 ζ (green) and MAP2 (red). Blockade of the Syk/ZAP-70 kinases induces a rapid loss of CD3 ζ aggregates, an effect reversed after 4 h of washout. By contrast, CD3 ζ distribution was unaffected by 1 μ M PP2, an inhibitor of the Src-family of protein tyrosine kinases. Scale bars, (A and C) 20 μ m; (B) 2 μ m.

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

CD3 ζ siRNA and a CD3 ζ Mutant Lacking the Sites of Tyr Phosphorylation Impairs Dendrite Formation

On the basis of our finding that CD3 ζ proteins are specifically enriched at dendritic tips and protrusions during the stage of dendrite elaboration and maturation, we examined whether CD3 ζ might play a role in dendrite development. For this purpose, we used an siRNA approach to knock-down CD3 ζ protein expression in cortical neurons culture. Four CD3 ζ siRNA sequences against different regions of CD3 ζ were tested for their efficacy and specificity in suppressing CD3 ζ expression in CD3 ζ -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 ζ protein expression reaching 30.7 ± 6.1 and $7.5 \pm 5.2\%$, respectively, of the signal intensity of CD3 ζ -expressing cells transfected with a control siRNA (Figure 6A). To test whether these siRNAs can decrease the expression level of endogenous CD3 ζ in neurons, cultured neurons at 3 DIV were cotransfected with either siRNA1 or siRNA3 and mGFP as a marker of transfection, and CD3 ζ immunoreactivity was quantified in the dendritic arbor at 5 DIV. The addition of siRNA1 or siRNA3 induced a severe reduction of endogenous CD3 ζ level that dropped to $21.7 \pm 6.0\%$ ($n = 23$) and $14.5 \pm 5.1\%$ ($n = 16$), respectively, of the averaged CD3 ζ signal intensity measured in nearby untransfected neurons (Figure 6, B and C). The control siRNA did not affect CD3 ζ 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 ζ to dendrite formation. We observed that CD3 ζ siRNA1 and siRNA3 significantly increased the size and the complexity of the dendritic arbor analyzed after immunostaining for CD3 ζ 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 ζ siRNA1, $163.3 \pm 16.3 \mu\text{m}$, $n = 52$ cells, $p < 0.001$; CD3 ζ 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 ζ siRNA1 or siRNA3, respectively, compared with siRNA control cells (control siRNA, 2.94 ± 0.34 , $n = 63$ cells; CD3 ζ siRNA1, 5.29 ± 0.45 , $n = 52$ cells, $p < 0.001$; CD3 ζ siRNA3, 5.86 ± 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 ± 0.31 for the number of dendritic branches, $n = 56$ cells), supporting that the changes in dendritic morphology induced by CD3 ζ -targeted siRNAs were specifically linked to the reduced CD3 ζ expression.

To further test the role of CD3 ζ in dendrite outgrowth, we generated a putative dominant negative form of CD3 ζ . In T lymphocytes, CD3 ζ 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 ζ 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 ζ to be phosphorylated and therefore converts CD3 ζ into an inactive form (Lowin-Kropf *et al.*, 1998; van Oers *et al.*, 2000). We thus replaced the six Tyr of CD3 ζ fused to GFP (CD3 ζ -GFP) by Phe and the resulting CD3 ζ -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 ζ -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 ζ -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 ± 0.31 , $n = 56$ cells; CD3 ζ -6Y6F-GFP, 3.84 ± 0.46 , $n = 32$ cells, $p < 0.05$; Figure 7). Thus, expression of CD3 ζ -6Y6F-GFP affected dendritic development by promoting branchpoint formation, suggesting that CD3 ζ may be normally involved in dendrite patterning, likely through an ITAM-based mechanism. Conversely, transfection with CD3 ζ -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 ± 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 ζ activity was limiting in dendrite patterning and that increasing CD3 ζ concentration through neuron transfection with CD3 ζ -GFP further inhibited dendrite development. Altogether, these results suggest that neuronal CD3 ζ is a negative regulator of dendrite outgrowth and patterning.

Application of CD3 ζ Antibody to Cultured Neurons Elicits Intracellular Calcium Increase and Inhibits Dendrite Development

If CD3 ζ is a negative regulator of dendrite development, then activating endogenous protein should impair dendrite formation. We used a CD3 ζ antibody targeted to the short extracellular domain of the molecule (antibody Ab22) as a tool that might potentially activate cell surface CD3 ζ . Initial characterization of the intracellular signaling mediated by CD3 ζ in leukocytes relied on the use of chimeric receptors comprising a heterologous cell-surface molecule fused to the cytoplasmic tail of CD3 ζ (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 Ca^{2+} mobilization (Wange and Samelson, 1996). We applied a similar strategy with CD3 ζ Ab22 antibody to measure Ca^{2+} mobilization by fluorescent 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 ζ 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 Ca^{2+} to measure the release of Ca^{2+} from internal compartments. Application of $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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

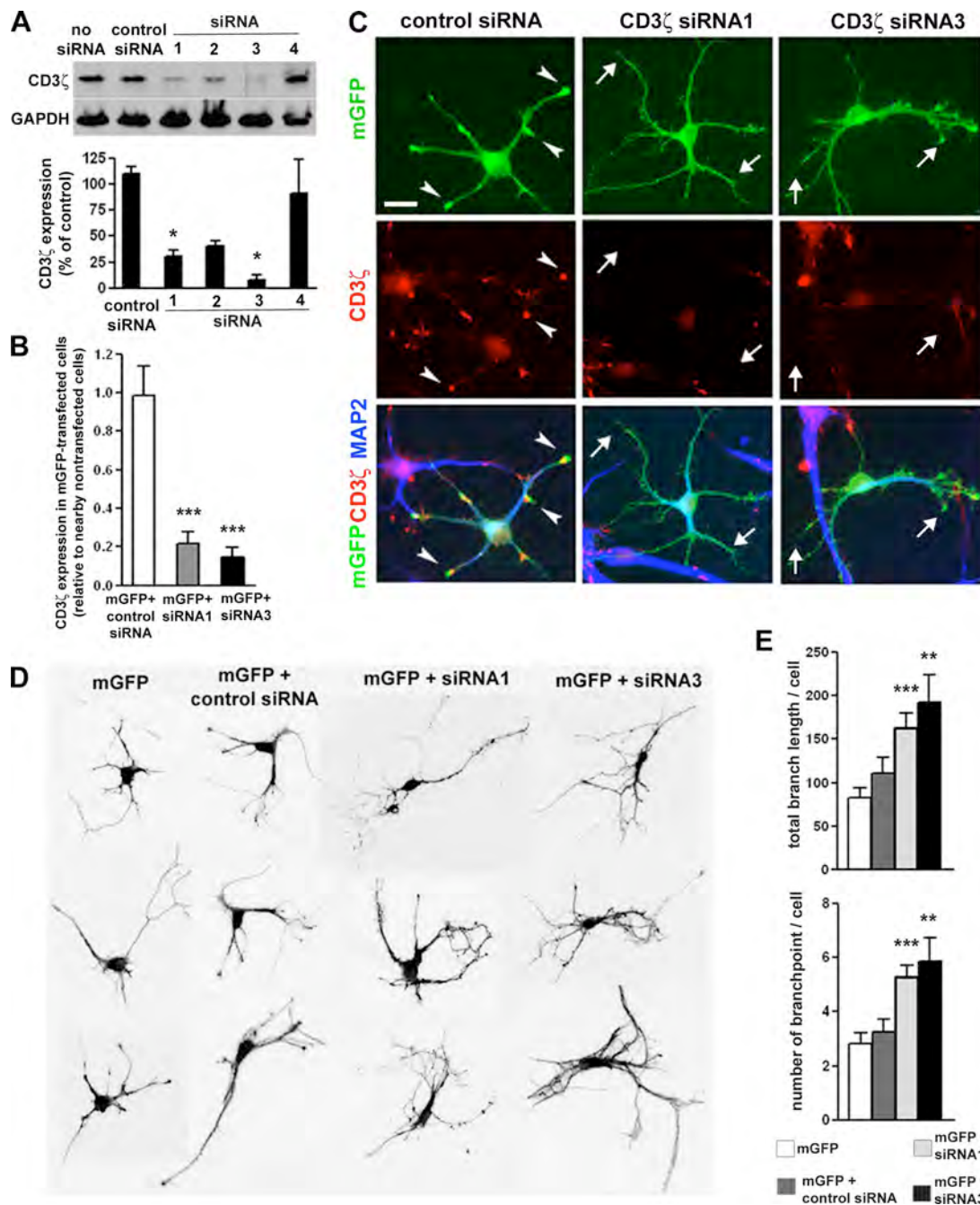


Figure 6. CD3 ζ siRNA1 and siRNA3 promoted dendritic branching. (A) The efficacy and specificity of CD3 ζ siRNA was tested in CD3 ζ -transfected COS-7 cells by immunoblot analysis. An equal amount of protein was loaded for each lane, and the same samples were blotted against CD3 ζ and GAPDH antibodies. CD3 ζ siRNA1 and siRNA3 induced a strong suppression of CD3 ζ expression. The signal intensity for each CD3 ζ siRNA is plotted below as a percent of the signal intensity obtained from control CD3 ζ -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 ζ plasmid alone). (B) Quantification of CD3 ζ expression in cultured cortical neurons transfected at 3 DIV and immunostained at 5 DIV. Data are presented as a ratio of anti-CD3 ζ 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 ζ expression by siRNA1 and siRNA3. Neurons were cotransfected at 3 DIV with mGFP (green) and either control siRNA or CD3 ζ siRNA1 or siRNA3, and were immunolabeled at 5 DIV for CD3 ζ (red) and the dendritic marker MAP2 (blue). Neurons transfected with a control siRNA show a robust CD3 ζ immunoreactivity on dendrites (arrowheads). Neurons transfected with either CD3 ζ siRNA1 or siRNA3 show a decreased CD3 ζ 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 ζ siRNA1, or mGFP + CD3 ζ 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 μ m.

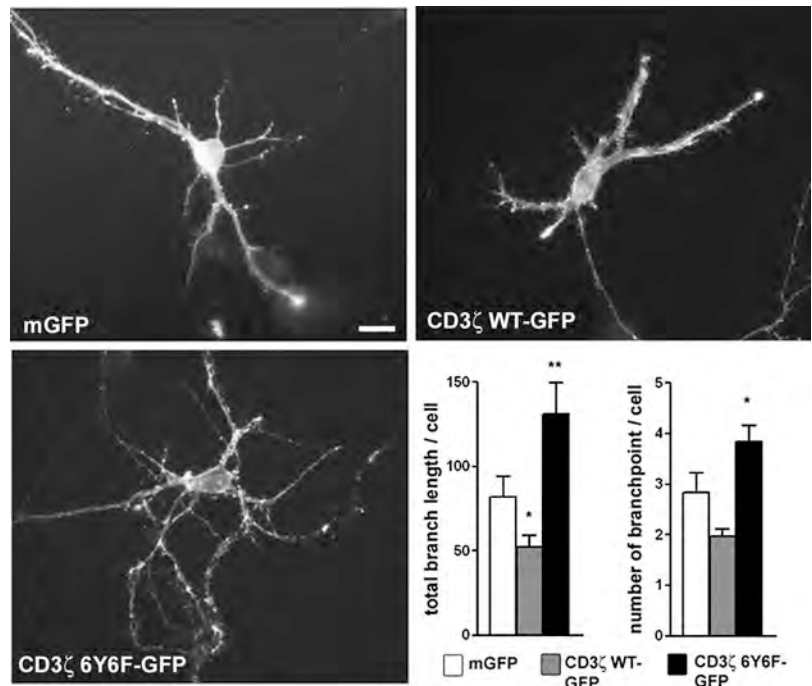


Figure 7. Overexpression of a CD3 ζ mutant lacking the Tyr phosphorylation sites in the ITAMs increased dendritic branching. Neurons transfected at 3 DIV with mGFP or CD3 ζ -GFP or CD3 ζ -6Y6F-GFP were fixed at 5 DIV and were visualized by the GFP signal. The dendritic arborization was increased in neurons expressing CD3 ζ -6Y6F-GFP but reduced in neurons expressing CD3 ζ -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 μ m.

(Figure 8A). By contrast, the subsequent application of Ab22 CD3 ζ antibody at 5 μ 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 ζ Ab22 antibody induced a Ca^{2+} release from internal stores, likely through a direct binding to cell surface-associated CD3 ζ proteins. These data suggest that Ab22 exhibits agonist-like activity and activates endogenous CD3 ζ triggering a $[Ca^{2+}]_i$ increase. We thus applied CD3 ζ Ab22 antibody to neuron culture to analyze the effects of endogenous CD3 ζ recruitment on dendrite patterning. The CD3 ζ antibody (5 μ 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 ± 7.6 μ m, $n = 52$ cells; control antibody treated-cells, 52.0 ± 9.1 μ m, $n = 40$ cells; $p = 0.65$; for branchpoint number, vehicle-treated cells, 1.71 ± 0.21 , $n = 52$ cells control antibody treated-cells, 1.83 ± 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 ζ 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 ± 2.3 μ m, $n = 50$ cells, $p < 0.001$; for branchpoint number per cell, 0.60 ± 0.12 , $p < 0.001$; Figure 8, B and C). Collectively, our data suggest that activating endogenous CD3 ζ 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 ζ , first described in the immune system (Samelson *et al.*, 1985), has a previously uncharacterized role in regulating neuronal development. CD3 ζ 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 ζ mutated in its three ITAMs affected dendrite formation with an increased number and length of dendritic branching. Conversely, overexpressing CD3 ζ or activating endogenous CD3 ζ by a CD3 ζ antibody reduced the length and number of dendritic branches. Altogether, our findings reveal a novel role for CD3 ζ in the nervous system, highlighting its contribution to dendrite development through an ITAM-based mechanism.

Neuronal Expression of CD3 ζ and Its Selective Association with Growth Cones and Filopodia in Young Neurons

We provide biochemical and immunohistochemical evidence for the expression of CD3 ζ in the CNS. Previous studies reported the detection of CD3 ζ 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 ζ protein in brain slices and to identify the CD3 ζ -expressing cells, which were predominantly neurons and to a lesser extent oligodendrocytes. The cellular distribution of CD3 ζ 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 ζ with F-actin. Treatment with the actin depolymerization agent cytochalasin D caused a dispersal of CD3 ζ clus-

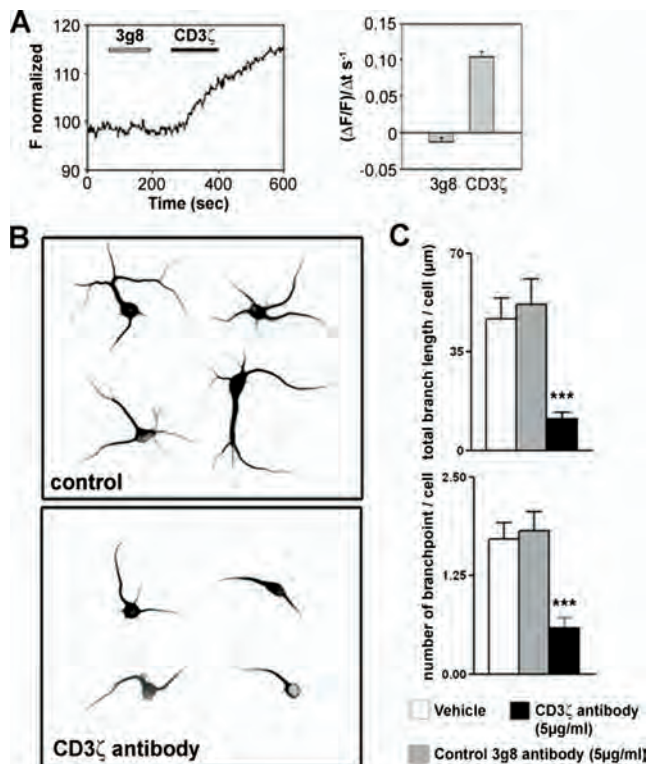


Figure 8. Application of CD3 ζ antibody to hippocampal cultured neurons induces an intracellular calcium increase and reduces the complexity of the dendritic arbor. (A) Cultured neurons at 7 DIV were loaded with Fluo-3 AM and exposed sequentially to the control antibody 3g8 (5 μ g/ml) and to the CD3 ζ Ab22 antibody (5 μ g/ml). Left, representative relative fluo-3 fluorescence in response to 3g8 and CD3 ζ antibodies shows a rise in $[Ca^{2+}]_i$ after CD3 ζ 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 ζ antibodies. (B) MAP2-immunolabeled 5 DIV hippocampal neurons sampled from cultures treated with a control antibody (control) or with CD3 ζ Ab22 antibody (CD3 ζ 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 μ m.

ters, indicating that the accumulation of CD3 ζ at growth cones and filopodia was dependent on F-actin. Interestingly, CD3 ζ remained colocalized with F-actin puncta spread throughout the neuropile upon actin disruption, suggesting a close molecular interaction between CD3 ζ and F-actin. Association of CD3 ζ 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 ζ at cytoskeletal F-actin-rich structures positions it ideally for a role in the regulation of dendritic shaping driven by actin-based mechanisms. CD3 ζ 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 ζ 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 ζ in Dendrite Patterning

Our finding that CD3 ζ 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 ζ expression in cultured neurons by siRNA increased dendrite outgrowth, a phenotype similarly obtained by expression of a CD3 ζ mutant lacking the Tyr phosphorylation sites within the ITAMs. The effects of the CD3 ζ -6Y6F-GFP mutant were likely due to the competition with the endogenous protein and suggest that the role of CD3 ζ on dendritic shaping required tyrosine-based signaling motifs. Conversely, CD3 ζ overexpression, which presumably mimicked an increased recruitment of the protein, and CD3 ζ antibody application, which acts through the activation of endogenously expressed CD3 ζ , both reduced the length and number of dendritic branches. Together, these data suggest that CD3 ζ acts as a negative regulator of dendritic arbor complexity through an ITAM-based mechanisms.

A critical role for CD3 ζ 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 ζ , the area of retinal projections in the lateral geniculate nucleus is abnormally larger and ectopic clusters of inputs were observed, indicating that CD3 ζ is required to precisely restrict the field of retinal projections (Huh *et al.*, 2000). The fact that CD3 ζ mRNA was detected in the lateral geniculate nucleus suggests a postsynaptic expression of CD3 ζ proteins in this area (Huh *et al.*, 2000). In light of our results, one could hypothesize that CD3 ζ 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 ζ Neuronal Function

In T-cell, CD3 ζ is a component of the CD3 complex that also includes CD3 ϵ , γ , and δ subunits. The CD3 ϵ , γ , and δ have all been detected in the cerebellum and CD3 ϵ -deficient mice, in which CD3- γ and CD3- δ 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 ζ mRNA was not detected in the cerebellum (Nakamura *et al.*, 2007), and we were not able to detect CD3 ϵ at the protein level in forebrain samples (data not shown). Thus CD3 ζ appeared to be expressed in distinct brain regions different from those for CD3 ϵ , γ , and δ , suggesting that CD3 ζ 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 ζ -bearing neuronal receptor, which could be either a known immune or neuronal receptor. Several CD3 ζ -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 β 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 ζ -containing receptor (Syken and Shatz, 2003; Nishiyori

et al., 2004). Other CD3 ζ -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 ζ -associated receptor.

Also critical to understanding how CD3 ζ 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 ζ 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 ζ 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 Ca²⁺ mobilization and activation of the Rho and Ras pathways (Pitcher and van Oers, 2003; Baniyash, 2004). In agreement with this, we found that CD3 ζ recruitment by a CD3 ζ antibody induced an elevation of [Ca²⁺]_i 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; Gallagher *et al.*, 2007) is compatible with the notion that Syk/ZAP-70 could be a relevant component of the intracellular transduction pathway connecting CD3 ζ activation and Ca²⁺ mobilization to negatively control dendritic shaping.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pr. J. P. Soulillou 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. Thinard for expert technical assistance, and K. Moriyoishi for kindly providing cDNA. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Fondation Progreffe, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (H.B.), and by an INSERM/Région Pays de la Loire predoctoral 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.
- Boulanger, L. M., and Shatz, C. J. (2004). Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 521–531.
- Caplan, S., Zeliger, S., Wang, L., and Baniyash, M. (1995). Cell-surface-expressed T-cell antigen-receptor zeta chain is associated with the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. 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, 555–592.
- 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.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A., and Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8, 1454–1468.
- 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.
- Garcia, G. G., and Miller, 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., Boulanger, L. M., Du, H., Riquelme, P. A., Brotz, T. M., and Shatz, C. J. (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290, 2155–2159.
- 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., Utsuyama, 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., Kinebuchi, 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.
- Letourneur, 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, R. 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.
- Moriyoishi, 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. (1985). 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-Bassillious, 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., Shenolikar, 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 P19 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., Chedotal, 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., Ding, 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.

Article n°2: Redistribution sélective au niveau des dendrites du récepteur de chimiokine CXCR4 suite à une stimulation agoniste

Stéphane J. Baudouin, Fabien Pujol, Arnaud Nicot, Patrick Kitabgi, et Hélène Boudin (2006)

Dendrite-selective redistribution of the chemokine receptor CXCR4 following agonist stimulation, Molecular and Cellular Neurosciences, 33(2), 160-9.

Résumé de l'étude :

Au cours de cette étude nous avons analysé sur des neurones en culture les conséquences du traitement par SDF-1 sur la distribution de son récepteur CXCR4.

Pour analyser les modifications de distribution de CXCR4 au niveau cellulaire suite à sa stimulation dans les neurones, nous avons utilisé un modèle de culture de neurones d'hippocampe transfectés par un plasmide codant pour le récepteur CXCR4 fusionné à la GFP (CXCR4-GFP). La distribution de CXCR4-GFP a été analysée après traitement des neurones par SDF-1 à différents temps. Nous avons observé que le traitement par SDF-1 induit une redistribution de CXCR4-GFP au niveau des dendrites. CXCR4 est alors détecté sous forme d'agrégats qui sont colocalisés avec le récepteur de la transferrine au niveau des endosomes. Par contre, aucune modification de distribution de CXCR4 n'est observée au niveau des axones.

Ces résultats nous ont permis de montrer que la stimulation du récepteur CXCR4 par son ligand SDF-1 induit une redistribution du récepteur dans les dendrites mais pas dans l'axone. Ces résultats permettent de proposer un mécanisme de régulation de l'action différentielle de SDF-1 lors de la formation de prolongements neuronaux.

Dendrite-selective redistribution of the chemokine receptor CXCR4 following agonist stimulation

Stéphane J. Baudouin,^{a,1} Fabien Pujol,^{b,1} Arnaud Nicot,^b Patrick Kitabgi,^b and Hélène Boudin^{a,b,*}

^aInstitut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), Unité 643, I.T.E.R.T, CHU Hotel-Dieu, University of Nantes, 30 Bd Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France

^bINSERM UMR 732, Hôpital St Antoine, Paris 75012, France; Université Pierre et Marie Curie–Paris 6, Paris 75012, France

Received 24 March 2006; revised 20 July 2006; accepted 25 July 2006

The chemokine SDF-1 is a secreted protein that plays a critical role in several aspects of neuron development through interaction with its unique receptor CXCR4. A key mechanism that controls neuron responsiveness to extracellular signals during neuronal growth is receptor endocytosis. Since we previously reported that SDF-1 regulates axon development without affecting the other neurites, we asked whether this could correlate with a compartment-selective trafficking of CXCR4. We thus studied CXCR4 behavior upon SDF-1 exposure in rat hippocampus slices and in transfected neuron cultures. A massive agonist-induced redistribution of CXCR4 in endosomes was observed in dendrites whereas no modification was evidenced in axons. Our data suggest that CXCR4 trafficking may play a role in mediating selective effects of SDF-1 on distinct neuronal membrane subdomains. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Trafficking; Endocytosis; Hippocampal neuron; Chemokine; Development; G-protein-coupled receptor

Introduction

Chemokines are small secreted proteins that exert their effects by activating a family of G-protein-coupled receptors (GPCRs) and that play several fundamental roles in many systems, including the immune, hematopoietic, cardiovascular and central nervous systems. Among the chemokines, recent studies highlighted the major role of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and its unique receptor CXCR4 in brain functions, with a particular emphasis on cellular trafficking and formation of neuronal circuits. Knock-out mice lacking either SDF-1 or its receptor CXCR4 showed marked defects in the architecture of the cerebellum, the hippocampus and the neocortex (Lu et al., 2002; Ma et al., 1998; Stumm et al., 2003;

Zou et al., 1998). In support of these observations, further analysis uncovered the role of SDF-1 in the migration of hippocampal, cerebellar and cortical neurons (Bagri et al., 2002; Stumm et al., 2003; Zhu et al., 2002) as well as of sensory neuron progenitors to the dorsal root ganglia (Belmadani et al., 2005). In addition, activation of CXCR4 by SDF-1 influences axon pathfinding (Chalasani et al., 2003; Lieberam et al., 2005; Lu et al., 2001; Xiang et al., 2002) and axonal patterning (Arakawa et al., 2003; Pujol et al., 2005). It thus becomes clear that SDF-1 represents a new extracellular signal regulating cell motility, branching and axon guidance, similarly as the well-documented guidance cues semaphorin, ephrin, Slit and netrin. For some of these latter, recent work has revealed the existence of new mechanisms linked to receptor endocytosis that participate in the spatial and temporal control of cellular adhesion and axon guidance (Fournier et al., 2000; Journey et al., 2002; Keleman et al., 2002; Williams et al., 2003; Zimmer et al., 2003). Receptor endocytosis triggered by receptor–ligand interaction is a widespread cellular mechanism involved in a large number of biological processes and represents a way to regulate the duration of the intracellular signaling upon receptor activation, the availability of cell surface receptors, and the sorting of receptors in recycling versus degradative pathways (Le Roy and Wrana, 2005). As many other GPCRs, CXCR4 has been shown to undergo agonist-induced receptor endocytosis in various cell systems including dorsal root ganglion neurons, T cells, macrophages and heterologous expression systems (Bodner et al., 2003; Orsini et al., 1999; Signoret et al., 1998; Venkatesan et al., 2003; Wang et al., 2001). The objectives of the present study were to investigate whether CXCR4 expressed in brain neurons undergoes endocytosis following SDF-1 activation, and if so whether receptors expressed on distinct neuronal compartments exhibit different trafficking properties. Since we previously reported in developing neurons that SDF-1 regulates axonal elongation and branching without affecting the other neurites (Pujol et al., 2005), we asked whether these effects could correlate with CXCR4 trafficking in a compartment-selective manner. We thus studied the distribution of CXCR4 following SDF-1 activation in rat hippocampus slices and in a low-density hippocampal neuron

* Corresponding author. INSERM U643, ITERT, 30 Bld Jean Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France. Fax: +33 2 40 08 74 11.

E-mail address: helene.boudin@univ-nantes.fr (H. Boudin).

¹ These authors contributed equally to this work.

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

culture system, a preparation that allows analysis at the cellular level. We found that CXCR4 distribution is dynamically regulated by SDF-1 in both brain slices and dissociated cultured neurons and that CXCR4 trafficking proceeds differently in the axonal and somatodendritic compartments. Whereas a massive redistribution of CXCR4 in endosomes was observed in dendrites, no modification was evidenced in the axonal compartment, suggesting that differential trafficking properties might underlie compartment-selective action of SDF-1.

Results

Redistribution of CXCR4 following SDF-1 stimulation in hippocampal slices

To determine whether agonist treatment affects the localization of CXCR4 receptor in central neurons, we examined the effect of SDF-1 on the distribution of CXCR4 immunolabeling in the hippocampus, a region previously documented to exhibit CXCR4

immunoreactivity (Banisadr et al., 2002; Stumm et al., 2002). We used an affinity-purified polyclonal CXCR4 antibody that has been previously characterized in several cellular models, including rat brain (Banisadr et al., 2002; Callewaere et al., 2006). We performed additional experiments to support the specificity of the CXCR4 antibody. Cultured hippocampal neurons were transfected with a myc-tagged CXCR4 cDNA and were double labeled at 5 DIV for myc and CXCR4 immunoreactivities (Fig. 1A). The CXCR4 labeling paralleled that of the myc labeling indicating that the CXCR4 antibody specifically reacted with CXCR4 receptor.

Under control conditions, high CXCR4 receptor immunofluorescence was associated with neuronal perikarya of the pyramidal cell layer of CA1 (Fig. 1B). In addition, numerous stretches of CXCR4 immunolabeling were also detected throughout the neuropil of the strata oriens and radiatum. Incubation of brain slices with 100 nM SDF-1 for 2 h induced prominent changes in CXCR4 distribution as compared to control slices. The most conspicuous changes were observed in the neuropil of the stratum

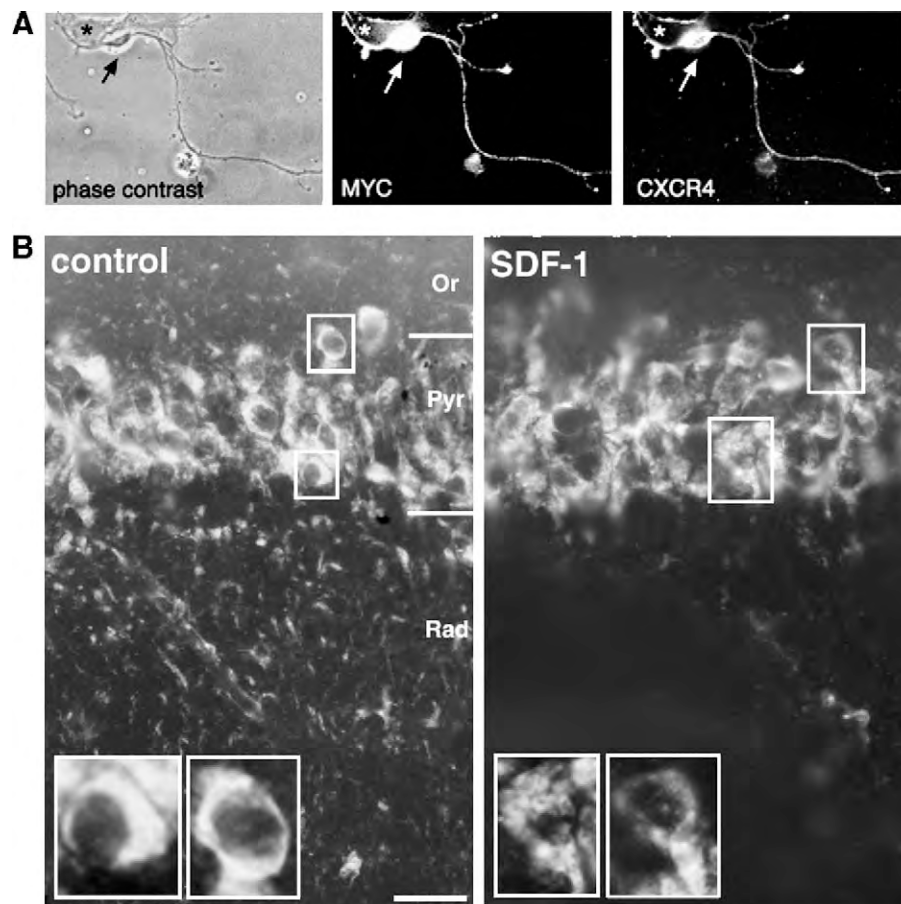


Fig. 1. Redistribution of CXCR4 in hippocampus slices following SDF-1 exposure. (A) Validation of CXCR4 antibody specificity. Cultured hippocampal neurons were transfected with myc-CXCR4 cDNA and were immunolabeled at 5 DIV with a myc and a CXCR4 antibodies. Low camera exposure allowed visualization of only recombinant CXCR4. A transfected neuron is labeled with the two antibodies (arrow) whereas no labeling is detected in a non-transfected cell (*). (B) Immunofluorescence of CXCR4 in the CA1 of the hippocampus in control slices (control) and in slices incubated for 2 h with 100 nM SDF-1 (SDF-1). The stratum oriens (Or), pyramidal cell layer (Pyr) and the stratum radiatum (Rad) of the CA1 are depicted. Insets in each panel correspond to magnified cell bodies to show details in CXCR4 distribution. In control slices, CXCR4 immunoreactivity is associated with perikarya of the pyramidal cell layer and is detected in numerous stretches throughout the neuropil of the strata oriens and radiatum. In slices incubated for 2 h with 100 nM SDF-1, CXCR4 immunoreactivity is virtually abolished in the neuropil, but is still evidenced over perikarya of the pyramidal cell layer. At higher magnification (insets), the somatic CXCR4 immunolabeling shows a more granular aspect following SDF-1 stimulation than under control conditions. Scale bar: 30 μ m.

oriens and radiatum in which agonist stimulation markedly reduced CXCR4 immunoreactivity (Fig. 1B). Within the pyramidal cell layer, CXCR4 immunolabeling was still observed over neuronal soma, but showed a more granular aspect than under control conditions (Fig. 1B, insets).

To better analyze at cellular level the modifications of CXCR4 distribution upon agonist stimulation, a model of hippocampal cultured neurons expressing transfected GFP-tagged CXCR4 (CXCR4-GFP) was developed.

CXCR4-GFP transfected in neurons preferentially internalizes in dendrites versus axons

The reasons for studying the trafficking of transfected CXCR4-GFP instead of endogenous CXCR4 were twofold. First, the transfection system allowed to unambiguously detect CXCR4-GFP

signal at high level facilitating the analysis of receptor distribution. Second, the low transfection rate of our procedure (around 0.1%) resulted in the expression of recombinant receptors in widely separated neurons, allowing us to resolve individual receptor-expressing cell bodies and processes by light microscopy. We first confirmed that similarly to a CXCR4-YFP construct (Bodner et al., 2003), CXCR4-GFP conserved both its functional and dynamic properties in a COS cell expression system by $[Ca^{2+}]_i$ imaging techniques and agonist-induced endocytosis assays respectively (not shown).

Neurons transfected with CXCR4-GFP were treated at 10 DIV with 100 nM SDF-1 for 2 h before fixation and immunodetection of MAP2, a dendritic marker. In control cells, the CXCR4-GFP signal was observed throughout dendrites and axons (Fig. 2A). Within the cell bodies and large dendrites, the CXCR4-GFP signal outlined the border of the cell, suggesting that a large fraction of the receptors was associated with the plasma membrane (Figs. 2A, B).

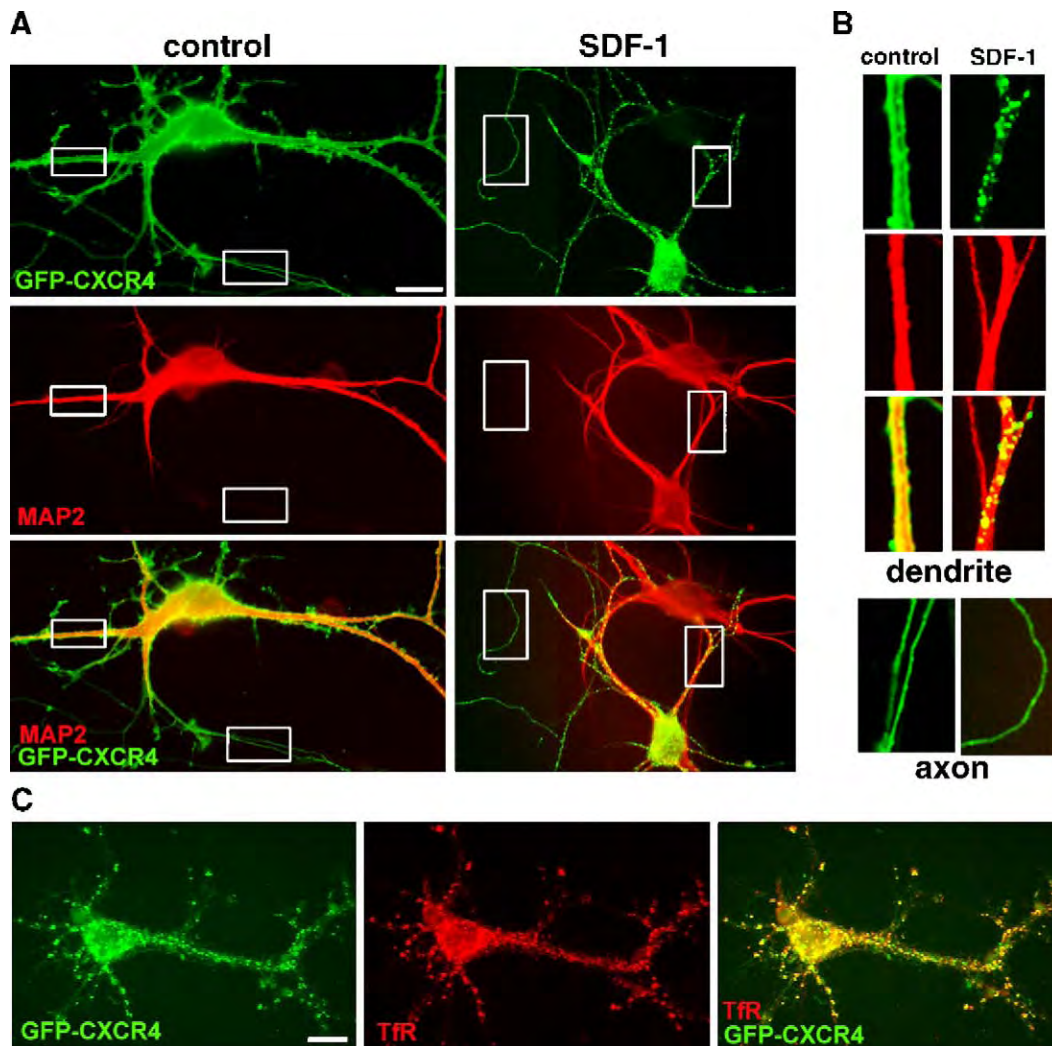


Fig. 2. Dendrite-selective redistribution of CXCR4 into endosomes upon SDF-1 stimulation. (A, B) Neurons transfected with CXCR4-GFP were incubated for 2 h in the absence (control) or in the presence of 100 nM SDF-1, and were immunostained for MAP2, a dendritic marker. Images in panel B correspond to higher magnification of the boxed regions shown in panel A for a portion of a dendrite (MAP2-positive process) and of an axon (MAP2-negative process). In control cells, CXCR4-GFP is mostly homogeneously distributed over dendrites and axons, although it shows a higher concentration at the border of somatodendritic elements. SDF-1 treatment induces the formation of numerous CXCR4-GFP puncta in the cell body and dendrites but does not modify the axonal pattern. (C) Neurons transfected with CXCR4-GFP were incubated for 2 h with 100 nM SDF-1, and were immunostained for transferrin receptor (TfR), a marker for endosomes. The intracellular clusters of CXCR4-GFP largely colocalized with TfR-associated vesicles in the cell body and dendrites. Scale bar: 20 μ m.

After a 2-h exposure to 100 nM SDF-1, the CXCR4-GFP pattern was drastically modified in somatodendritic compartments as compared to vehicle-treated cells (Figs. 2A, B). Numerous CXCR4-GFP puncta were observed inside dendrites and soma, reaching a 850% increase in the number of CXCR4-GFP puncta per 100 μ m of process (Figs. 2A, B; 3A). By contrast, no modification in the distribution of CXCR4-GFP was observed in axons after agonist exposure (Figs. 2A, B; 3A). The redistribution of the receptors upon SDF-1 treatment was blocked by the coinubation with a CXCR4 antagonist, 10 μ M bicyclam, suggesting a direct involvement of CXCR4 in mediating the effects of SDF-1 on CXCR4-GFP redistribution (data not shown). The visualization of the first CXCR4-GFP clusters was evidenced after a relatively long time of agonist exposure (30 min) and reached its maximum level between 1 and 2 h of treatment. To examine whether the SDF-1-induced redistribution of CXCR4-GFP was reversible, cells were first exposed to 100 nM SDF-1 for 2 h, washed out, and left in medium without agonist for the indicated time (Fig. 3B). The density of CXCR4-GFP puncta rapidly declined during the first hour of agonist removal, followed by a second phase of slower decrease (Fig. 3B).

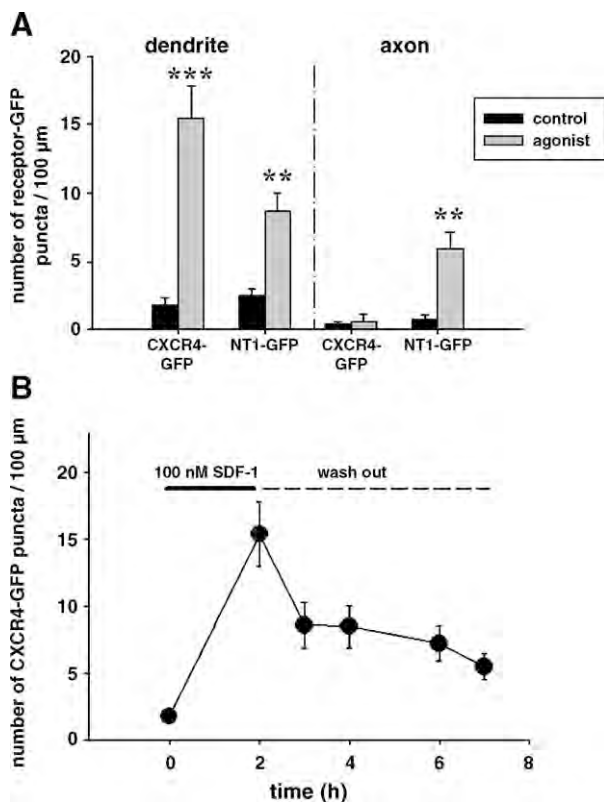


Fig. 3. Quantification of the density of CXCR4-GFP and NT1-GFP puncta after agonist exposure. (A) Density of CXCR4-GFP and NT1-GFP puncta after 100 nM SDF-1 or 100 nM NT treatment respectively, in dendrites and axons at 10 DIV. Dendrites were defined as MAP2-positive processes and axons as MAP2-negative processes. (B) Time course of the recovery of CXCR4-GFP pattern towards basal level. Neurons were pretreated with 100 nM SDF-1 for 2 h as symbolized by a black bar and left for wash out in medium without agonist for the indicated time (dashed line). Measurements were done on 10 to 20 cells from two to three culture preparations. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. ** P < 0.01, *** P < 0.001 (Student's t -test) compared to corresponding measurements in control cells.

Nature of endocytic compartment

To determine the nature of the CXCR4-GFP associated vesicles, immunostaining was performed with a transferrin receptor antibody, a classical marker of clathrin-coated endosomes (Maxfield and McGraw, 2004). As shown in Fig. 2C, most of the CXCR4-GFP puncta colocalized with transferrin receptors following a 2-h treatment with SDF-1, suggesting that CXCR4 receptors were internalized inside the cells where they associated with endosomal vesicles. This was further confirmed by the observation that hyperosmolar sucrose (0.4 M), an inhibitor of the clathrin pathway (Koenig and Edwardson, 1997), abolished the redistribution of CXCR4-GFP when added to the incubation medium in the presence of SDF-1 (not shown).

Differential neuronal redistribution is an intrinsic feature of CXCR4

Our data showing a lack of internalization of CXCR4-GFP in axons suggested either a deficiency of cultured neurons in promoting agonist-induced internalization of GPCRs in axons, or the existence of an intrinsic feature of CXCR4. We thus analyzed in the same neuronal model the fate of another GPCR known to efficiently internalize in neuronal cells after agonist exposure. Cells transfected with the high affinity neurotensin receptor tagged with GFP (NT1-GFP) were treated with 100 nM NT. NT1-GFP showed a high capacity to internalize into dendrites and axons (Figs. 3A, 4). These data suggest that the absence of internalization observed in axons for CXCR4-GFP represented an intrinsic characteristic of CXCR4, not shared by all GPCRs.

Increased level of β -arrestin 2 does not allow agonist-induced redistribution of CXCR4-GFP in axons

We considered the possibility that the lack of agonist-induced endocytosis of CXCR4-GFP in the axonal compartment might originate from an insufficient axonal expression of some signaling proteins involved in CXCR4 endocytosis. A key mediator in agonist-induced endocytosis of CXCR4 is β -arrestin (Orsini et al., 1999; Cheng et al., 2000). We thus tested whether overexpression of β -arrestin 2 in neurons would allow for axonal internalization of CXCR4-GFP following SDF-1 stimulation. Neurons were co-transfected with CXCR4-GFP and myc- β -arrestin 2 and the CXCR4-GFP redistribution was analyzed (Fig. 5). Overexpression of β -arrestin 2 did not change the pattern of CXCR4 distribution either under control conditions (Fig. 5A) or upon agonist stimulation (Fig. 5B) as compared to neurons singly transfected with CXCR4-GFP (Fig. 2). Dendritic CXCR4-GFP receptors were massively redistributed in intracellular clusters upon SDF-1 treatment, whereas no modification was observed in axons, despite the overexpression of myc- β -arrestin 2 (Fig. 5B), suggesting that β -arrestin 2 was not a limiting factor that could prevent CXCR4 internalization in the axonal compartment.

Selective redistribution of CXCR4 during neuronal development

To determine whether the differences in agonist-induced CXCR4 redistribution between dendrites and axons exist as soon as the axon is formed, experiments were conducted during the first days of neuronal culture, from a non-polarized state to a stage corresponding to the initiation of polarization characterized by axon elongation.

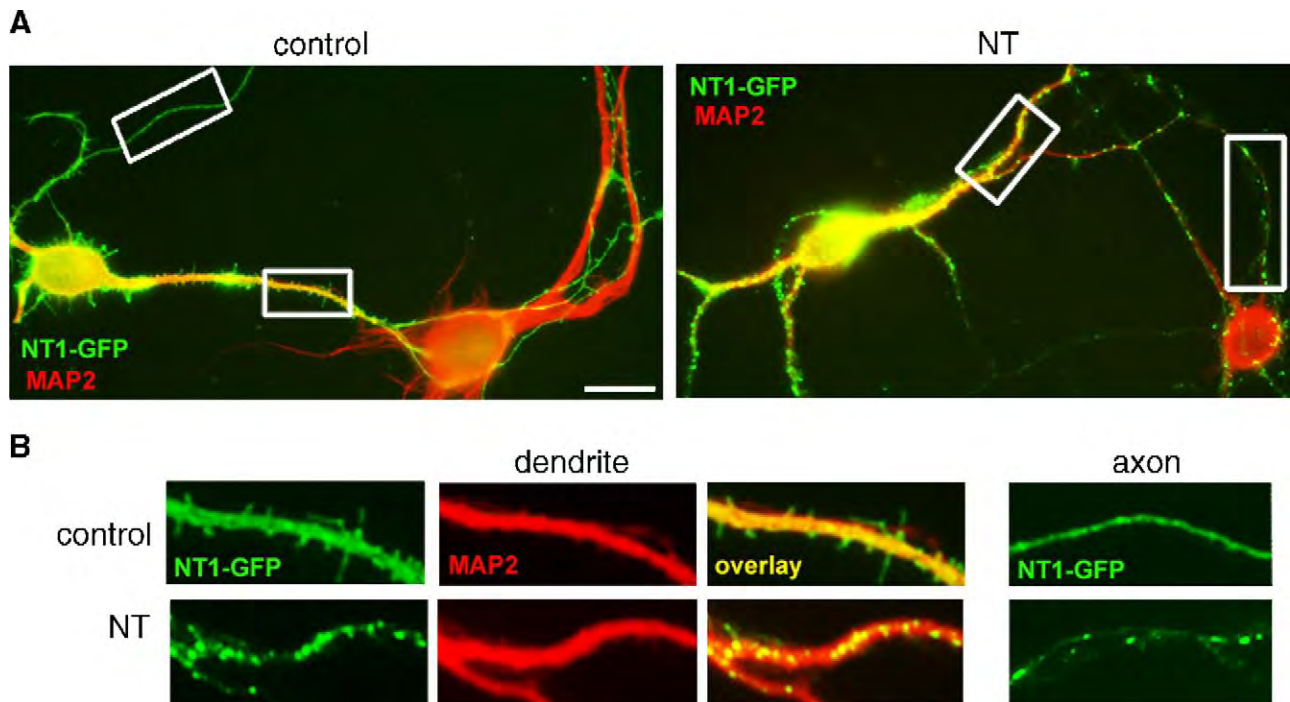


Fig. 4. Agonist-induced redistribution of NT1-GFP occurs in both dendrites and axons. Neurons transfected with NT1-GFP were incubated for 2 h in the absence (control) or in the presence of 100 nM NT (NT), and were immunostained for MAP2. (B) Higher magnification of the boxed regions shown in panel A for a portion of a dendrite (MAP2-positive process) and of an axon (MAP2-negative process). In both the dendritic and axonal compartments, NT exposure induces a robust receptor redistribution in a discontinuous punctate pattern. Scale bar: 20 μ m.

Transfected neurons were fixed 4 h after plating at 0 DIV, 1 or 2 DIV. Few hours after plating, at 0 DIV, CXCR4-GFP was detected at the periphery of the cell body with particularly hot spots localized at the tip of some filopodia, while the intracellular labeling was weak (Fig. 6A). Incubation with SDF-1 induced a marked redistribution of CXCR4-GFP in intensely fluorescent cytoplasmic vesicles whereas the labeling originally present at the periphery of the cell was greatly reduced (Fig. 6A). At 1 DIV, a stage at which the lamellipodia and filopodia have condensed to form around 4 minor neurites (Dotti et al., 1988), CXCR4-GFP was concentrated at the tip of the processes likely corresponding to growth cones (Fig. 6B). In addition, GFP signal was observed in a large intracellular cluster localized in the cell body likely corresponding to neosynthesized receptors associated with the Golgi apparatus. As observed for 0 DIV, treatment with SDF-1 induced a decrease in CXCR4-GFP signal in the growth cone-like structures and the formation of intracellular vesicles distributed throughout the cell (Fig. 6B). At 2 DIV, neurons start to polarize by selectively extending only one of the minor processes, defined as the growing axon which represents at this stage the longer process (Dotti et al., 1988). We thus compared quantitatively the distribution of CXCR4-GFP in the elongating axon and in the other neurites. Under control conditions, the receptor distribution was similar in the axon and the other neurites. Similarly to what was observed at earlier developmental stages, high concentrations of CXCR4 were frequently observed at the leading edge of growing processes. The incubation of the cells with 100 nM of SDF-1 for 2 h induced a massive redistribution of CXCR4-GFP in intracellular clusters within minor neurites whereas only a modest modification of the CXCR4-GFP pattern was observed in the developing axon (Figs. 6C, D). These experiments indicated that the axonal

differentiation was accompanied by a selective inability of CXCR4 to be internalized in the developing axon as compared to the other neurites.

Discussion

In the present work, we provide evidences that the chemokine receptor CXCR4 expressed onto central nerve cells undergoes a robust redistribution following SDF-1 exposure in both rat brain slices and transfected dissociated neurons in culture. Examination at a cellular level of hippocampal neurons *in vitro* revealed that agonist stimulation induced receptor endocytosis into endosomes and that this effect is restricted to the somatodendritic compartment and absent in the axonal domain. The lack of axonal CXCR4 redistribution upon agonist exposure was evidenced as soon as the axon started to differentiate, suggesting that differential receptor trafficking might underlie compartment-selective action of SDF-1 during development.

Redistribution of CXCR4 in neurons following agonist stimulation

The results of the present study report that SDF-1 stimulation of central neurons expressing CXCR4 receptors induced a massive receptor redistribution. In dissociated cultured neurons transfected with CXCR4-GFP, agonist exposure induced the formation of numerous intracellular CXCR4-GFP-associated vesicles, identified as endosomes. In brain slices, the treatment with SDF-1 induced a marked reduction of CXCR4 immunoreactivity in the neuropil of the dendritic field of CA1 pyramidal neurons which paralleled with a reorganization of the somatic immunoreactivity to a punctate

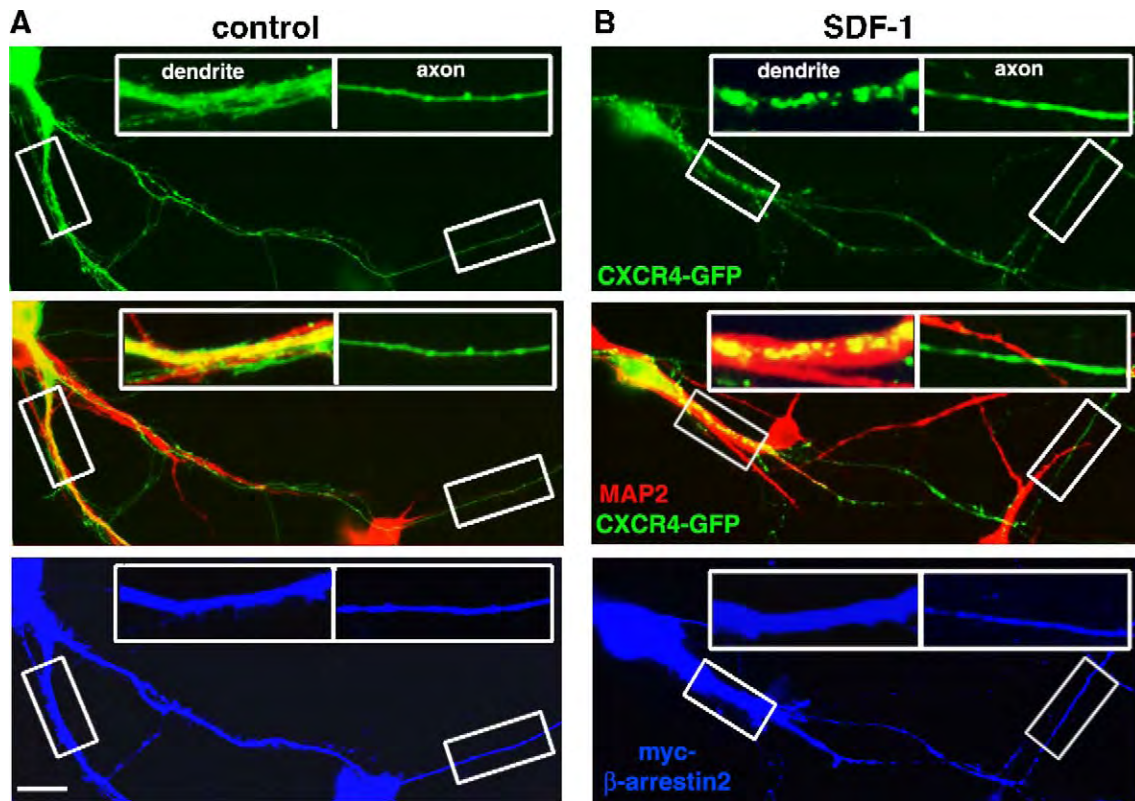


Fig. 5. Increased level of β -arrestin 2 does not allow agonist-induced redistribution of CXCR4-GFP in axons. Neurons cotransfected with CXCR4-GFP and myc-tagged β -arrestin 2 were incubated at 10 DIV for 2 h at 37°C without (A, control) or with 100 nM SDF-1 (B, SDF-1), and were immunostained for myc and MAP2. The overexpressed myc- β -arrestin 2 is detected in both dendritic and axonal compartments. Magnified portions of CXCR4-GFP-expressing dendrite (MAP2-positive process) and axon (MAP2-negative process) are presented in boxed regions. (A) In control cells, CXCR4-GFP is mostly homogeneously distributed over dendrites and axons. (B) SDF-1 treatment induces the formation of intracellular CXCR4-GFP clusters in the somatodendritic domain, but no change was observed in the pattern of axonal CXCR4-GFP. Scale bar: 20 μ m.

pattern. These changes observed in brain slices can best be explained by a migration of internalized receptors from dendrites to nerve cell bodies, where they would coalesce in several intrasomatic clusters, as observed for the neurotensin receptor NT1 in rat basal forebrain and mesencephalon slices (Faure et al., 1995a,b). As for the majority of other GPCRs, the main mechanism reported to be involved in CXCR4 endocytosis in various cell systems is through a clathrin-coated endocytic pathway (Cheng et al., 2000; Orsini et al., 1999; Venkatesan et al., 2003). In this pathway, ligand binding triggers receptors association with the adaptor molecules β -arrestin and adaptin 2 (Takei and Haucke, 2001), with a subsequent recruitment of clathrin for the formation of clathrin-coated vesicles. These vesicles are eventually targeted to early endosomal compartments for either recycling or degradation. Our data showed that the puncta of CXCR4 observed in SDF-1-exposed neurons overlapped broadly with the transferrin receptor, a marker classically used to label early and recycling endosomes of the clathrin pathway (Maxfield and McGraw, 2004). These data, added to the blockade of agonist-induced CXCR4 redistribution by hyperosmolar sucrose, which was reported to inhibit the clathrin pathway (Koenig and Edwardson, 1997), suggest that the mechanism underlying CXCR4 internalization in neurons operated through clathrin-coated pits, as reported in other cell types (Cheng et al., 2000; Orsini et al., 1999; Venkatesan et al., 2003).

Differential CXCR4 redistribution in dendrites and axons following agonist activation

A striking finding of the present study is the apparent lack of agonist-induced CXCR4 endocytosis in the axonal compartment, as compared to the massive redistribution of CXCR4 in endosomes observed in dendrites. Thus, CXCR4 trafficking proceeds differently in the axonal and somatodendritic compartments. An explanation would be that axons of cultured neurons possess reduced capacity in generating GPCR endocytosis as opposed to dendrites. However, this possibility seems unlikely since the neurotensin receptor NT1, another GPCR well characterized for its ability to undergo robust agonist-induced internalization in nerve cells (Faure et al., 1995a,b; Nguyen et al., 2002; Nouel et al., 1997), showed comparable rate of receptor redistribution in dendrites and axons. Thus the discrepancy observed for CXCR4 internalization between the dendritic and axonal compartments likely relies on the segregation in neuronal subdomains of endocytic and regulatory proteins specifically linked to CXCR4. We showed that it unlikely depends on expression level or cell compartmentalization of β -arrestin 2, since its overexpression did not promote any increase in endocytosis of axonal CXCR4. Other candidates, such as G-protein-coupled receptor kinases or members of the heat shock protein family involved in CXCR4 endocytosis (Ding et al.,

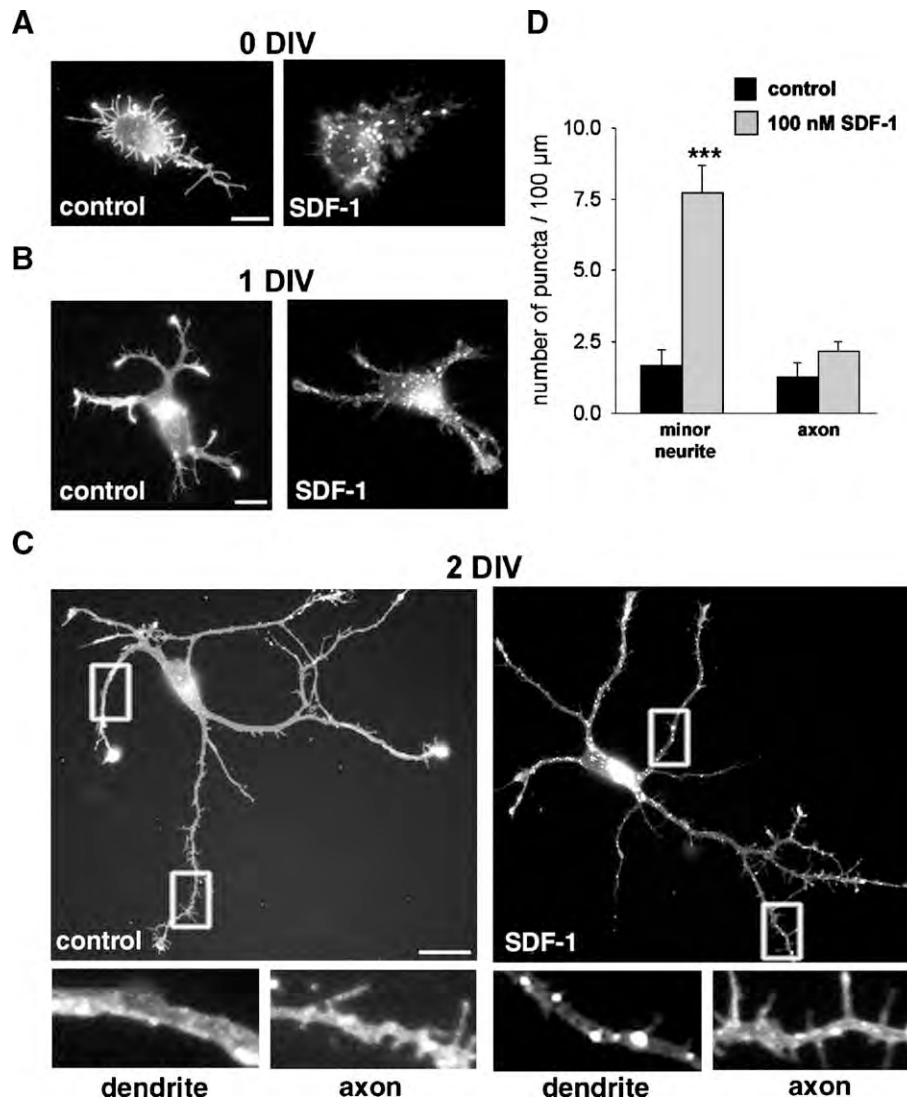


Fig. 6. Effect of agonist exposure on CXCR4-GFP distribution at early stages of neuronal development. (A–C) Neurons transfected with CXCR4-GFP were incubated few hours after plating at 0 DIV, 1 and 2 DIV for 2 h in the absence (control) or in the presence (SDF-1) of 100 nM SDF-1. At 2 DIV, the insets below images show higher magnification of the boxed portion of a minor neurite and of the growing axon. CXCR4-GFP receptors redistribute in intracellular vesicles in response to agonist treatment at any studied developmental stages. However, as soon as the axonal elongation starts, i.e., 2 DIV, only a weak modification of receptor distribution is observed in the growing axon as compared to the other minor neurites. (D) Quantification of the density of CXCR4-GFP puncta in minor neurites and in axons at 2 DIV after SDF-1 treatment. Measurements were done on 20 cells from two culture preparations. Bars represent mean number of puncta per 100 μ m $\pm$ SEM. *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test) compared to corresponding measurements in control cells. Scale bar: 5 μ m (A, B); 30 μ m (C).

2006; Fan et al., 2002) would be worthy to be tested. Interestingly, the cannabinoid CB1 and opioid μ receptors have both been shown to exhibit a slow rate of endocytosis in axons, a fact attributed to a less effective endocytic machinery for these receptors in axons (Habersack-Debic et al., 2005; Leterrier et al., 2006). Whether a common mechanism exists for these receptors to limit endocytic trafficking in axons remains to be explored.

Functional implications of CXCR4 endocytosis in neuron development

The selective absence of agonist-induced internalization of CXCR4 in axons as compared to the other neurites was detected as soon as the axon started to differentiate, i.e., at 2 DIV. This

compartment-selective effect of agonist stimulation on CXCR4 trafficking might result in distinct functional consequences during the elaboration of neuronal polarity. We previously documented that the activation of CXCR4 in developing cultured neurons by SDF-1 affected axonal branching and elongation without any detectable changes in the other neurites (Pujol et al., 2005). The reduced extent of CXCR4 internalization in the developing axon is thus correlated with the selective action of SDF-1 on axonal patterning. One could hypothesize that the agonist-induced internalization of CXCR4 might be a mechanism to spatially restrict the action of SDF-1 to specific neuronal domain. Thus, the endocytosis of CXCR4 massively observed in the dendritic compartment (but not in the axonal domain) might impede SDF-1 to modulate neurite shaping. In support, recent work reported that axon responsiveness by several guidance cues is controlled by

regulating the intracellular trafficking of their associated receptors. The endocytosis of the ephrin B receptor initiated by the interaction with ephrin B through a cell–cell contact promoted cell detachment and was necessary for axon withdrawal during growth cone collapse (Zimmer et al., 2003). Similarly, by regulating cell surface receptor expression, internalization of Robo and UNCC5H1, the receptors for the repellent signals Slit and netrin-1 respectively, allowed to adjust axon sensitivity to these guidance cues and consequently to control axon repulsion (Keleman et al., 2002; Williams et al., 2003; Zimmer et al., 2003). It is then likely that regulated subcellular trafficking of receptors contribute to orchestrate many developmental decisions, ranging from axon pathfinding to branching and elongation.

The present study by identifying a compartment-selective CXCR4 redistribution induced by SDF-1 suggests that CXCR4 receptor trafficking may play a role in mediating selective effects of SDF-1 on distinct neuronal membrane subdomains, favoring prolonged CXCR4 signaling in the axonal compartment.

Experimental methods

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

Slice preparation

Adult male Sprague Dawley rats were decapitated, and their brains were removed rapidly and blocked on a vibratome chuck. Coronal sections containing the hippocampus were cut at 100- μ m thickness and collected in ice-cold oxygenated Ringer's buffer containing (in mM) 124 NaCl, 5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 2.4 CaCl₂, 1.5 MgSO₄, 26 NaHCO₃, and 10 glucose, pH 7.4. During all of the following procedures the slices were oxygenated continuously with 95%O₂/5%CO₂ bubbled into the incubation buffer. Slices were then equilibrated for 20 min at room temperature with Ringer's buffer and were transferred for 2 h at 37°C in the same buffer containing (experimental) or not (control) 100 nM of SDF-1 (Peprotech). Slices were then fixed for 20 min at room temperature in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 4% paraformaldehyde and proceeded for CXCR4 immunodetection.

Neuron culture, transfection and pharmacological manipulation

Rat hippocampal cultures were prepared from 18-day-old rat embryos by previously described methods (Goslin et al., 1998). Briefly, hippocampi were dissected and dissociated by trypsin and trituration and plated at a density of 14,000 cells/cm² on glass coverslips coated with poly-L-lysine in MEM with 10% calf serum. Cells were transfected with myc-CXCR4 or CXCR4-GFP cDNAs (gifts of Drs Alizon and Labbé-Jullié, Institut Cochin, Paris, France) or NT1-GFP cDNA (gift of Dr. Llorens-Cortes, Collège de France, Paris, France) or a mixture at a ratio 1:0.5 of CXCR4-GFP and myc-tagged β 2-arrestin cDNAs (gift of Dr. Labbé-Jullié, Institut Cochin, Paris, France) using the Lipofectamine 2000 reagents (Invitrogen) essentially according to the manufacturer's instructions and were then transferred to a dish containing a glial feeder layer cultured from newborn rat forebrain and were maintained for up to 10 days in serum-free MEM with N2 supplements. The neurons were removed from the dish containing the glia and incubated for 2 h in culture medium containing 100 nM SDF-1 or 100 nM neurotensin (NT; Neosystem) at 0, 1, 2, and 10 days in vitro (DIV). Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde, 4% sucrose in phosphate-buffered saline for 15 min at room temperature for immunofluorescence procedure.

For pharmacological blockade of CXCR4, neurons were incubated for 2 h with 100 nM SDF-1 in the presence of 10 μ M bicyclam (custom synthesized by Orgalink, Gif sur Yvette, France). For experiments involving the endocytosis inhibitor sucrose, cells were first

incubated for 15 min in culture medium containing 0.4 M sucrose followed by an incubation in 100 nM SDF-1 and 0.4 M sucrose. To test the reversibility of CXCR4 translocation, cells were first treated for 2 h with 100 nM SDF-1 and were placed in culture medium for 1, 2, 4 and 5 h.

Immunostaining

For brain slices, samples were treated with 3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min followed by 30% normal horse serum, 0.05% Triton X-100 in PBS for 30 min. They were then incubated overnight with CXCR4 goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology; catalog no. sc-6190) diluted 1:150 in PBS containing 3% normal horse serum and 0.05% Triton X-100 at 4°C. The sections were then washed for 45 min in phosphate buffer followed by incubation with biotinylated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:150 dilution) for 1 h 30 min. After three washes, sections were incubated with streptavidin-peroxidase complex at 1:200 for 1 h, rinsed, and incubated with tyramide-fluorescein solution (TSA, PerkinElmer Life Sciences; 1:50 dilution) for 5 min at room temperature. After 3 washes, slices were mounted on glass slides for microscope analysis. No signal was detected when the primary antibodies were omitted.

To further assess the specificity of CXCR4 immunolabeling, cultured neurons transfected with myc-CXCR4 cDNA were fixed in 4% paraformaldehyde, 4% sucrose in phosphate-buffered saline and permeabilized for 5 min in 0.25% Triton X-100. The cells were blocked for 30 min in 10% bovine serum albumin (BSA) in PBS and incubated for 2 h at 37°C in a mixture of a mouse monoclonal anti-myc antibody clone 9E10 (1/1000, Chemicon) and the goat anti-CXCR4 antibody diluted in PBS containing 3% BSA. Following extensive washings, cells were then incubated for 45 min at 37°C with donkey anti-mouse conjugated to Texas Red and donkey-anti-goat conjugated to FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories). For experiments involving neurons cotransfected with CXCR4-GFP and myc- β -arrestin 2, cells were incubated in a mixture of mouse monoclonal anti-myc antibody clone 9E10 (1/1000, Chemicon) and rabbit anti-MAP2 antibody (1/1000, Chemicon). Cells were then incubated in a mixture of biotin-conjugated donkey anti-mouse and Alexa Fluor 568-conjugated donkey anti-rabbit (Molecular Probes) followed by a 45-min incubation in AMCA-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories). For single labeling experiments, the primary antibodies used were a mouse monoclonal anti-MAP2 antibody clone AP20 (1/400; Sigma) and a mouse monoclonal anti-transferrin receptor clone OX26 (Bioatlantic, France) and the secondary antibody was a donkey anti-mouse conjugated to Texas Red (Jackson ImmunoResearch Laboratories). At the end of the immunostaining, coverslips were mounted on glass slides in a drop of Vectashield (Vector Laboratories) for microscope analysis.

Microscopy and quantification

Each coverslip was systematically scanned on the microscope (BX 61 Olympus) with a 25 $\times$ lens and pictures of each transfected cell was acquired with a 63 $\times$ 1.4 NA objective using a digital camera (DP 50, Olympus) driven by Analysis image-acquisition software. For each neurite, quantification of the number of receptor-GFP puncta per 100 μ m was performed using ImageJ software. To define CXCR4-GFP puncta, threshold for individual neuron was determined and corresponded to at least twofold the average intensity of fluorescence in the dendritic shaft (defines as MAP2 positive) or axon (defined as MAP2 negative). For experiments involving CXCR4-GFP, three sets of independent experiments were analyzed on two coverslips for the control and treated groups. For experiments involving NT1-GFP, two sets of independent experiments were performed. A total of 10 to 20 neurons were scored for each condition and the measurements were analyzed using Microsoft Excel and Sigma Plot. Values indicate mean $\pm$ SEM. Group comparisons were made by *t* test. Images for presentation were processed using Adobe Photoshop.

Acknowledgments

We thank C. Labbé-Jullié and M. Alizon for gift of CXCR4-GFP, myc-tagged CXCR4 and myc-tagged β -arrestin 2 cDNAs, C. Llorens-Cortes and P. Forgez for gift of the NT1-GFP cDNA. This work was supported by INSERM and by a INSERM/Région Pays de la Loire predoctoral fellowship to S.J. Baudouin.

References

- Arakawa, Y., Bito, H., Furuyashiki, T., Tsuji, T., Takemoto-Kimura, S., Kimura, K., Nozaki, K., Hashimoto, N., Narumiya, S., 2003. Control of axon elongation via an SDF-1 α /Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J. Cell Biol.* 161, 381–391.
- Bagri, A., Gurney, T., He, X., Zou, Y.R., Littman, D.R., Tessier-Lavigne, M., Pleasure, S.J., 2002. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development* 129, 4249–4260.
- Banisadr, G., Fontanges, P., Haour, F., Kitabgi, P., Rostene, W., Melik Parsadaniantz, S., 2002. Neuroanatomical distribution of CXCR4 in adult rat brain and its localization in cholinergic and dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1661–1671.
- Belmadani, A., Tran, P.B., Ren, D., Assimakopoulos, S., Grove, E.A., Miller, R.J., 2005. The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors. *J. Neurosci.* 25, 3995–4003.
- Bodner, A., Toth, P.T., Oh, S.B., Lu, M., Tran, P.B., Chin, R.K., Ren, D., Miller, R.J., 2003. CD4 dependence of gp120IIIB-CXCR4 interaction is cell-type specific. *J. Neuroimmunol.* 140, 1–12.
- Callegwaere, C., Banisadr, G., Desarmenien, M.G., Mechighel, P., Kitabgi, P., Rostene, W.H., Melik Parsadaniantz, S., 2006. The chemokine SDF-1/CXCL12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through CXCR4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8221–8226.
- Chalasani, S.H., Sabelko, K.A., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Raper, J.A., 2003. A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *J. Neurosci.* 23, 1360–1371.
- Cheng, Z.J., Zhao, J., Sun, Y., Hu, W., Wu, Y.L., Cen, B., Wu, G.X., Pei, G., 2000. β -arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between β -arrestin and CXCR4. *J. Biol. Chem.* 275, 2479–2485.
- Ding, Y., Li, M., Zhang, J., Li, N., Xia, Z., Hu, Y., Wang, S., Fan, G.H., 2006. The heat shock cognate protein 73 is a CXCR4 binding protein that regulates the receptor endocytosis and the receptor-mediated chemotaxis. *Mol. Pharmacol.* 69, 1269–1279.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., Banker, G.A., 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8, 1454–1468.
- Fan, G.H., Yang, W., Sai, J., Richmond, A., 2002. Hsc/Hsp70 interacting protein (hip) associates with CXCR2 and regulates the receptor signaling and trafficking. *J. Biol. Chem.* 277, 6590–6597.
- Faure, M.P., Alonso, A., Nouel, D., Gaudriault, G., Dennis, M., Vincent, J. P., Beaudet, A., 1995a. Somatodendritic internalization and perinuclear targeting of neurotensin in the mammalian brain. *J. Neurosci.* 15, 4140–4147.
- Faure, M.P., Nouel, D., Beaudet, A., 1995b. Axonal and dendritic transport of internalized neurotensin in rat mesostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience* 68, 519–529.
- Fournier, A.E., Nakamura, F., Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, R.G., Strittmatter, S.M., 2000. Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. *J. Cell Biol.* 149, 411–422.
- Goslin, K., Asmussen, H., Banker, G., 1998. Rat hippocampal neurons in low density culture. In: Banker, G., Goslin, K. (Eds.), *Culturing Nerve Cells*. MIT press, Cambridge, MA, pp. 339–370.
- Haberstock-Debic, H., Kim, K.A., Yu, Y.J., von Zastrow, M., 2005. Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *J. Neurosci.* 25, 7847–7857.
- Jurney, W.M., Gallo, G., Letourneau, P.C., McLoon, S.C., 2002. Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2- and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *J. Neurosci.* 22, 6019–6028.
- Keleman, K., Rajagopalan, S., Cleppien, D., Teis, D., Paiha, K., Huber, L.A., Technau, G.M., Dickson, B.J., 2002. Comm sorts robo to control axon guidance at the *Drosophila* midline. *Cell* 110, 415–427.
- Koenig, J.A., Edwardson, J.M., 1997. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 276–287.
- Le Roy, C., Wrana, J.L., 2005. Signaling and endocytosis: a team effort for cell migration. *Dev. Cell.* 9, 167–168.
- Leterrier, C., Laine, J., Darmon, M., Boudin, H., Rossier, J., Lenkei, Z., 2006. Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J. Neurosci.* 26, 3141–3153.
- Lieberam, I., Agalliu, D., Nagasawa, T., Ericson, J., Jessell, T.M., 2005. A Cxcl12-CXCR4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of mammalian motor axons. *Neuron* 47, 667–679.
- Lu, Q., Sun, E.E., Klein, R.S., Flanagan, J.G., 2001. Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* 105, 69–79.
- Lu, M., Grove, E.A., Miller, R.J., 2002. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7090–7095.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., Springer, T.A., 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9448–9453.
- Maxfield, F.R., McGraw, T.E., 2004. Endocytic recycling. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 5, 121–132.
- Nguyen, H.M., Cahill, C.M., McPherson, P.S., Beaudet, A., 2002. Receptor-mediated internalization of [3H]-neurotensin in synaptosomal preparations from rat neostriatum. *Neuropharmacology* 42, 1089–1098.
- Nouel, D., Faure, M.P., St Pierre, J.A., Alonso, R., Quirion, R., Beaudet, A., 1997. Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *J. Neurosci.* 17, 1795–1803.
- Orsini, M.J., Parent, J.L., Mundell, S.J., Benovic, J.L., Marchese, A., 1999. Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 274, 31076–31086.
- Pujol, F., Kitabgi, P., Boudin, H., 2005. The chemokine SDF-1 differentially regulates axonal elongation and branching in hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 118, 1071–1080.
- Signoret, N., Rosenkilde, M.M., Klasse, P.J., Schwartz, T.W., Malim, M.H., Hoxie, J.A., Marsh, M., 1998. Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *J. Cell Sci.* 111 (Pt. 18), 2819–2830.
- Stumm, R.K., Rummel, J., Junker, V., Culmsee, C., Pfeiffer, M., Kriegstein, J., Holtt, V., Schulz, S., 2002. A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J. Neurosci.* 22, 5865–5878.
- Stumm, R.K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Holtt, V., Schulz, S., 2003. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J. Neurosci.* 23, 5123–5130.
- Takei, K., Haucke, V., 2001. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol.* 11, 385–391.
- Venkatesan, S., Rose, J.J., Lodge, R., Murphy, P.M., Foley, J.F., 2003. Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4. *Mol. Biol. Cell* 14, 3305–3324.
- Wang, J., Guan, E., Roderiquez, G., Calvert, V., Alvarez, R., Norcross, M.A., 2001. Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent

- sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages. *J. Biol. Chem.* 276, 49236–49243.
- Williams, M.E., Wu, S.C., McKenna, W.L., Hinck, L., 2003. Surface expression of the netrin receptor UNC5H1 is regulated through a protein kinase C-interacting protein/protein kinase-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 23, 11279–11288.
- Xiang, Y., Li, Y., Zhang, Z., Cui, K., Wang, S., Yuan, X.B., Wu, C.P., Poo, M.M., Duan, S., 2002. Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nat. Neurosci.* 5, 843–848.
- Zhu, Y., Yu, T., Zhang, X.C., Nagasawa, T., Wu, J.Y., Rao, Y., 2002. Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 719–720.
- Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J., Klein, R., 2003. EphB-ephrinB bidirectional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat. Cell Biol.* 5, 869–878.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., Littman, D.R., 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595–599.

DISCUSSION
et
PERSPECTIVES

Rôle de CD3 ζ dans la formation des prolongements dendritiques

Modèle de travail

Les études menées sur la localisation et la fonction du CD3 ζ neuronal nous permettent de proposer un modèle de travail regroupant les données obtenues (figure 21). A des stades précoces de développement lors de la croissance et de la maturation dendritique, CD3 ζ est exprimé principalement dans les cônes de croissance et les filopodes dendritiques. Cette distribution est dépendante de la polymérisation d'actine et de l'activité des kinases de la famille Syk/ZAP70. Associé à ce profil d'expression, CD3 ζ présente une fonction de régulation négative de la croissance dendritique dépendante de l'intégrité de ses domaines ITAMs. A des stades tardifs du développement, lorsque les synapses sont formées, CD3 ζ est concentré au niveau de synapses excitatrices.

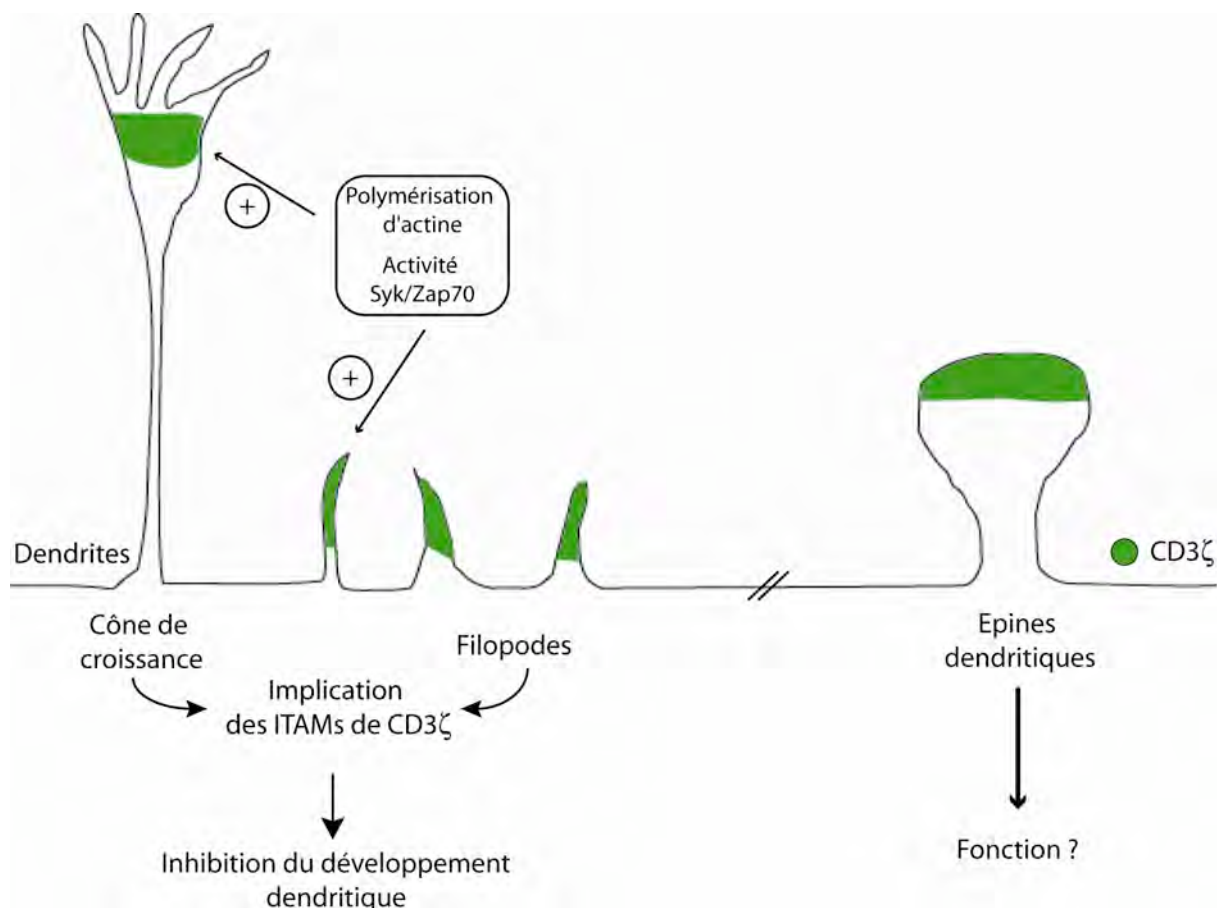


Figure 20 Modèle de travail tiré de l'étude portant sur la fonction de CD3 ζ au cours du développement neuronal

Pertinence de la fonction de CD3 ζ mise en évidence in vitro dans l'analyse du phénotype des souris CD3 ζ -/-.

Les études de Huh et coll. 2000 sur les souris CD3 ζ -/- ont montré un défaut de développement des neurones du système réticulo-géniculé avec une augmentation de la zone de projection axonale des neurones de la rétine dans le NGL. Nos travaux menés *in vitro* mettent en évidence un rôle inhibiteur de CD3 ζ sur la croissance dendritique. Une possibilité serait que dans les souris CD3 ζ -/-, l'absence du signal inhibiteur normalement procuré par CD3 ζ conduirait à la formation d'une arborisation dendritique exubérante et non restreinte au NGL. De ce fait, la zone de projection des afférences rétiniennes serait étendue hors du NGL, comme observé chez les souris CD3 ζ -/-. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser la morphologie dendritique des neurones du NGL dans les souris CD3 ζ -/-, par coloration à l'aide de la méthode de Golgi par exemple. Cette étude pourrait être étendue à d'autres structures du SNC et notamment dans l'hippocampe pour examiner si nos résultats obtenus *in vitro* se vérifient *in vivo*. Compte tenu de l'observation d'une expression de CD3 ζ dans de nombreuses régions cérébrales, associée à la majorité des neurones, on peut se demander s'il existe une action spécifique ou différentielle de CD3 ζ selon le phénotype neuronal considéré. L'analyse de la morphologie dendritique de neurones présents dans plusieurs régions cérébrales de souris CD3 ζ -/- permettrait de clarifier ce point.

Existe-t-il une action sélective de CD3 ζ sur la formation des dendrites ?

Nous avons observé une expression neuronale très précoce de CD3 ζ , seulement quelques heures après la mise en différenciation de cellules souches neurales embryonnaires. Par la suite, lors de l'acquisition de la polarisation neuronale, CD3 ζ est présent au niveau des cônes de croissance des neurites mineures, mais également au niveau du cône de croissance de l'axone en formation. Ce n'est que lorsque les dendrites débutent leur différenciation que CD3 ζ est alors majoritairement associé aux cônes de croissance dendritiques et est exclu des cônes de croissance des axones. Du fait de l'expression sélective de CD3 ζ au niveau des dendrites au moment de leur différenciation, nous avons focalisé notre étude sur l'action de CD3 ζ dans le développement dendritique. Cependant, avant l'acquisition de la polarisation neuronale nous avons observée une forte

expression de CD3 ζ au niveau des cônes de croissance des neurites et de l'axone lors de l'étape d'élongation axonale. Ceci suggère que CD3 ζ pourrait être impliqué dans les processus développementaux précédents la formation des dendrites. De ce fait, on ne peut exclure que le phénotype des souris CD3 ζ -/- soit le résultat d'une combinaison de régulations affectant l'émergence des premiers prolongements et la formation de l'axone. Sur ce point il serait intéressant d'analyser le rôle de CD3 ζ à des stades de développement neuronal antérieurs à ceux que nous avons étudiés. L'utilisation des mêmes approches que celles présentées dans cette étude au moment de l'émergence des premiers neurites (à 1 et 2 jours de culture) et lors de l'élongation axonale (à 2 et 3 jours de culture) permettrait de déterminer si CD3 ζ est également impliqué dans d'autres étapes du développement. De plus, des études conduites sur des cultures de neurones provenant de souris CD3 ζ -/- complèteraient notre approche en permettant d'examiner si CD3 ζ est impliqué sélectivement ou non dans le développement des dendrites. Comme exposé dans l'introduction de ce manuscrit, plusieurs facteurs régulant la formation des prolongements neuronaux ont bien souvent une activité qui n'est pas unique et participent à la coordination des différentes étapes développementales. Par des fonctions multiples et séquentielles au cours du développement, CD3 ζ pourrait participer à ces systèmes de coordination du développement en modulant la formation de l'axone et des dendrites.

Mécanismes liés à l'adressage sélectif de CD3 ζ dans les cônes de croissance et les filopodes

Nos études montrent que l'expression sélective de CD3 ζ dans les cônes de croissance et les filopodes est abolie par cinq minutes de traitement avec le piceatannol, un inhibiteur spécifique des protéines de la famille Syk/ZAP70 (Wong & Leong 2004). Au contraire, l'utilisation du 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (PP2) et du damnacanthal, des inhibiteurs de la protéine kinase Ick, ne provoque aucune modification de la distribution de CD3 ζ dans les dendrites. Nous en avons donc conclu que l'adressage sélectif de CD3 ζ dans les cônes de croissance et les filopodes est dépendant de l'activité de Syk/ZAP70, mais pas de celle de Ick.

Dans le système immunitaire, la kinase lck induit la phosphorylation de CD3 ζ sur les tyrosines des ITAMs. Si le rôle de lck sur CD3 ζ est conservé dans le SNC, ces résultats pourraient suggérer que le ciblage subcellulaire de CD3 ζ n'est pas dépendant de son niveau de phosphorylation. Pour les récepteurs AMPA et NMDA au contraire, la phosphorylation sur des sites particuliers constitue un signal d'adressage vers les synapses (Ehlers 2000; Wenthold et coll. 2003). L'adressage sélectif de CD3 ζ semble donc recourir à d'autres mécanismes moléculaires dans les neurones.

Cet adressage nécessite en particulier dans notre système l'activation des kinases de la famille Syk/ZAP70. Il faut signaler cependant qu'il n'existe pas d'évidence pour la conservation de Syk ou de ZAP70 dans le SNC. Dans le SI, Syk et ZAP70 sont connues pour phosphoryler d'autres kinases qui peuvent influencer sur l'organisation du cytosquelette d'actine. Une hypothèse logique est que l'inactivation de Syk/ZAP70 conduit à une désorganisation du cytosquelette d'actine menant à la dispersion de CD3 ζ hors des cônes de croissance et des filopodes. Pour tester cette hypothèse il serait intéressant d'analyser l'effet du piceatannol sur la distribution de l'actine dans les neurones pour savoir si l'inhibition de Syk/ZAP70 peut induire une désorganisation du cytosquelette d'actine.

Appuyant l'hypothèse précédente, nous avons montré que la distribution de CD3 ζ est dépendante de la polymérisation d'actine. En effet, la distribution de CD3 ζ , comme celle de l'actine, est fortement perturbée par un traitement avec la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation d'actine. Il est intéressant de souligner que suite à ce traitement, CD3 ζ reste colocalisé avec l'actine, suggérant l'existence d'une relation étroite entre CD3 ζ et l'actine. Dans le système immunitaire, la polymérisation de l'actine est aussi essentielle dans la polarisation de l'expression cellulaire de CD3 ζ (Caplan et coll. 1995; Villalba et coll. 2001; Krummel & Davis 2002; Valensin et coll. 2002). Il a été montré dans les LT que CD3 ζ peut soit interagir directement avec l'actine soit recruter et activer des protéines intermédiaires, comme ZAP70, qui induiront la polymérisation de l'actine (Kuhné et coll. 2003). Ces deux possibilités peuvent être envisagées dans les neurones.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1-4, la régulation de la dynamique d'actine est centrale dans les mécanismes de croissance. Un des

mécanismes d'action de CD3 ζ pourrait donc être de réguler la polymérisation de l'actine au cours des mécanismes de formation des prolongements neuronaux.

Mécanismes liés à l'action de CD3 ζ dans le développement neuronal

Pour répondre à la question du mécanisme lié à l'action de CD3 ζ dans l'inhibition de la croissance dendritique nous avons effectué des expériences de surexpression d'un dominant négatif de CD3 ζ dans lequel les ITAMs sont rendus non fonctionnels. Cette surexpression provoque une augmentation de la complexité de l'arborisation dendritique. A l'inverse la surexpression de la protéine intacte provoque une inhibition de la croissance des dendrites. Ces résultats suggèrent que la présence d'ITAMs fonctionnels produit un signal négatif de croissance. Une des fonctions centrales de ces ITAMs est de permettre le recrutement et l'activation de molécules de signalisation comme les kinases de la famille Syk/ZAP70 ou l'actine. Si ce même mécanisme est conservé dans le SNC, des expériences de coimmunoprécipitation à partir d'homogénat de cerveau de rat ou de culture de neurones permettraient de déterminer si une interaction entre CD3 ζ et Syk/ZAP70 d'une part et l'actine d'autre part existe également dans le SNC.

Récepteurs associés à CD3 ζ

L'équipe de Carla Shatz a montré que les souris déficientes dans l'expression du CMH I présentent le même phénotype que les souris CD3 ζ ^{-/-}, à savoir des altérations du développement et de la plasticité synaptique (Huh et coll. 2000 et chapitre 2-5). Sur la base de ces résultats et des données obtenues dans le système immunitaire, les auteurs ont proposé l'existence d'une relation fonctionnelle entre CD3 ζ et le CMH I dans laquelle le CMH I serait le ligand d'un récepteur non identifié mais associé à CD3 ζ . Dans ce cas, le CMH I serait présynaptique et CD3 ζ postsynaptique. Dans le système immunitaire, la fonction de CD3 ζ est décrite comme étant dépendante de son association à des immunorécepteurs (cf chapitre 2-2). Jusqu'à présent, le récepteur associé à CD3 ζ dans le SNC n'a pas été identifié. L'ARNm du TCR est exprimé dans le cerveau mais sous forme non mature et la protéine correspondante n'a pas été détectée dans le cerveau (Syken & Shatz 2003). L'expression des récepteurs

associés à CD3 ζ sur les cellules NK, NKp30, NKp46 et Fc γ RIII n'a quant à elle pas été analysée dans le cerveau ou sur des cellules neurales.

Il a été montré récemment une association physique entre le récepteur CXCR4 activé par SDF-1 et CD3 ζ dans les LT, mettant en évidence que CXCR4 peut être un récepteur associé à CD3 ζ (Kumar et coll. 2006). Dans les neurones nous avons observé une expression de CD3 ζ et de CXCR4 dans les cônes de croissance des neurites mineures. Lorsque l'axone apparaît et que les dendrites ne sont pas formés, CXCR4, comme CD3 ζ , est exprimé dans le cône de croissance de l'axone suggérant qu'à ce stade de développement une coopération entre CXCR4 et CD3 ζ est possible. Au contraire, au cours de la maturation dendritique, la localisation de CXCR4 et de CD3 ζ est observée dans des domaines différents puisque CD3 ζ est restreint au domaine somatodendritique alors que CXCR4 est préférentiellement exprimé dans l'axone. Si une association physique existe entre CXCR4 et CD3 ζ dans le SNC, nos données sont en faveur de l'existence d'un tel complexe à des stades précoces du développement neuronal, avant l'apparition des dendrites. Pour tester cette hypothèse il faudrait effectuer des expériences de coimmunoprécipitation suite au traitement des neurones par SDF-1 à des stades précoces du développement *in vitro* (à 3 jours en culture) pour savoir si dans ces conditions CXCR4 et CD3 ζ peuvent s'associer.

Rôle de CD3 ζ dans des fonctions synaptiques

Les souris CD3 ζ -/- adultes présentent des altérations de la plasticité synaptique glutamatergique, avec une absence de LTD et une augmentation de la LTP. Nous avons montré qu'après 21 jours de développement neuronal en culture, stade auquel les synapses sont formées, CD3 ζ est exprimé sous forme d'agrégats partiellement colocalisés avec PSD-95, un marqueur des synapses glutamatergiques excitatrices. Par contre, aucune colocalisation n'a été observée entre CD3 ζ et la GAD, un marqueur des synapses inhibitrices GABAergiques. CD3 ζ représente donc un nouveau composant des synapses glutamatergiques. De part sa fonction adaptatrice et signalétique, CD3 ζ pourrait jouer un rôle dans l'organisation et la signalisation des synapses excitatrices. L'analyse du nombre, de la taille et de la composition moléculaire de ces synapses sur des souris

CD3 ζ -/- pourrait nous permettre de déterminer la contribution de CD3 ζ dans l'organisation des synapses glutamatergiques.

Dans le SI, il existe comme nous l'avons vu, un lien fonctionnel entre CD3 ζ et le CMH I. Il a été montré que l'expression constitutive du CMH I au niveau postsynaptique dans la synapse glutamatergique est associée à une fonction de régulation de la transmission synaptique excitatrice et du nombre de densités postsynaptiques perforées (Goddard, Butts & Shatz 2007). Ces résultats montrent que le CMH I comme CD3 ζ est un composant des synapses excitatrices glutamatergiques. Il serait donc important de savoir s'il existe une coopération de CD3 ζ et du CMH I au niveau synaptique et de tester le rôle de CD3 ζ dans les fonctions synaptiques médiées par le CMH I.

Internalisation de CXCR4 dans la fonction de SDF-1 au cours de la formation des prolongements neuronaux

Notre étude conduite sur des cultures de neurones d'hippocampe de rat à différents stades de développement montre une redistribution très marquée de CXCR4 dans les dendrites, mais pas dans l'axone, suite à une stimulation par SDF-1. Cette régulation différentielle entre axone et dendrite pourrait être un mécanisme permettant un effet physiologique de SDF-1 distinct entre ces deux compartiments, notamment lors du développement.

Redistribution dendritique du récepteur CXCR4 suite à son activation

Plusieurs arguments concordent pour suggérer que la redistribution du récepteur observée dans les dendrites correspond à une internalisation et non à une redistribution des récepteurs à la surface neuronale.

- 1) Suite à l'action de l'agoniste, les agrégats de récepteurs sont colocalisés avec les endosomes marqués par le récepteur de la transferrine.
- 2) La redistribution de CXCR4 n'est plus observée lorsque SDF-1 est coincubé avec le sucrose, composé connu pour bloquer l'internalisation de protéine membranaire médiée par les puits de clathrine (Koenig & Edwardson 1997).
- 3) CXCR4 appartient à la famille des RCPGs qui sont classiquement internalisés suite à leur activation (Neel et coll. 2005).
- 4) Dans des cellules du SI, dans lesquelles la biologie cellulaire de CXCR4 a été bien caractérisée, il a été démontré que l'activation de CXCR4 par SDF-1 induit son internalisation (Haribabu et coll. 1997).

Ainsi, l'ensemble de ces arguments suggère fortement que la stimulation des neurones par SDF-1 induit une internalisation sélective de CXCR4 dans les dendrites, mais pas dans l'axone. Cependant, l'utilisation combinée en immunofluorescence d'un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire et intracellulaire du récepteur permettrait de distinguer les récepteurs membranaires de ceux localisés à l'intérieur de la cellule. Ce type d'expérience permettrait de définitivement confirmer l'existence de l'internalisation de CXCR4 dans les dendrites et de son absence dans les axones.

Notre modèle d'étude repose sur la transfection des neurones avec le récepteur CXCR4 fusionné en son extrémité N-terminale avec la GFP (CXCR4-GFP). Un problème possible provenant de cette approche est la surexpression du récepteur et la présence du groupement GFP susceptible de modifier les caractéristiques du récepteur. Il a été montré que CXCR4-GFP présente la même distribution d'expression cellulaire dans les neurones que le récepteur endogène (Pujol, Kitabgi & Boudin 2005). De plus, nous avons montré que l'application de SDF-1 sur des cellules COS-7 transfectées avec CXCR4-GFP induit une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, suggérant que CXCR4-GFP retient ses propriétés fonctionnelles. Cependant, la surexpression de CXCR4-GFP pourrait induire la différence d'internalisation observée entre les dendrites et l'axone. En effet, il est possible que l'expression en forte concentration de CXCR4-GFP dépasse la capacité de l'axone à internaliser le récepteur, alors que celle-ci ne serait pas modifiée dans les dendrites. Pour tester cette hypothèse, nous avons transfecté un autre RCPG, le récepteur de haute affinité de la neurotensine NT1-GFP, connu pour être internalisé aussi bien dans les dendrites que dans les axones (Faure, Nouel & Beaudet 1995; Nouel et coll. 1997; Nguyen et coll. 2002). Nous avons observé dans notre système que l'internalisation de NT1-GFP suite à son activation par la neurotensine a lieu de façon équivalente dans les dendrites et l'axone. Ceci suggère que l'axone possède la capacité d'internaliser efficacement un RCPG même lorsque celui-ci est surexprimé par transfection. Nous avons également testé l'hypothèse que l'absence d'internalisation de CXCR4 dans l'axone pourrait provenir d'un niveau d'expression axonale insuffisant de la β -arrestine 2. La β -arrestine 2 est une molécule adaptatrice nécessaire à l'internalisation de CXCR4. Nous avons observé que la surexpression de la β -arrestine 2 par transfection neuronale n'augmente pas le niveau d'internalisation du récepteur dans l'axone suite à l'action de SDF-1. L'ensemble de nos résultats suggère que l'absence d'internalisation de CXCR4-GFP dans les axones suite à la stimulation par SDF-1 est une propriété spécifique du CXCR4 axonal.

On peut malgré tout se demander si le récepteur endogène adopte le même comportement suite à l'action de SDF-1. Nos expériences réalisées sur des tranches de cerveau montre l'existence d'une redistribution de CXCR4 suite à la stimulation de SDF-1 au niveau des dendrites des cellules pyramidales de l'hippocampe. Cependant aucune donnée ne nous permet d'affirmer qu'il s'agit

bien là d'un phénomène d'internalisation et que celui-ci serait spécifique des dendrites et non observé dans l'axone. Pour définitivement valider nos résultats sur le récepteur endogène, les mêmes expériences devraient être réalisées sur des cultures de neurones en suivant le devenir du récepteur endogène par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-CXCR4. Au moment de cette étude, la qualité de l'immunomarquage obtenu avec les anticorps que nous avons testés ne nous permettait pas de poursuivre ce type d'étude.

Pertinence de la corrélation entre l'effet de SDF-1 sur le développement neuronal et l'internalisation de CXCR4

Nos résultats montrent une internalisation de CXCR4 dans les dendrites et pas dans l'axone suite à une stimulation par SDF-1. Au cours de la croissance, SDF-1

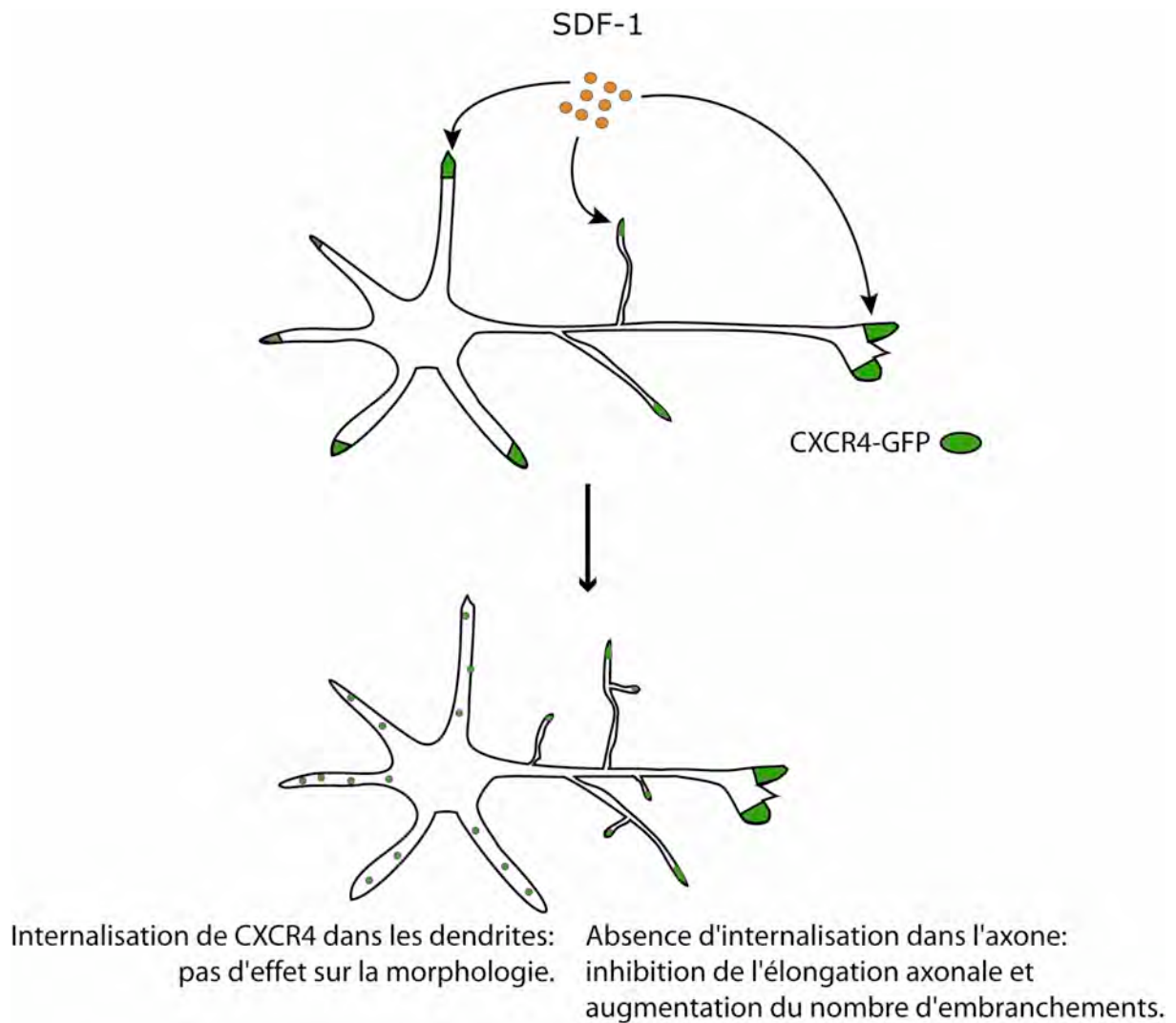


Figure 21. Modèle de travail tiré de l'étude portant sur la régulation de la fonction de SDF-1 par l'internalisation de CXCR4 au cours de la formation des prolongements neuronaux.

inhibe l'élongation axonale et n'induit aucun effet sur les autres neurites (Pujol, Kitabgi & Boudin 2005). L'internalisation des récepteurs est un mécanisme permettant d'ajuster la sensibilité neuronale à l'action du ligand. Il a été montré par exemple que l'endocytose de Robo et UNCC5H1 permet d'ajuster la sensibilité axonale à leur ligand Slit et Netrine-1 et ainsi de contrôler la répulsion axonale médiée par ces molécules de guidage (Keleman et coll. 2002; Williams et coll. 2003; Zimmer et coll. 2003). Dans le système immunitaire la fonction médiée par SDF-1 est régulée par l'internalisation de son récepteur CXCR4 (Haribabu et coll. 1997). Ces résultats suggèrent que l'effet différentiel de SDF-1 sur la formation des prolongements neuronaux pourrait être régulée par une endocytose de CXCR4 dans les dendrites qui n'a pas lieu dans l'axone (figure 21).

Jusqu'à récemment CXCR4 était considéré comme le récepteur unique de SDF-1. Or il a été montré que le récepteur CXCR7 peut aussi lier SDF-1 (Balabanian et coll. 2005). Ce récepteur a également été détecté dans le système nerveux central (Schönemeier et coll. 2008). Des études dans le système immunitaire ont montrées que CXCR7 possède des fonctions typiques des récepteurs aux chimiokines, telles qu'un chimiotactisme et une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire suite à son activation (Balabanian et coll. 2005; Burns et coll. 2006; Infantino, Moepps & Thelen 2006; Dambly-Chaudière, Cubedo & Ghysen 2007; Boldajipour et coll. 2008; Mazzinghi et coll. 2008). De plus, chez le poisson-zèbre CXCR7 participe à la migration cellulaire des cellules neurales dépendante de SDF-1 (Schönemeier et coll. 2007; Thelen & Thelen 2008). Cependant, l'abolition de l'expression de CXCR7 chez la souris, qui provoque une malformation cardiaque létale comme pour les souris CXCR4^{-/-}, n'induit pas de phénotype particulier dans le cerveau (Sierro et coll. 2007; Thelen & Thelen 2008). Un résultat récent montre que dans des cellules CXCR4⁺ HEK293, CXCR7 permet la potentialisation de la réponse de CXCR4 à une stimulation par SDF-1 (Sierro et coll. 2007). Cette donnée supplémentaire montre que CXCR7 peut être fonctionnellement associé à CXCR4 et permet de poser l'hypothèse d'une telle relation fonctionnelle au cours de la formation des prolongements dépendante de l'activité de SDF-1. Pour savoir si CXCR7 est impliqué dans la médiation des effets de SDF-1 sur la formation des prolongements il faudrait alors analyser la morphologie des neurones cultivés à partir de souris CXCR7^{-/-} suite à une

stimulation par SDF-1 et à comparer à celle de neurones issus de souris déficientes pour CXCR4 traités dans les mêmes conditions.

Les différents modes d'internalisation de CXCR4

Il existe deux voies d'internalisation de CXCR4, la première est dépendante de la liaison avec SDF-1 et induit une phosphorylation du récepteur et un adressage de la majeure partie des récepteurs vers le compartiment lysosomal pour sa dégradation. La deuxième voie est indépendante de SDF-1 et peut être médiée par l'activation de la protéine kinase C (PKC) par le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Des études structure/fonction montrent que ces deux modes d'internalisation ne sont pas dépendants des mêmes motifs intracellulaires de CXCR4. Il apparaît en particulier que les résidus sérine en position 324 et 325 jouent un rôle important dans l'internalisation dépendante de SDF-1 alors qu'ils ne jouent un rôle que mineur dans l'internalisation indépendante de SDF-1 (Orsini et coll. 1999). De plus il a été montré que seule l'endocytose induite par SDF-1 est dépendante du recrutement de l'arrestine (Orsini et coll. 1999). Il serait très intéressant d'analyser l'effet du PMA sur la distribution neuronale du récepteur CXCR4. Ces expériences permettraient de savoir si l'internalisation différentielle que nous avons observée entre dendrites et axones est spécifique de la stimulation par SDF-1 ou si elle est aussi observée après activation de la PKC. Dans le système nerveux central il a été montré que le BDNF peut induire une internalisation de CXCR4 indépendamment de sa liaison avec SDF-1 (Sanders et coll. 2000; Ahmed et coll. 2008). Le BDNF est une molécule centrale dans la régulation des mécanismes de croissance, permettant en particulier une augmentation de la croissance axonale (Inoue & Sanes 1997). Il serait donc intéressant d'analyser l'effet du BDNF sur la distribution et l'internalisation de CXCR4. Une coordination entre les effets du BDNF, activateur de la croissance axonale, et de SDF-1/CXCR4, inhibiteur de la croissance axonale, pourrait constituer un mécanisme de régulation original impliqué dans la croissance des prolongements neuronaux.

L'internalisation comme mécanisme permettant de définir différents sous-domaines neuronaux

Nous avons montré une internalisation différentielle de CXCR4 entre dendrites et axones en réponse à SDF-1. Une hypothèse émanant de ce résultat est que

l'internalisation du récepteur pourrait être un moyen de moduler différemment la sensibilité des dendrites et de l'axone vis-à-vis de SDF-1. En plus de pouvoir générer deux domaines dont la sensibilité à un ligand sera différente, l'internalisation permet aussi de définir des sous-domaines neuronaux spécifiques au cours du développement neuronal. L'action de répulsion axonale de la molécule de guidage sema3A permet d'orienter la direction de pousse du cône de croissance. En plus d'induire une répulsion du cône de croissance, sema3A va induire l'internalisation de son récepteur et de la molécule d'adhésion L1 qui sont présents sur le cône de croissance (Castellani, Falk & Rougon 2004). L1 est recyclé et réexprimé à la membrane plasmique, mais dans une zone du cône de croissance différente de celle où a eu lieu son internalisation. L1 participe alors à la stabilisation de cette zone du cône de croissance où il est réexprimé. Ce premier événement de stabilisation permet ainsi de définir la zone par laquelle le cône va ensuite croître (Kamiguchi 2003). L'endocytose de L1 apparaît donc être un mécanisme essentiel dans la définition des sous-domaines des cônes de croissance.

Au cours de la croissance neuronale, les mécanismes d'internalisation servent aussi à maintenir les compositions moléculaires différentielles entre axones et dendrites. La protéine membranaire associée aux vésicules 2 (VAMP2) et la molécule d'adhésion cellulaire neurone-glie (NgCAM) sont exprimées dans le compartiment axonal et pas dans le compartiment dendritique. Cette expression spécifique est accomplie par une endocytose sélective de VAMP2 et de NgCAM dans le domaine somato-dendritique, qui n'a pas lieu dans les axones, permettant ainsi de restreindre l'expression de ces protéines au domaine somato-dendritique (Sampo et coll. 2003; Wisco et coll. 2003).

Les mécanismes d'endocytose sont essentiels à l'établissement de la polarisation moléculaire qui sous-tend la polarisation cellulaire des neurones. Ils sont donc d'une grande importance dans les mécanismes de maintien de la polarisation lors de la formation des prolongements neuronaux.

Interaction potentielle entre CD3 ζ et CXCR4 dans le SNC

Nous avons mené les études sur CD3 ζ et CXCR4 de façon indépendante car dans le système immunitaire, ces molécules participent à des fonctions qui jusqu'ici semblaient éloignées. Au cours de ma thèse des nouvelles données ont été publiées sur une interaction entre CD3 ζ et CXCR4 dans le système immunitaire. Appliquées à nos thématiques, elles permettent aujourd'hui d'avancer des hypothèses sur des interactions fonctionnelles entre CD3 ζ et CXCR4.

Comme nous l'avons présenté dans le chapitre de discussion concernant le rôle de CD3 ζ dans la régulation négative du développement dendritique, il a été montré que la stimulation de LT par SDF-1 induit une interaction physique entre CXCR4 et CD3 ζ (Kumar et coll. 2006). Les études sur ce sujet vont un peu plus loin car elles décrivent l'existence d'une communication fonctionnelle entre ces deux molécules suite à leur association. En effet le recrutement de CD3 ζ par CXCR4 est dépendant de l'activation de la PI3K et de la polymérisation d'actine. L'activation de CD3 ζ par CXCR4 induit alors un renforcement de la voie ERK impliquée notamment dans la sécrétion de cytokines (Kumar et coll. 2006).

Dans une autre étude il a été montré que l'activation de CXCR4 provoque la phosphorylation et l'activation de lck. Cet évènement est central car il permet ensuite la phosphorylation et l'activation de CD3 ζ . CD3 ζ phosphorylé va permettre la mobilisation de la voie d'activation liée à la p56Shc via l'activation de ZAP70. Ces évènements cellulaires sont centraux dans la fonction chimiotactique des LT et non essentiels pour l'internalisation de CXCR4 (Patrussi et coll. 2007). Par les résultats de cette étude, les auteurs postulent que CXCR4 active CD3 ζ par le biais de lck plutôt que par une association directe.

Ces résultats sont importants car ils montrent qu'en plus d'une association physique avec CD3 ζ , CXCR4 emprunte la voie de signalisation intracellulaire dépendante de CD3 ζ en activant ce dernier. Ces données motivent la recherche d'une interaction potentielle entre CD3 ζ et CXCR4 au cours du développement neuronal.

Conclusion

Le développement neuronal prend une part importante dans la formation du système nerveux. Il aboutit à la formation d'un réseau neuronal où les neurones communicants entre eux permettront l'établissement des fonctions cérébrales. Ces étapes du développement sont coordonnées entre elles par de nombreuses régulations moléculaires. Un des points communs de ces systèmes moléculaires est d'organiser une communication entre le milieu extérieur et le milieu intérieur afin d'harmoniser au mieux l'intégration des neurones entre eux et dans le tissu cérébral. Dans le perfectionnement de ces systèmes de communications, le système nerveux est comparable au système immunitaire. La pertinence de cette comparaison a pris un tour nouveau avec la mise en évidence de complexes moléculaires communs entre ces deux systèmes. L'existence de la fonction de ces molécules immunitaires dans le développement neuronal pose de plus des hypothèses intéressantes pouvant expliquer la survenue de pathologies neurodéveloppementales.

Notre étude sur CD3 ζ a permis de montrer que cette molécule adaptatrice jusque là uniquement caractérisée dans le SI, était également exprimée dans le SNC et associée à la grande majorité des neurones. Nos études fonctionnelles ont mis à jour un rôle nouveau de cette molécule dans la régulation négative du développement dendritique. Le deuxième volet de notre étude sur CXCR4, un récepteur de la chimiokine SDF-1 dont le rôle est crucial dans le SI, a montré une régulation différentielle de la distribution de la protéine au cours de la formation des prolongements neuronaux. Mis en corrélation avec les résultats obtenus précédemment par notre groupe, ces résultats nous permettent de proposer un système de régulation de la fonction de SDF-1 par endocytose différentielle de son récepteur CXCR4.

Nous apportons donc par ce travail de thèse des éléments nouveaux quant au rôle et à la régulation des molécules immunitaires CD3 ζ , SDF-1 et CXCR4 au cours du développement neuronal. Ces données s'insèrent dans un contexte scientifique très actuel où des molécules immunitaires sont redécouvertes pour leur rôle dans le système nerveux. Il permet de proposer aussi, certes à plus long terme, de nouvelles pistes de recherche pour différentes pathologies du système nerveux central.

BIBLIOGRAPHIE

- Abram, C.L. & Lowell, C.A., 2007. The expanding role for ITAM-based signaling pathways in immune cells. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2007(377), re2.
- Abtahian, F. et coll., 2006. Evidence for the Requirement of ITAM Domains but Not SLP-76/Gads Interaction for Integrin Signaling in Hematopoietic Cells. *Mol. Cell. Biol.*, 26(18), 6936-6949.
- Ahmed, F. et coll., 2008. Brain-derived neurotrophic factor modulates expression of chemokine receptors in the brain. *Brain Research*, 1227, 1-11.
- Ahnert-Hilger, G. et coll., 2004. Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *Journal of Neurochemistry*, 90(1), 9-18.
- Aizawa, H. et coll., 2004. Dendrite development regulated by CREST, a calcium-regulated transcriptional activator. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5655), 197-202.
- Al-Majed, A.A. et coll., 2000. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(7), 2602-8.
- Alsina, B., Vu, T. & Cohen-Cory, S., 2001. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1093-101.
- Alvarez, S. et coll., 2005. Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein 120 induces cyclooxygenase-2 expression in neuroblastoma cells through a nuclear factor-kappaB and activating protein-1 mediated mechanism. *Journal of Neurochemistry*, 94(3), 850-61.
- Amara, A. et coll., 1999. Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23916-25.
- Arakawa, Y. et coll., 2003. Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *The Journal of Cell Biology*, 161(2), 381-91.
- Arimura, N. & Kaibuchi, K., 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(3), 194-205.
- Bagri, A. et coll., 2002. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development (Cambridge, England)*, 129(18), 4249-60.
- Bajetto, A. et coll., 2001. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 22(3), 147-84.
- Bajetto, A. et coll., 1999. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *Journal of Neurochemistry*, 73(6), 2348-57.
- Balabanian, K. et coll., 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35760-6.

- Banisadr, G. et coll., 2000. Characterization and visualization of [125I] stromal cell-derived factor-1 α binding to CXCR4 receptors in rat brain and human neuroblastoma cells. *Journal of Neuroimmunology*, 110(1-2), 151-60.
- Banisadr, G. et coll., 2002. Neuroanatomical distribution of CXCR4 in adult rat brain and its localization in cholinergic and dopaminergic neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 16(9), 1661-71.
- Baniyash, M., 2004. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nature Reviews. Immunology*, 4(9), 675-87.
- Barco, A. et coll., 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(1), 123-37.
- Barnes, A.P., Solecki, D. & Polleux, F., 2008. New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity in vivo. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(1), 44-52.
- Barker, C.F. & Billingham, R.E., 1977. Immunologically privileged sites. *Advances in Immunology*, 25, 1-54.
- Belmadani, A. et coll., 2005. The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(16), 3995-4003.
- Ben-Zvi, A. et coll., 2008. Semaphorin3A regulates axon growth independently of growth cone repulsion via modulation of TrkA signaling. *Cellular Signalling*, 20(3), 467-479.
- Bleul, C.C. et coll., 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382(6594), 829-33.
- Bodner, A. et coll., 2003. CD4 dependence of gp120IIIB-CXCR4 interaction is cell-type specific. *Journal of Neuroimmunology*, 140(1-2), 1-12.
- Boldajipour, B. et coll., 2008. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*, 132(3), 463-73.
- Borrell, V. & Marín, O., 2006. Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1284-93.
- Bouchon, A. et coll., 2001. A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(8), 1111-22.
- Boulanger, L.M., Huh, G.S. & Shatz, C.J., 2001. Neuronal plasticity and cellular immunity: shared molecular mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(5), 568-78.
- Boulanger, L.M. & Shatz, C.J., 2004. Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(7), 521-31.

- Boutet, A. et coll., 2001. Cellular expression of functional chemokine receptor CCR5 and CXCR4 in human embryonic neurons. *Neuroscience Letters*, 311(2), 105-8.
- Breunig, J.J. et coll., 2007. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20558-63.
- Brouns, M.R., Matheson, S.F. & Settleman, J., 2001. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nature Cell Biology*, 3(4), 361-7.
- Brown, A.S. et coll., 2000. Maternal exposure to respiratory infections and adult schizophrenia spectrum disorders: a prospective birth cohort study. *Schizophrenia Bulletin*, 26(2), 287-95.
- Brushart, T.M. et coll., 2005. Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration. *Experimental Neurology*, 194(1), 221-9.
- Burns, J.M. et coll., 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(9), 2201-13.
- Call, M.E. et coll., 2002. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*, 111(7), 967-79.
- Callewaere, C. et coll., 2007. Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 38(3), 355-63.
- Cameron, J.S. et coll., 2007. Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(47), 13033-41.
- Caplan, S. et coll., 1995. Cell-surface-expressed T-cell antigen-receptor zeta chain is associated with the cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), 4768-72.
- Castellani, V., Falk, J. & Rougon, G., 2004. Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 26(1), 89-100.
- Chalasani, S.H. et coll., 2003. A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(4), 1360-71.
- Chan, A.C., Desai, D.M. & Weiss, A., 1994. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annual Review of Immunology*, 12, 555-92.
- Charych, E.I. et coll., 2006. Activity-independent regulation of dendrite patterning by postsynaptic density protein PSD-95. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(40), 10164-76.
- Cheng, A.M. et coll., 1995. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature*, 378(6554), 303-6.

- Cheng, Z.J. et coll., 2000. beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2479-85.
- Corriveau, R.A., Huh, G.S. & Shatz, C.J., 1998. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron*, 21(3), 505-20.
- Cowan, C.W. et coll., 2005. Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron*, 46(2), 205-17.
- Craig, A.M. & Banker, G., 1994. Neuronal polarity. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 267-310.
- Crump, M.P. et coll., 1997. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO Journal*, 16(23), 6996-7007.
- Cullheim, S. & Thams, S., 2007. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Research Reviews*, 55(1), 89-96.
- Dambly-Chaudière, C., Cubedo, N. & Ghysen, A., 2007. Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Developmental Biology*, 7, 23.
- Daniel, D. et coll., 2005. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) expression in embryonic mouse cerebral cortex starts in the intermediate zone close to the pallial-subpallial boundary and extends progressively towards the cortical hem. *Gene Expression Patterns: GEP*, 5(3), 317-22.
- Davies, A.M., Lee, K.F. & Jaenisch, R., 1993. p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron*, 11(4), 565-74.
- De La Luz Sierra, M. et coll., 2004. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood*, 103(7), 2452-9.
- Dealwis, C. et coll., 1998. Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6941-6.
- Delgado, M.B. et coll., 2001. Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 31(3), 699-707.
- Delhaye-Bouchaud, N., 2001. [Development of the central nervous system in mammals]. *Neurophysiologie Clinique = Clinical Neurophysiology*, 31(2), 63-82.
- Dent, E.W. & Kalil, K., 2001. Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), 9757-69.

- Dent, E.W. & Gertler, F.B., 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, 40(2), 209-27.
- Dietrich, J. et coll., 1999. TCRzeta is transported to and retained in the Golgi apparatus independently of other TCR chains: implications for TCR assembly. *European Journal of Immunology*, 29(5), 1719-28.
- Dittel, B.N. et coll., 1999. Cross-antagonism of a T cell clone expressing two distinct T cell receptors. *Immunity*, 11(3), 289-98.
- D'Oro, U. et coll., 2002. Regulation of constitutive TCR internalization by the zeta-chain. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(11), 6269-78.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A. & Banker, G.A., 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(4), 1454-68.
- Dziembowska, M. et coll., 2005. A role for CXCR4 signaling in survival and migration of neural and oligodendrocyte precursors. *Glia*, 50(3), 258-69.
- Ehlers, M.D., 2000. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron*, 28(2), 511-25.
- Faure, M.P., Nouel, D. & Beaudet, A., 1995. Axonal and dendritic transport of internalized neurotensin in rat mesostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 68(2), 519-29.
- Fernandis, A.Z. et coll., 2004. Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene*, 23(1), 157-67.
- French-Constant, C. & Colognato, H., 2004. Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends in Cell Biology*, 14(12), 678-86.
- Florio, T. et coll., 2006. Chemokine stromal cell-derived factor 1alpha induces proliferation and growth hormone release in GH4C1 rat pituitary adenoma cell line through multiple intracellular signals. *Molecular Pharmacology*, 69(2), 539-46.
- Foa, L. et coll., 2001. The scaffold protein, Homer1b/c, regulates axon pathfinding in the central nervous system in vivo. *Nature Neuroscience*, 4(5), 499-506.
- Franco, R. et coll., 1994. Characterization of the GTP/GDP binding site in the murine CD3-zeta polypeptide chain. *Immunology Letters*, 43(3), 167-75.
- Furrer, M. et coll., 2003. Robo and Frazzled/DCC mediate dendritic guidance at the CNS midline. *Nature Neuroscience*, 6(3), 223-30.
- Gaudillière, B. et coll., 2004. A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron*, 41(2), 229-41.
- Glabinski, A.R. et coll., 1996. Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(11), 4363-8.
- Gleichmann, M. et coll., 2000. Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *The European Journal of Neuroscience*, 12(6), 1857-66.

- Goddard, C.A., Butts, D.A. & Shatz, C.J., 2007. Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16), 6828-33.
- Goldberg, D.J. & Burmeister, D.W., 1986. Stages in axon formation: observations of growth of Aplysia axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 103(5), 1921-31.
- Goldberg, J.L. et coll., 2002. Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron*, 33(5), 689-702.
- Graef, I.A. et coll., 2003. Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell*, 113(5), 657-70.
- Gupta, S.K. & Pillariseti, K., 1999. Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(5), 2368-72.
- Han, Y. et coll., 2001. TNF-alpha mediates SDF-1 alpha-induced NF-kappa B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(3), 425-35.
- Haribabu, B. et coll., 1997. Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28726-31.
- Håvik, B. et coll., 2007. Synaptic activity-induced global gene expression patterns in the dentate gyrus of adult behaving rats: induction of immunity-linked genes. *Neuroscience*, 148(4), 925-36.
- Heilker, R. et coll., 1996. In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *The EMBO Journal*, 15(11), 2893-9.
- Horton, A.C. & Ehlers, M.D., 2003. Neuronal polarity and trafficking. *Neuron*, 40(2), 277-95.
- Horuk, R., 2001. Chemokine receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(4), 313-35.
- Howard, J. & Hyman, A.A., 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, 422(6933), 753-8.
- Huber, A.B. et coll., 2003. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annual Review of Neuroscience*, 26, 509-63.
- Hughes, M.E. et coll., 2007. Homophilic Dscam interactions control complex dendrite morphogenesis. *Neuron*, 54(3), 417-27.
- Huh, G.S. et coll., 2000. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5499), 2155-9.
- Imitola, J. et coll., 2004. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(52), 18117-22.

- Infantino, S., Moepps, B. & Thelen, M., 2006. Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(4), 2197-207.
- Inoue, A. & Sanes, J.R., 1997. Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5317), 1428-31.
- Iwashima, M. et coll., 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5150), 1136-9.
- Jan, Y. & Jan, L.Y., 2003. The control of dendrite development. *Neuron*, 40(2), 229-42.
- Kadi, L. et coll., 2006. Differential effects of chemokines on oligodendrocyte precursor proliferation and myelin formation in vitro. *Journal of Neuroimmunology*, 174(1-2), 133-46.
- Kamiguchi, H., 2003. The mechanism of axon growth: what we have learned from the cell adhesion molecule L1. *Molecular Neurobiology*, 28(3), 219-28.
- Keith, C.H., 1990. Neurite elongation is blocked if microtubule polymerization is inhibited in PC12 cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 17(2), 95-105.
- Keleman, K. et coll., 2002. Comm sorts robo to control axon guidance at the Drosophila midline. *Cell*, 110(4), 415-27.
- Kemphues, K., 2000. PARsing embryonic polarity. *Cell*, 101(4), 345-8.
- Kielian, T., 2006. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *Journal of Neuroscience Research*, 83(5), 711-30.
- Kim, E. & Sheng, M., 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(10), 771-81.
- Kim, M.D. et coll., 2003. Isolation of Rho GTPase effector pathways during axon development. *Developmental Biology*, 262(2), 282-93.
- Klein, R.S. et coll., 2001. SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *Development (Cambridge, England)*, 128(11), 1971-81.
- Koenig, J.A. & Edwardson, J.M., 1997. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18(8), 276-87.
- Kolodziej, A. et coll., 2008. Tonic activation of CXC chemokine receptor 4 in immature granule cells supports neurogenesis in the adult dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(17), 4488-500.
- Krathwohl, M.D. & Kaiser, J.L., 2004. Chemokines promote quiescence and survival of human neural progenitor cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 22(1), 109-18.
- Kremer, K.N. et coll., 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. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(1), 360-7.

- Krummel, M.F. & Davis, M.M., 2002. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Current Opinion in Immunology*, 14(1), 66-74.
- Kucia, M. et coll., 2004. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *Journal of Molecular Histology*, 35(3), 233-45.
- Kuhné, M.R. et coll., 2003. Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(2), 860-6.
- Kukreja, P. et coll., 2005. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Research*, 65(21), 9891-8.
- Kumar, A. et coll., 2006. CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity*, 25(2), 213-24.
- Lamberth, K. & Claesson, M.H., 2001. Ligation of major histocompatibility complex class I antigens (MHC-I) prevents apoptosis induced by Fas or SAPK/JNK activation in T-lymphoma cells. *Tissue Antigens*, 58(3), 171-80.
- Lanier, L.L., 2003. Natural killer cell receptor signaling. *Current Opinion in Immunology*, 15(3), 308-14.
- Lazarini, F. et coll., 2000. Differential signalling of the chemokine receptor CXCR4 by stromal cell-derived factor 1 and the HIV glycoprotein in rat neurons and astrocytes. *The European Journal of Neuroscience*, 12(1), 117-25.
- Lee, B. et coll., 2004. Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Molecular Cancer Research: MCR*, 2(6), 327-38.
- Lee, T. et coll., 2000. Essential roles of Drosophila RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron*, 25(2), 307-16.
- Lein, P. et coll., 1995. Osteogenic protein-1 induces dendritic growth in rat sympathetic neurons. *Neuron*, 15(3), 597-605.
- Letellier, M. et coll., 2008. Normal adult climbing fiber monoinnervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking MHC class I molecules. *Developmental Neurobiology*, 68(8), 997-1006.
- Li, G. et coll., 2008. Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(5), 1085-98.
- Li, M. & Ransohoff, R.M., 2008. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Progress in Neurobiology*, 84(2), 116-31.

- Lidman, O., Olsson, T. & Piehl, F., 1999. Expression of nonclassical MHC class I (RT1-U) in certain neuronal populations of the central nervous system. *The European Journal of Neuroscience*, 11(12), 4468-72.
- Lindå, H. et coll., 1998. Expression of MHC class I and beta2-microglobulin in rat spinal motoneurons: regulatory influences by IFN-gamma and axotomy. *Experimental Neurology*, 150(2), 282-95.
- Lindå, H. et coll., 1999. Expression of MHC class I heavy chain and beta2-microglobulin in rat brainstem motoneurons and nigral dopaminergic neurons. *Journal of Neuroimmunology*, 101(1), 76-86.
- Liu, R. et coll., 2002. NGF enhances sensory axon growth induced by laminin but not by the L1 cell adhesion molecule. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 20(1), 2-12.
- Liu, Y.Z., Chrivia, J.C. & Latchman, D.S., 1998. Nerve growth factor up-regulates the transcriptional activity of CBP through activation of the p42/p44(MAPK) cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32400-7.
- López-Bendito, G. et coll., 2008. Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(7), 1613-24.
- Love, P.E. et coll., 1993. T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5123), 918-21.
- Lu, B. et coll., 1998. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(4), 601-8.
- Lu, M., Grove, E.A. & Miller, R.J., 2002. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 7090-5.
- Lu, W. et coll., 2005. Developmental expression of chemokine receptor genes in the human fetus. *Early Human Development*, 81(6), 489-96.
- Lu, J. et coll., 2007. Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron*, 55(6), 874-89.
- Luo, L. et coll., 1996. Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature*, 379(6568), 837-40.
- Luo, L. et coll., 1994. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes & Development*, 8(15), 1787-802.
- Ma, Q. et coll., 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9448-53.
- Ma, Y. et coll., 2006. Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 175(2), 209-15.

- Mahadeo, D. et coll., 1994. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6884-91.
- Mallavarapu, A. & Mitchison, T., 1999. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *The Journal of Cell Biology*, 146(5), 1097-106.
- Marsh, L. & Letourneau, P.C., 1984. Growth of neurites without filopodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin B. *The Journal of Cell Biology*, 99(6), 2041-7.
- Martinez, M.C. et coll., 2003. Dual regulation of neuronal morphogenesis by a delta-catenin-cortactin complex and Rho. *The Journal of Cell Biology*, 162(1), 99-111.
- Matthews, B.J. et coll., 2007. Dendrite self-avoidance is controlled by Dscam. *Cell*, 129(3), 593-604.
- Maysami, S. et coll., 2006. Modulation of rat oligodendrocyte precursor cells by the chemokine CXCL12. *Neuroreport*, 17(11), 1187-90.
- Mazzeinghi, B. et coll., 2008. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(2), 479-90.
- Medawar, P.B., 1948. Tests by tissue culture methods on the nature of immunity to transplanted skin. *The Quarterly Journal of Microscopical Science*, 89(Pt 3), 239-52.
- Meyer-Franke, A. et coll., 1998. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron*, 21(4), 681-93.
- Minami, Y. et coll., 1987. Building a multichain receptor: synthesis, degradation, and assembly of the T-cell antigen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(9), 2688-92.
- Mócsai, A. et coll., 2006. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nature Immunology*, 7(12), 1326-33.
- Moretta, A. et coll., 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*, 19, 197-223.
- Nakamura, K. et coll., 2007. CD3 and immunoglobulin G Fc receptor regulate cerebellar functions. *Molecular and Cellular Biology*, 27(14), 5128-34.
- Nakayama, A.Y., Harms, M.B. & Luo, L., 2000. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(14), 5329-38.
- Neumann, H. et coll., 1995. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5223), 549-52.
- Neumann, H. et coll., 1997. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation

- by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(2), 305-16.
- Newpher, T.M. & Ehlers, M.D., 2008. Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron*, 58(4), 472-97.
- Ng, J. et coll., 2002. Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature*, 416(6879), 442-7.
- Nguyen, H.M.K. et coll., 2002. Receptor-mediated internalization of [3H]-neurotensin in synaptosomal preparations from rat neostriatum. *Neuropharmacology*, 42(8), 1089-98.
- Nguyen Ba-Charvet, K.T. et coll., 1999. Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron*, 22(3), 463-73.
- Nishiyori, A. et coll., 2004. Aberrant transcription of unrearranged T-cell receptor beta gene in mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 469(2), 214-26.
- Nouel, D. et coll., 1997. Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(5), 1795-803.
- Oberlin, E. et coll., 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382(6594), 833-5.
- Odemis, V. et coll., 2005. Mice deficient in the chemokine receptor CXCR4 exhibit impaired limb innervation and myogenesis. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 30(4), 494-505.
- Ohshima, Y. et coll., 2008. Regulation of axonal elongation and pathfinding from the entorhinal cortex to the dentate gyrus in the hippocampus by the chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(33), 8344-53.
- Ohtani, Y. et coll., 1998. Expression of stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor mRNAs in cultured rat glial and neuronal cells. *Neuroscience Letters*, 249(2-3), 163-6.
- O'Keeffe, G.W. et coll., 2008. NGF-promoted axon growth and target innervation requires GITRL-GITR signaling. *Nature Neuroscience*, 11(2), 135-42.
- Oliveira, A.L.R. et coll., 2004. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(51), 17843-8.
- Orsini, M.J. et coll., 1999. Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 31076-86.
- Paccani, S.R. et coll., 2005. Defective Vav expression and impaired F-actin reorganization in a subset of patients with common variable immunodeficiency characterized by T-cell defects. *Blood*, 106(2), 626-34.
- Park, M. et coll., 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5692), 1972-5.

- Patrussi, L. et coll., 2007. p52Shc is required for CXCR4-dependent signaling and chemotaxis in T cells. *Blood*, 110(6), 1730-8.
- Peacock, J.W. & Jirik, F.R., 1999. TCR activation inhibits chemotaxis toward stromal cell-derived factor-1: evidence for reciprocal regulation between CXCR4 and the TCR. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(1), 215-23.
- Peng, H. et coll., 2004. Stromal cell-derived factor 1-mediated CXCR4 signaling in rat and human cortical neural progenitor cells. *Journal of Neuroscience Research*, 76(1), 35-50.
- Penzes, P. et coll., 2001. The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, 29(1), 229-42.
- Pillarisetti, K. & Gupta, S.K., 2001. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation*, 25(5), 293-300.
- Pilpel, Y. & Segal, M., 2004. Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *The European Journal of Neuroscience*, 19(12), 3151-64.
- Pitcher, L.A. & van Oers, N.S.C., 2003. T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends in Immunology*, 24(10), 554-60.
- Pogge von Strandmann, E. et coll., 2007. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the Nkp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*, 27(6), 965-74.
- Polleux, F. et coll., 1998. Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5395), 1904-6.
- Polleux, F., Morrow, T. & Ghosh, A., 2000. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature*, 404(6778), 567-73.
- Proepper, C. et coll., 2007. Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. *The EMBO Journal*, 26(5), 1397-409.
- Proudfoot, A.E.I., 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature Reviews. Immunology*, 2(2), 106-15.
- Pujol, F., Kitabgi, P. & Boudin, H., 2005. The chemokine SDF-1 differentially regulates axonal elongation and branching in hippocampal neurons. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 5), 1071-80.
- Quitsch, A. et coll., 2005. Postsynaptic shank antagonizes dendrite branching induced by the leucine-rich repeat protein Densin-180. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(2), 479-87.
- Ransohoff, R.M. & Tani, M., 1998. Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation? *Trends in Neurosciences*, 21(4), 154-9.
- Redmond, L. et coll., 2000. Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nature Neuroscience*, 3(1), 30-40.

- Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1473), 1545-64.
- Reiss, K. et coll., 2002. Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience*, 115(1), 295-305.
- Ridley, A.J., 2001. Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(5), 303-10.
- Rimland, J. et coll., 1991. Sequence and expression of a neuropeptide Y receptor cDNA. *Molecular Pharmacology*, 40(6), 869-75.
- Rölleke, U. et coll., 2006. Differential expression of major histocompatibility complex class I molecules in the brain of a New World monkey, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Journal of Neuroimmunology*, 176(1-2), 39-50.
- Rolls, A. et coll., 2007. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nature Cell Biology*, 9(9), 1081-8.
- Rossi, D. & Zlotnik, A., 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology*, 18, 217-42.
- Roumier, A. et coll., 2004. Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(50), 11421-8.
- Rozdzial, M.M., Malissen, B. & Finkel, T.H., 1995. Tyrosine-phosphorylated T cell receptor zeta chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity*, 3(5), 623-33.
- Ruchhoeft, M.L. et coll., 1999. The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(19), 8454-63.
- Sadir, R. et coll., 2004. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43854-60.
- Sampo, B. et coll., 2003. Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron*, 37(4), 611-24.
- Schaefer, A.W., Kabir, N. & Forscher, P., 2002. Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *The Journal of Cell Biology*, 158(1), 139-52.
- Scheiffele, P., 2003. Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annual review of neuroscience*, 26, 485-508.
- Schmid, R.S., Pruitt, W.M. & Maness, P.F., 2000. A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), 4177-88.

- Schmid, R.S. et coll., 2004. Adhesion molecule L1 stimulates neuronal migration through Vav2-Pak1 signaling. *Neuroreport*, 15(18), 2791-4.
- Schönemeier, B. et coll., 2008. Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 510(2), 207-20.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S. & Rakic, P., 1999. Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440), 741-6.
- Shinkai, Y. et coll., 1993. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5096), 822-5.
- Shirozu, M. et coll., 1995. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, 28(3), 495-500.
- Shores, E.W., Van Ewijk, W. & Singer, A., 1994. Maturation of medullary thymic epithelium requires thymocytes expressing fully assembled CD3-TCR complexes. *International Immunology*, 6(9), 1393-402.
- Sierro, F. et coll., 2007. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), 14759-64.
- Skrzydelski, D. et coll., 2007. The chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 activates the nigrostriatal dopamine system. *Journal of Neurochemistry*, 102(4), 1175-83.
- Soba, P. et coll., 2007. Drosophila sensory neurons require Dscam for dendritic self-avoidance and proper dendritic field organization. *Neuron*, 54(3), 403-16.
- Sourial-Bassillious, N. et coll., 2006. Effect of TNF-alpha on CD3-zeta and MHC-I in postnatal rat hippocampus. *Pediatric Research*, 60(4), 377-81.
- Springael, J., Urizar, E. & Parmentier, M., 2005. Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(6), 611-23.
- Stanners, J. et coll., 1995. Interaction between G proteins and tyrosine kinases upon T cell receptor.CD3-mediated signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(51), 30635-42.
- Stefanová, I. et coll., 2003. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nature Immunology*, 4(3), 248-54.
- Steinberg, M. et coll., 2004. T-cell receptor-induced phosphorylation of the zeta chain is efficiently promoted by ZAP-70 but not Syk. *Blood*, 104(3), 760-7.
- Stevens, B. et coll., 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, 131(6), 1164-78.
- Stumm, R.K. et coll., 2003. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(12), 5123-30.

- Supèr, H. et coll., 2000. Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 10(6), 602-13.
- Sussman, J.J. et coll., 1988. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell*, 52(1), 85-95.
- Streit, W.J., Graeber, M.B. & Kreutzberg, G.W., 1989a. Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Experimental Neurology*, 105(2), 115-26.
- Streit, W.J., Graeber, M.B. & Kreutzberg, G.W., 1989b. Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*, 21(2-3), 117-23.
- Stubbs, E.G., Ash, E. & Williams, C.P., 1984. Autism and congenital cytomegalovirus. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 14(2), 183-9.
- Suter, D.M., Schaefer, A.W. & Forscher, P., 2004. Microtubule dynamics are necessary for SRC family kinase-dependent growth cone steering. *Current Biology: CB*, 14(13), 1194-9.
- Syken, J. & Shatz, C.J., 2003. Expression of T cell receptor beta locus in central nervous system neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), 13048-53.
- Takahashi, K., Rochford, C.D.P. & Neumann, H., 2005. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(4), 647-57.
- Takegahara, N. et coll., 2006. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nature Cell Biology*, 8(6), 615-22.
- Tanabe, S. et coll., 1997. Murine astrocytes express a functional chemokine receptor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(17), 6522-8.
- Tanaka, M. et coll., 2006. Homer proteins control neuronal differentiation through IP(3) receptor signaling. *FEBS Letters*, 580(26), 6145-50.
- Tarasova, N.I., Stauber, R.H. & Michejda, C.J., 1998. Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 15883-6.
- Tham, T.N. et coll., 2001. Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *The European Journal of Neuroscience*, 13(5), 845-56.
- Thams, S., Oliveira, A. & Cullheim, S., 2008. MHC class I expression and synaptic plasticity after nerve lesion. *Brain Research Reviews*, 57(1), 265-9.
- Thelen, M. & Thelen, S., 2008. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *Journal of Neuroimmunology*, 198(1-2), 9-13.
- Thored, P. et coll., 2006. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(3), 739-47.

- Togashi, H., Schmidt, E.F. & Strittmatter, S.M., 2006. RanBPM contributes to Semaphorin3A signaling through plexin-A receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(18), 4961-9.
- Tran, P.B. et coll., 2007. Chemokine receptor expression by neural progenitor cells in neurogenic regions of mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 500(6), 1007-33.
- Tran, P.B., Ren, D. & Miller, R.J., 2005. The HIV-1 coat protein gp120 regulates CXCR4-mediated signaling in neural progenitor cells. *Journal of Neuroimmunology*, 160(1-2), 68-76.
- Tran, P.B. et coll., 2004. Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells. *Journal of Neuroscience Research*, 76(1), 20-34.
- Valensin, S. et coll., 2002. F-actin dynamics control segregation of the TCR signaling cascade to clustered lipid rafts. *European Journal of Immunology*, 32(2), 435-46.
- Valentin, G., Haas, P. & Gilmour, D., 2007. The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Current Biology: CB*, 17(12), 1026-31.
- Valenzuela-Fernández, A. et coll., 2002. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 15677-89.
- Vessey, J.P. & Karra, D., 2007. More than just synaptic building blocks: scaffolding proteins of the post-synaptic density regulate dendritic patterning. *Journal of Neurochemistry*, 102(2), 324-32.
- Villalba, S. et coll., 2003. Serum inactivation contributes to the failure of stromal-derived factor-1 to block HIV-I infection in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(5), 880-8.
- Vilz, T.O. et coll., 2005. The SDF-1/CXCR4 pathway and the development of the cerebellar system. *The European Journal of Neuroscience*, 22(8), 1831-9.
- Wahl, S. et coll., 2000. Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *The Journal of Cell Biology*, 149(2), 263-70.
- Waites, C.L., Craig, A.M. & Garner, C.C., 2005. Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 251-74.
- Wakselman, S. et coll., 2008. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(32), 8138-43.
- Wang, J. et coll., 2002. Drosophila Dscam is required for divergent segregation of sister branches and suppresses ectopic bifurcation of axons. *Neuron*, 33(4), 559-71.
- Wang, Z. et coll., 2008. Activation of CXCR4 triggers ubiquitination and down-regulation of major histocompatibility complex class I (MHC-I) on epithelioid carcinoma HeLa cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 3951-9.

- Weissman, A.M., Samelson, L.E. & Klausner, R.D., A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex. *Nature*, 324(6096), 480-2.
- Wenthold, R.J. et coll., 2003. Trafficking of NMDA receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43, 335-58.
- Whitford, K.L. et coll., 2002. Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron*, 33(1), 47-61.
- Williams, M.E. et coll., 2003. Surface expression of the netrin receptor UNC5H1 is regulated through a protein kinase C-interacting protein/protein kinase-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(36), 11279-88.
- Wisco, D. et coll., 2003. Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *The Journal of Cell Biology*, 162(7), 1317-28.
- Wodarz, A., 2002. Establishing cell polarity in development. *Nature Cell Biology*, 4(2), E39-44.
- Xiang, Y. et coll., 2002. Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nature Neuroscience*, 5(9), 843-8.
- Yamada, K.M., Spooner, B.S. & Wessells, N.K., 1970. Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 66(4), 1206-12.
- Ye, B. & Jan, Y.N., 2006. Visualizing the breaking of symmetry. *Developmental Cell*, 10(4), 411-2.
- Yoshida, M. et coll., 2006. Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development (Cambridge, England)*, 133(3), 537-45.
- Zhou, F., Waterman-Storer, C.M. & Cohan, C.S., 2002. Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *The Journal of Cell Biology*, 157(5), 839-49.
- Zhou, J. et coll., 1998. Inhibition of TCR/CD3-mediated signaling by a mutant of the hematopoietically expressed G16 GTP-binding protein. *European Journal of Immunology*, 28(5), 1645-55.
- Zhu, Y. et coll., 2002. Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nature Neuroscience*, 5(8), 719-20.
- Zimmer, M. et coll., 2003. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nature Cell Biology*, 5(10), 869-78.
- Zipursky, S.L., Wojtowicz, W.M. & Hattori, D., 2006. Got diversity? Wiring the fly brain with Dscam. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(10), 581-8.
- Zohar, O. et coll., 2008. Cutting edge: MHC class I-Ly49 interaction regulates neuronal function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(10), 6447-51.
- Zou, Y.R. et coll., 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393(6685), 595-9.

"Le développement neuronal : rôle de la protéine adaptatrice CD3 ζ et mécanisme régulant la fonction du récepteur de chimiokine CXCR4."

Le développement neuronal est assuré par un ensemble de mécanismes complexes permettant à terme la formation d'un réseau fonctionnel. Des données récentes montrent que des molécules bien décrites dans le système immunitaire ont également un rôle non immun dans des étapes fondamentales du développement cérébral. C'est dans ce contexte que nous avons étudié la molécule adaptatrice CD3 ζ et le récepteur de chimiokine CXCR4.

A des stades précoces de développement de neurones en culture, nous avons montré que CD3 ζ est sélectivement associé aux cônes de croissance et aux filopodes. Des approches combinées de perte et de gain de fonction ont montré un rôle inhibiteur de CD3 ζ dans la régulation du développement dendritique. Nos résultats suggèrent une nouvelle fonction de CD3 ζ dans le contrôle de la morphogénèse dendritique.

La chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4 ont un rôle crucial dans plusieurs aspects du développement neuronal. Au cours de la formation des prolongements neuronaux, il a été montré que SDF-1 régule spécifiquement la formation de l'axone sans affecter les autres neurites. Nous avons montré que la stimulation du récepteur CXCR4 par son ligand SDF-1 induit l'internalisation du récepteur dans les dendrites mais pas dans l'axone. Ce résultat suggère que l'absence d'internalisation de CXCR4 dans le domaine axonal pourrait être un mécanisme permettant une action sélective de SDF-1 sur la pousse axonale.

Nos résultats révèlent un rôle inédit de CD3 ζ dans le développement neuronal et un mécanisme de régulation original de CXCR4 pouvant favoriser l'action sélective de SDF-1 sur les axones.

Mots clés: CD3 ζ , CXCR4, SDF-1, chimiokine, dendrite, axone, croissance, internalisation.

"Neuronal development: role of the adaptor protein CD3zeta and mechanism regulating CXCR4 receptor function."

Neuronal development is achieved by a complex set of mechanisms leading ultimately to the formation of a functional network. Recent data show that well-known molecules of the immune system also have non immune functions in critical stages of cerebral development. In this context, we studied the adaptor molecule CD3 ζ and the chemokine receptor CXCR4.

At early stages of neuronal development in culture, we have shown that CD3 ζ is selectively associated with growth cones and filopodia. A combination of loss- and gain-of-function experiments in cultured neurons showed an inhibitory function of CD3 ζ in dendrite development. These findings reveal a novel role of CD3 ζ in the control of dendrite morphogenesis.

The chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 have a critical role in many aspects of neuronal development. During the formation of neuronal processes, it has been shown that SDF-1 selectively regulates axonal patterning and does not affect the other neurites. We found that the stimulation of CXCR4 by SDF-1 induces receptor internalization in the somatodendritic domain but not in axons. This result suggests that the lack of CXCR4 internalization in axons might be a mechanism used to allow a selective action of SDF-1 in axonal growth.

Our results reveal a novel role of CD3 ζ in neuronal development and an original regulatory mechanism for CXCR4 that could promote a selective action of SDF-1 on axons.

Keywords: CD3 ζ , CXCR4, SDF-1, chemokine, axon, dendrite, growth, internalization.

BAUDOUIN Stéphane
30, bd Jean Monnet
44093 Nantes Cedex 1