Régulation de la traduction des ARNm dendritiques par des ribonucléoprotéines et rôle de CHMP2B dans la morphogenèse des épines dendritiques.

Agnès Belly

▶ **To cite this version:**

Agnès Belly. Régulation de la traduction des ARNm dendritiques par des ribonucléoprotéines et rôle de CHMP2B dans la morphogenèse des épines dendritiques.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00482920

HAL Id: tel-00482920

https://theses.hal.science/tel-00482920

Submitted on 11 May 2010

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES TECHNOLOGIE MEDECINE

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

Discipline : Neurosciences et Neurobiologie

École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Soutenue publiquement par **Agnès BELLY le 30 octobre 2009**

RÉGULATION DE LA TRADUCTION DES ARNM DENDRITIQUES PAR DES RIBONUCLÉOPROTÉINES ET RÔLE DE CHMP2B DANS LA MORPHOGENÈSE DES ÉPINES DENDRITIQUES

Membres du Jury :

Pr. Winfried WEISSENHORN (Président du Jury)

Pr. Dominique MULLER (Rapporteur)

Dr. Laurent FAGNI (Rapporteur)

Dr. Yves GOLDBERG (Examinateur)

Thèse préparée

sous la direction d'**Yves GOLDBERG**,

au sein du laboratoire **Neurodégénérescence et Plasticité**

Grenoble Institut des Neurosciences, U836 INSERM / UJF

directeur d'équipe **Pr. Rémy SADOUL**

et financée par l'**Association France Alzheimer**.

ASSOCIATION FRANCE ALZHEIMER
www.francealzheimer.org
Reconnue d'utilité publique
Un malade, c'est toute une famille qui a besoin d'aide

Ces quatre années de travail ont été financées par l'Association France Alzheimer. Je tiens à les remercier pour leur confiance sans laquelle ce projet n'aurait pu voir le jour. J'ai réalisé ma thèse au sein du laboratoire du Pr. Sadoul. Merci Rémy de m'avoir ouvert les portes du couloir, puis celles de l'Institut. Désolée pour toutes ces larmes, et merci pour toutes celles qui étaient de rire !

Yves, mon cher directeur de thèse, tu n'as pas ton pareil pour remonter le moral ! Merci d'avoir valorisé mon travail, tu as toujours su le faire au bon moment. Je suis heureuse d'avoir tant appris à tes côtés.

Christine, Béatrice, vous m'avez apporté bien plus que des savoir-faire et de précieux conseils. Je suis heureuse d'avoir passé ces quatres années en votre compagnie.

Ma chère Gaëlle, nous avons randonné sur le dur chemin de la thèse ensemble et j'en suis heureuse. Chacune à notre tour, nous nous sommes soutenues. Merci d'avoir accepté de faire partie de ma bulle, pour tous les bons moments que nous avons passés sur l'escalier. Les lundis après-midi seront désormais bien vides, mais moins ensanglantés ! Gillou, merci de m'avoir appris à voir les choses autrement, merci pour ta bonne humeur et ta générosité de cœur. Mathilde, ta joie de vivre et ton entrain sont un vrai bonheur. Je suis heureuse de te laisser mes bébés, je sais qu'ils sont entre de bonnes mains ! Et n'oublie pas : haut les cœurs !

Sandrine, Fiona, Anne, Chantal, Sakina, Amélie, David, les anciennes thésardes et les nouveaux, merci aussi pour tous les bons moments partagés, entre autres autour d'un café.

Vous allez tous me manquer !

Enfin, un immense merci à ma Famille pour son soutien inconditionnel et son amour.

INTRODUCTION 4

1. Le rôle de la morphologie des épines dendritiques dans l'activité neuronale : implication dans les maladies neurodégénératives 4

1.1. Structure et fonction des épines dendritiques 4

1.2. Plasticité synaptique 9

1.2.1. Potentialisation et Dépression à long terme 9

1.2.2. LTP/LTD et morphologie des épines dendritiques 13

1.3. Formation et maintien des épines dendritiques : Rôle des épines dendritiques dans la plasticité synaptique 14

1.3.1. Filopodes précurseurs développementaux des épines dendritiques 14

1.3.2. Maintien des épines dendritiques *in vivo* 15

1.3.3. Bases moléculaires de la morphologie des épines dendritiques 16

1.3.3.1. L'actine 16

1.3.3.2. Transport des ARN messagers et synthèse protéique locale 17

1.3.3.3. Les endosomes 22

1.3.3.4. Les protéines de la densité postsynaptique 22

1.3.3.5. Autres acteurs moléculaires 23

1.4. Pathologie des épines dendritiques 25

2. Le rôle de la voie endolysosomiale dans la fonction neuronale : implication dans les maladies neurodégénératives 28

2.1. Organisation et fonctions de la voie endolysosomiale 28

2.1.1. Rôle de la voie endolysosomiale dans la fonction neuronale 32

2.1.2. Les complexes ESCRT, agents du tri endolysosomial 34

2.1.3. Les protéines de la famille CHMP 38

2.1.4. Formation des vésicules intraluminales des MVB 42

2.2. Dysfonctionnements de la voie endolysosomiale : implication dans des maladies neurologiques 45

2.2.1. CHMP2B et Démence FrontoTemporale 47

2.2.2. CHMP2B et autophagie 51

3. But de l'étude 54

MATERIEL ET METHODES 56

1. Clonage 56

1.1. Reconstitution de la forme de type sauvage CHMP2B^{wt} et construction du mutant CHMP2B^{intron5} 56

1.2. Construction du mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$ 57

1.3. Construction des CHMP2B-shRNA 59

2. Culture cellulaire 60
2.1. Lignée BHK-21 60
2.2. Culture primaire de neurones d'hippocampe de rat 60

3. Transfection 62
3.1. Tansfection des cellules BHK-21 62
3.2. Transfection des neurones 63

4. Immunocytofluorescence 64

5. Western blot et immunodétection 64

6. Anticorps 66
6.1. Anticorps primaires 66
6.2. Anticorps secondaires 66

7. Microscopie électronique 66

8. Microscopie photonique confocale 67
8.1. Acquisitions 67
8.2. Analyse d'images 68

RÉSULTATS 69

1. Article 1 : Specific interaction between Sam68 and neuronal mRNAs : implication for the activity-dependent biosynthesis of elongation factor eEF1A. 69

2. Article 2 : Delocalization of the multifunctional RNA splicing factor TLS/FUS in hippocampal neurons : exclusion from the nucleus and accumulation in dendritic granules and spine heads. 88

3. Article 3 : Impaired dendritic spine maturation induced by dominant negative activity of CHMP2B mutants linked to Fronto-temporal dementia 98
3.1. Constructions des mutants de CHMP2B étiquetés 99
3.2. Expression de CHMP2B^{wt} et CHMP2B^{intron5} dans la lignée cellulaire BHK 99
3.3. Expression endogène de CHMP2B dans des cerveaux de souris 100
3.4. Expression de CHMP2B et de ses mutants dans des neurones d'hippocampe de rat en culture 101
3.4.1. Effet de CHMP2B et de ses mutants sur la mort neuronale 101
3.4.2. Profil d'expression de CHMP2B et de ses mutants dans des neurones d'hippocampe de rat en culture 103
3.5. Effets des mutants de CHMP2B sur la morphogenèse des épines dendritiques 103
3.6. Effet de CHMP2B^{intron5} sur l'expression de surface de la sous-unité GluR2 105

3.7. Conséquences physiologiques de l'expression des mutants de CHMP2B 106
3.8. Rôle de CHMP2B endogène dans la morphogenèse des épines dendritiques 107

DISCUSSION 148

1. Le facteur d'épissage Sam68 est associé à l'ARNm du facteur d'élongation de la traduction eEF1A 149

2. Le facteur d'épissage TLS est localisé dans les dendrites des neurones 152

3. Les mutants de CHMP2B associés à une démence frontotemporale empêchent la maturation des épines dendritiques 154

3.1. Formation de polymères de CHMP2B dans les neurones 158
3.2. Implication de CHMP2B dans le recyclage de protéines membranaires 161
3.3. Implication de CHMP2B dans la dynamique des mitochondries 161
3.4. Les complexes ESCRT impliqués dans la régulation du transport et de la traduction locale d'ARNm dans les neurones ? 162

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 164

Introduction

1. Le rôle de la morphologie des épines dendritiques dans l'activité neuronale : implication dans les maladies neurodégénératives

1.1. Structure et fonction des épines dendritiques

En 1888, l'espagnol Ramo'n y Cajal décrivait à la surface des dendrites des cellules de Purkinje de poule, de petites protubérances, qu'il nomma rapidement « espinas » : épines (Cajal., 1888) (figure 1).

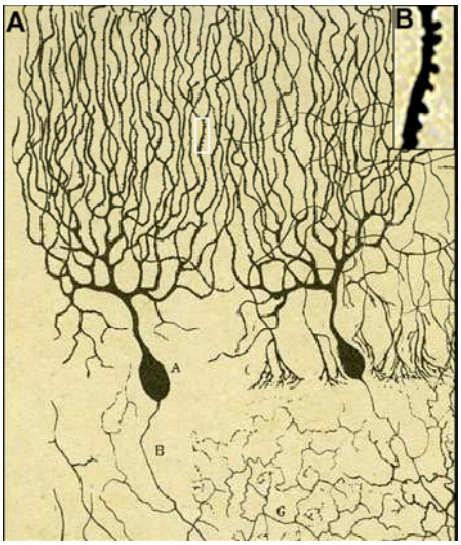


Figure 1 : A. Premier dessin de Ramo´n y Cajal montrant les épines dendritiques d'une cellule Purkinje d'une poule, colorée par la méthode de Golgi (Cajal., 1888); B. Insert : dendrite et épines dendritiques. D'après (Garcia-Lopez et al., 2007).

Selon lui les épines dendritiques augmentent la surface de l'arborisation dendritique afin de définir une plus grande surface réceptrice et d'établir des contacts plus intimes avec les arborisations axonales terminales. Il émet aussi l'idée que les connexions entre les neurones peuvent être influencées par l'hérédité et l'expérience. Ses contemporains, les Belges Demoor et Stefanowska, apportent les premières preuves que les épines dendritiques changent

de forme et de taille pendant la vie et que ces changements ont un impact sur les connexions neuronales (Demoor, 1896; Stefanowska, 1897) cités par (Garcia-Lopez et al., 2007). Sherrington apporte quant à lui le concept de synapse (Foster and Sherrington, 1897) cités par (Garcia-Lopez et al., 2007). Malgré le fait que Cajal fût équipé de la meilleure optique de ce temps, microscope Zeiss E1.30 avec un objectif apochromatique, les chercheurs d'alors, limités par les techniques dont ils disposaient, ne pouvaient vérifier ces théories. Ce n'est que vers la fin des années 1950, que la microscopie électronique révéla la structure des épines dendritiques et lia les synapses aux épines (Gray, 1959).

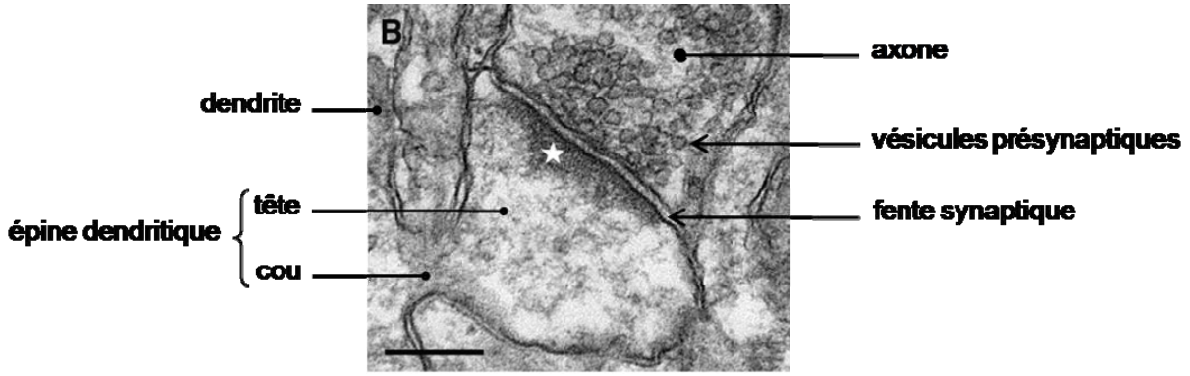


Figure 2 : Morphologie d'une synapse sur une épine d'une dendrite du stratum radiatum (hippocampe de rat). Noter la densité postsynaptique compacte (étoile). Échelle 200 nm. D'après (Rostaing et al., 2006).

L'épine dendritique, comme son nom l'indique est une protubérance émise par la dendrite. Elle possède une tête et un cou (figure 2). Face aux épines, sont apposées les parties présynaptiques axonales contenant les vésicules chargées de neurotransmetteur. L'épine dendritique constitue la partie postsynaptique. Entre ces deux structures : la fente synaptique de 10 à 20 nm de large. L'ensemble constitue la synapse axospineuse, laquelle a une fonction excitatrice.

Dans le système nerveux central adulte, la majorité des synapses excitatrices sont portées par les épines dendritiques, et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Sous l'effet d'un potentiel d'action, des canaux calciques dépendant du voltage s'ouvrent, laissant entrer du calcium dans la terminaison axonale. Ce calcium permet la fusion des vésicules présynaptiques avec la membrane, libérant ainsi du glutamate dans la fente synaptique. Celui-ci se fixe sur ses récepteurs ancrés du côté postsynaptique. Plusieurs types de récepteurs au glutamate coexistent, les récepteurs ionotropiques, différenciés par leurs ligands pharmacologiques, AMPA (α-amino -3-hydroxy -5-méthyl -4-acide isoxazolepropionique),

NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ou kaïnate ; et les récepteurs métabotropiques (mGluR, metabotropic glutamate receptors).

Sous la membrane de chaque épine, opposé à la zone présynaptique active, apparaît un épaississement dense aux électrons appelée la densité postsynaptique (PSD, Post Synaptic Density) (cf. figure 2, étoile). La PSD est une caractéristique de la synapse glutamatergique (asymétrique). Les synapses inhibitrices (symétriques), n'ont pas d'épaississement postsynaptique (Colonnier, 1968). Cette « densité » est un complexe protéique macromoléculaire dont l'architecture est principalement assurée par PSD95 (PostSynaptic Density protein of 95 KDa) (Sampedro et al., 1981; Chen et al., 2005a; Chen et al., 2008a) mais aussi par Homer et Shank (Sala et al., 2001).

La PSD ancre les récepteurs glutamatergiques de manière directe ou indirecte. La PSD contient de nombreuses protéines de la signalisation biochimique trans-synaptique comme la calmoduline kinase dépendante du calcium (CamKII), les protéines kinase A et C. Des protéines d'adhérence trans-synaptique interagissent directement avec PSD95 comme par exemple les neuroligines (ligand des neurexines) et les NGLs (netrines G ligands) assurant ainsi le maintien de la synapse (Kim et al., 2006a). Enfin la PSD interagit avec l'actine. Dans les neurones, les filaments d'actine (actine-F) sont particulièrement enrichis dans les épines dendritiques (Blomberg et al., 1977; Matus et al., 1982) et forment un réseau complexe qui supporte la structure de l'épine ; la dynamique des filaments d'actine confère à l'épine la capacité de changer de forme (Fifkova and Delay, 1982; Fischer et al., 1998). La PSD représente donc le centre organisateur de l'épine.

Les épines dendritiques possèdent aussi des organelles comme le réticulum endoplasmique lisse (SER, smooth endoplasmic reticulum) assurant le stockage du calcium, figure 3. Le SER est en continuité avec le SER de la dendrite (Spacek and Harris, 1997). Dans certaines épines, le SER peut être présent sous forme d'une pile de SER lamellaire, il est alors appelé l'appareil épineux (SA, Spine apparatus). Des endosomes de recyclage (RE, recycling endosomes) permettent le retour de récepteurs internalisés à la surface (Cooney et al., 2002). Les polyribosomes (PR) à la base des épines (Steward and Levy, 1982) assurent la synthèse protéique. Les polyribosomes sont des complexes ARN messagers / ribosomes ; où un ARNm est associé à plusieurs ribosomes. Enfin, les mitochondries, abondantes dans les troncs dendritiques, sont présentes dans les grosses épines dendritiques de l'aire CA3 de l'hippocampe (Chicurel and Harris, 1992) et peuvent entrer dans l'épine dendritique suite à une activité synaptique (Li et al., 2004). En plus de l'apport d'ATP nécessaire à la transduction du signal dans l'épine, elles peuvent tamponner le calcium intracellulaire.

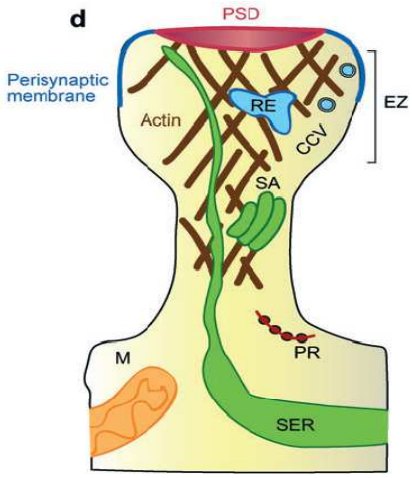


Figure 3 : Représentation schématique d'une épine dendritique mature de type champignon, montrant la densité postsynaptique (PSD) et les organelles de l'épine. D'après (Sheng and Hoogenraad, 2007).
Abréviations : SER : smooth endoplasmic reticulum, SA : spine apparatus, RE : recycling endosomes, PR : polyribosomes, M : mitochondria, lignes brunes: cytosquelette d'actine, EZ : endocytic zone, CCV : clathrin-coatedvesicles.

Depuis Cajal, la fonction exacte des épines dendritiques a intrigué les chercheurs sans discontinuer.

Il existe une corrélation étroite entre la taille de la tête de l'épine et la taille de leur PSD ; ainsi qu'entre la taille de la PSD, le nombre de récepteurs postsynaptiques et celui des vésicules présynaptiques (Harris and Stevens, 1989; Nusser et al., 1998; Schikorski and Stevens, 1999) Ainsi, les paramètres morphologiques sont liés directement à l'efficacité fonctionnelle. Par ailleurs, le diamètre du cou joue un rôle primordial dans la diffusion des signaux biochimiques et électriques. Par exemple, la compartimentalisation du calcium dans la tête de l'épine dépend des dimensions du cou. Les épines dont le cou est étroit et long retiennent mieux le calcium dans leur tête que celles dont le cou est évasé et court (Noguchi et al., 2005). Par ce biais, la morphologie des épines peut moduler les cascades de signalisation qui déclenchent le renforcement ou l'affaiblissement des synapses (voir paragraphe 1.3.3 plus loin). Les protéines diffusent elles aussi dans les dendrites et leur diffusion est contrôlée par le diamètre du cou de l'épine, par exemple, les protéines liant le calcium (Schmidt and Eilers, 2009), PSD-95 (Gray et al., 2006) et le second messager l'inositol triphosphate (Santamaria et al., 2006). Aussi, la présence d'un cou fin peut réduire le transfert de charge des synapses aux dendrites, isolant électriquement les synapses (Araya et al., 2006b). De cette manière, les synapses ne se court-circuitent pas et les inputs excitateurs se combinent de façon linéaire

plutôt que sous-linéaire, d'où leur bonne intégration au niveau du soma et la prise en compte de toutes les synapses actives pour la génération d'un potentiel d'action (Araya et al., 2006a).

Les épines dendritiques assurent donc la transmission électrique du message nerveux et l'intègrent dans un réseau neuronal complexe. On considère actuellement que les épines constituent de petits compartiments semi-isolés aussi bien électriquement que biochimiquement. Ceci permettrait la transmission fidèle de nombreux inputs excitateurs simultanés, tout en restreignant les changements biochimiques à des synapses spécifiques.
Les neurones épineux sont d'ailleurs peu présents chez des organismes inférieurs tels *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* (Sala et al., 2008); les épines dendritiques fournissent donc des fonctions permettant le développement de systèmes nerveux plus complexes.

Dans l'hippocampe et le cortex, les cellules pyramidales épineuses sont majoritaires. Les cellules granulaires du cervelet (cellules de Purkinje), de l'hippocampe (cellules du gyrus denté), du cortex, du striatum médian, sont aussi des neurones épineux. Dans le cortex, dans les structures sous corticales telles l'hippocampe et le striatum, et dans le cervelet, les neurones non épineux sont majoritairement des interneurones. Il s'agit par exemple des cellules en bouquet et en chandelier du cortex ; des cellules en corbeille du cortex, de l'hippocampe et du cervelet ; des cellules fusiformes de l'hippocampe ; ou encore des grosses cellules du striatum.

Les épines varient en taille et en forme le long des dendrites. Les épines fines avec une toute petite tête et un cou allongé sont de type : « thin spines » ; la longueur de l'épine est largement supérieure au diamètre du cou. Les épines dont le cou serré et la tête large évoquent la forme d'un champignon sont de type « mushroom spines » ; le diamètre de la tête est alors largement supérieur à celui du cou. Les épines dont le diamètre de la tête est égal à la longueur de l'épine sont nommées : « stubby spines». Enfin les épines possédant plusieurs têtes sont dites branchées : « branched spines » (Harris et al., 1992) (Figure 4).

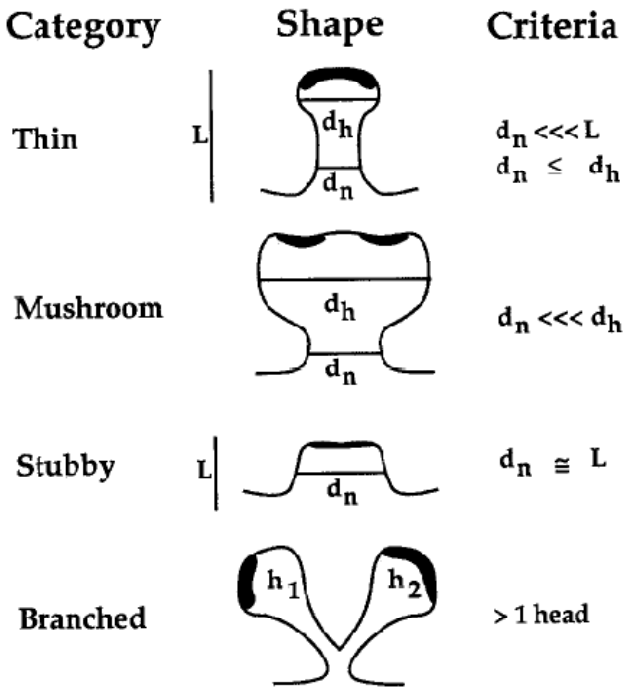


Figure 4 : Classification morphologique des diférents types d'épines dendritiques et les critères sous-tenant cette classification. L, longueur de l'épine; d_n, diamètre du cou de l'épine ; d_h, diamètre de la tête de l'épine ; h = tête. D'après (Harris et al., 1992).

Cette classification arbitraire des épines dendritiques s'applique en fait à un continuum, et sous estime l'hétérogénéité de la morphologie des épines qui existe sur une seule dendrite. Les différents types d'épines ne sont que des instantanés d'un phénomène unique mais extrêmement dynamique (Parnass et al., 2000). Les épines dendritiques sont des structures remarquablement dynamiques qui peuvent changer de taille et de forme en quelques secondes à quelques minutes. Étant donné l'impact de la géométrie sur les propriétés électriques et biochimiques, ces variations ont probablement une grande importance.

1.2. Plasticité synaptique

1.2.1. Potentialisation et Dépression à long terme

C'est en 1973, que Bliss et Lømo découvrirent la potentialisation à long terme dans l'hippocampe, une structure cérébrale impliquée dans la mémoire (cf. plus bas). Cette forme de plasticité synaptique se manifeste par l'induction de changements prolongés dans l'efficacité de la transmission. Ils montrèrent qu'une stimulation à haute fréquence de la voie

perforante de l'hippocampe pouvait augmenter la force de transmission synaptique du gyrus denté et que cette modification pouvait durer plusieurs heures. Pour cela, ils implantèrent quatre électrodes dans les hippocampes d'un lapin anesthésié. Deux électrodes de stimulation (Stim) dans les voies perforantes (pp) et deux électrodes d'enregistrement (Rec) dans les gyrus dentés (Dentate Area) (Figure 5. A.). Dans un premier temps l'expérience consiste à enregistrer simplement l'amplitude des potentiels postsynaptiques excitateurs évoqués (e.p.s.p : Excitatory PostSynaptic Potentials). Le lapin étant anesthésié, les potentiels enregistrés correspondent aux potentiels évoqués par le stimulus test. Ils enregistrent pendant 30 minutes et définissent ainsi la ligne de base (placée à 100 %, sur le graphique, Figure 5. B.). Ils commencent ensuite ce qu'ils nomment le conditionnement, c'est-à-dire l'application à l'aide de l'électrode de stimulation d'un courant de même amplitude que précédemment mais à la fréquence de 15 stimulations par seconde pendant 10 secondes (Figure 5. B. flèches).

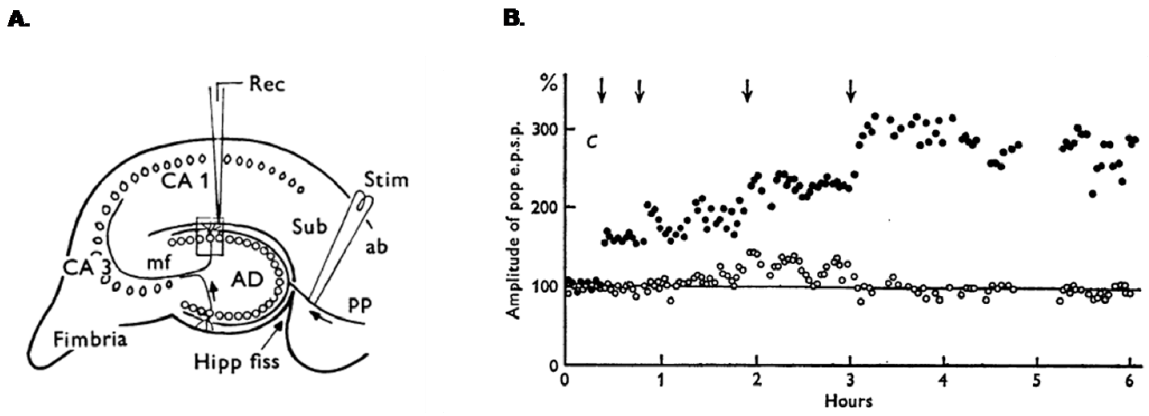


Figure 5 : A. Schéma coupe parasagittale d'un hippocampe d'un lapin, représentant l'implantation des électrodes de stimulation (Stim) de la voie perforante et d'enregistrement (Rec) dans le gyrus denté. B. Graphique représentant l'amplitude des potentiels postsynaptiques excitateurs évoqués de la voie expérimentale (cercles pleins) et de la voie contrôle ipsilatérale (cercles vides), en fonction du temps. Chaque point représente la moyenne de trois amplitudes, normalisées par rapport à la moyenne avant le conditionnement (c). Les flèches indiquent les temps auxquels les stimulations (15 stimulations par secondes pendant 10 secondes) ont été appliquées. Abréviations: PP: Perforant Path (voie perforante), AD : Aire Denté, mf : mossy fiber (fibres moussues), CA1 et CA3 : Corne d'Ammon 1 et 3 (champs pyramidaux), Sub : Subiculum, ab : angular bundle (faisceaux angulaire), Hipp fiss: Hippocampal fissure (fissure hippocampique). e. p. s. p: excitatory postsynaptic potentials (potentiels postsynaptiques excitateurs). Adapté depuis : (Bliss and Lomo, 1973).

Ce train de stimulations correspond à une stimulation tétanique brève et est répété 4 fois dans l'expérience. Ils mesurent ensuite les amplitudes des potentiels postsynaptiques évoqués

(cercles pleins), celles-ci augmentent après chaque stimulation tétanique et augmentent d'autant plus suite à la répétition des stimulations ; de plus, cette augmentation perdure dans le temps, au moins pendant 6 heures. En revanche les amplitudes des potentiels postsynaptiques évoqués de l'hippocampe controlatéral, non tétanisé, utilisé en contrôle, n'augmentent pas. L'augmentation des amplitudes des potentiels postsynaptiques évoqués est donc bien due aux stimulations tétaniques et traduit une augmentation de la force synaptique. Cette augmentation durable de la force synaptique est appelée potentialisation à long terme ou LTP (Long Term Potentiation).

Plus tard, les travaux de Collingride et de Harris montrèrent l'implication des récepteurs NMDA postsynaptiques dans l'établissement de la LTP (Collingridge et al., 1983; Harris et al., 1984). En effet les antagonistes des récepteurs NMDA laissent intacte la majorité de la transmission synaptique, c'est-à-dire n'ont pas d'effet significatif sur les potentiels excitateurs postsynaptiques (dus à l'ouverture des récepteurs AMPA), mais empêchent l'induction de la LTP par des stimulations hautes fréquences.

Par ailleurs, la LTP peut être inversée par l'activité synaptique, il s'agit d'un phénomène appelé « dépotentialisation » (Barrionuevo et al., 1980; Staubli and Lynch, 1990; Fujii et al., 1991) et par des stimulations à basses fréquences. Dudek et Bear émirent en 1992 l'hypothèse selon laquelle si une synapse pouvait être renforcée, elle pouvait aussi être affaiblie. Ils stimulèrent à basses fréquences les collatérales de Schaffer et purent mesurer en CA1 une dépression de la force synaptique (Dudek and Bear, 1992). Cette dépression persiste dans le temps et peut être inversée par des stimulations hautes fréquences, elle est nommée dépression à long terme (LTD, long term depression). Comme la LTP, la LTD requiert l'activation des récepteurs NMDA (Dudek and Bear, 1992).

Les propriétés de la LTP, et sa découverte dans l'hippocampe, laissèrent tout de suite penser qu'elle pourrait être liée à la mémoire. Les premières données concernant la fonction de l'hippocampe chez l'être humain apparurent avec les observations, au début du 20ème siècle par le neurologue Aloïs Alzheimer, de patients atteint de démences amnésiques. Il put associer spécifiquement ces démences à des modifications morphologiques du cortex, en particulier de l'hippocampe. Plus tard, en 1953 l'hippocampe fut inclus définitivement dans le processus de mémorisation, par l'étude du patient Henry Gustav Molaison, plus connu sous les initiales de H. M. (1926-2008). Ce dernier souffrait de crises d'épilepsie incurables et généralisées depuis l'âge de 16 ans, et subit à 27 ans l'ablation bilatérale des lobes temporaux médians. Après l'opération, HM souffrait d'une amnésie rétrograde de 11 ans et d'une sévère

amnésie antérograde. Autrement dit, il ne se souvenait plus des onze années qui précédaient l'opération (amnésie rétrograde) et était incapable de créer de nouveaux souvenirs après l'opération (amnésie antérograde). En revanche le patient put apprendre de nouvelles tâches telles que dessiner en regardant sa main dans un miroir, sans pour autant se souvenir des séances pendant lesquelles il avait appris cette tâche. Ainsi, il semble que l'hippocampe, bien qu'il ne soit pas le siège des souvenirs, joue un rôle critique dans leur formation et plus précisément dans la mémoire des événements (mémoire explicite ou déclarative), par opposition à la mémoire permettant l'acquisition d'un savoir-faire (mémoire implicite ou procédurale) qui dépend d'autres structures du cerveau telles que le cervelet et les ganglions de la base.

Les travaux de Morris apportèrent quant à eux une preuve expérimentale de l'implication de l'hippocampe dans la mémorisation spatiale (test du labyrinthe aquatique) (Schenk and Morris, 1985). Plus précisément il montra que la mémoire spatiale possède des composants déclaratifs (c'est-à-dire enregistrés sous une forme indépendante de l'action) et procéduraux (c'est-à-dire constitués d'actes moteurs), et que la mémoire déclarative est spécifiquement perdue lors de lésions de l'hippocampe. Ils entrainèrent des rats à trouver une plateforme après avoir été opérés. L'eau étant trouble, la plateforme est invisible. Les rats doivent donc trouver et reconnaître des repères spatiaux extérieurs à la piscine pour rejoindre la plateforme. Grâce aux entraînements les rats contrôles localisent la plateforme de plus en plus vite, alors que les rats lésés montrent un déficit dans la localisation de celle-ci. Cette expérience indique la perte de la mémoire déclarative suite aux lésions de l'hippocampe. En revanche, si avant l'opération, les animaux sont entrainés à localiser la plateforme, que celle-ci est ensuite retirée de la piscine ; ils conservent transitoirement le comportement de nage croisant le lieu de la plateforme. Cette expérience indique la conservation de la mémoire procédurale malgré les lésions de l'hippocampe.
Ils montrèrent aussi l'implication des récepteurs NMDA dans l'établissement de cette mémoire spatiale (Morris et al., 1986). En effet, l'injection intraventriculaire chronique de l'acide aminophosphonovalérique (AP5), un antagoniste du récepteur NMDA, chez des rats, empêche l'acquisition des repères spatiaux dans le test du labyrinthe aquatique.

Le récepteur NMDA est donc impliqué dans la mémorisation spatiale. Il est aussi impliqué dans la mise en place de la LTP, suggérant que la LTP est nécessaire au processus de mémorisation, tout du moins spatiale. Aujourd'hui, la relation entre LTP et apprentissage est

universellement reconnue (Whitlock et al., 2006) et la LTP dans l'hippocampe est devenue le modèle des processus d'apprentissage le plus étudié.

1.2.2. LTP/LTD et morphologie des épines dendritiques

De nombreuses études ont cherché à corréler la LTP à des changements morphologiques des épines dendritiques mais aboutirent à des résultats contradictoires.
En effet après une LTP du gyrus denté certains auteurs trouvèrent des épines plus larges avec des cous plus petits (Van Harreveld and Fifkova, 1975; Fifkova and Van Harreveld, 1977; Fifkova and Anderson, 1981). D'autres ne rapportèrent pas de modifications de ces paramètres mais une augmentation du nombre d'épines dendritiques (Trommald et al., 1996). Une telle augmentation en nombre n'apparaît pas dans toutes les études (Desmond and Levy, 1986b, 1986a, 1990). Après une LTP dans la corne d'Ammon 1 l'équipe de Bliss ne nota aucun changements de la morphologie ou du nombre d'épines (Hosokawa et al., 1995) alors qu'en sélectionnant les segments dendritiques (Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999) ou les épines (Toni et al., 1999) effectivement stimulés, d'autres auteurs voyaient le nombre de nouvelles épines (Engert and Bonhoeffer, 1999) ou de filopodes (Maletic-Savatic et al., 1999) augmenter considérablement et les épines changer de morphologie (Toni et al., 1999).
Il apparait donc des divergences selon la technique de stimulation employée, la région dans laquelle la stimulation a été effectuée, la technique de microscopie employée et le type d'analyse réalisé.
Malgré ces contradictions, la microscopie bi-photonique apporte aujourd'hui la possibilité d'observer en direct les modifications que peuvent subir les épines dendritiques. Il est aujourd'hui largement admis que la LTP induit un élargissement des épines, l'apparition de nouvelles épines et une augmentation de leur motilité (Dunaevsky et al., 1999; Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Toni et al., 1999); et que la LTD induit le rétrécissement des épines, une diminution de leur motilité et finalement leur disparition (Dunaevsky et al., 1999; Nagerl et al., 2004; Wallace and Bear, 2004; Zhou et al., 2004).
Aussi, l'élargissement des petites épines est stable alors qu'il est transitoire pour les grosses épines (Matsuzaki et al., 2004). Les petites épines seraient le site préférentiel pour l'induction de la LTP alors que les grosses épines représenteraient la trace physique d'une mémoire à long terme (Kasai et al., 2003; Bourne and Harris, 2007). Par exemple, malgré le fait que les souris KO Shank 1 présentent entre autres une diminution de la taille des épines dendritiques

dans l'hippocampe et une réduction de la transmission synaptique basale, elles peuvent tout de même apprendre à se repérer dans l'espace (test du labyrinthe aquatique) ; cependant cet apprentissage ne perdure pas (Hung et al., 2008), impliquant ainsi les grosses épines dans le support de la mémoire à long terme.

1.3. Formation et maintien des épines dendritiques : Rôle des épines dendritiques dans la plasticité synaptique

1.3.1. Filopodes précurseurs développementaux des épines dendritiques

Les épines dendritiques apparaissent très tôt pendant le développement, peu après l'extension des dendrites. Des contacts synaptiques sont établis très rapidement entre les épines et les axones présynaptiques, suggérant que les processus de la spinogenèse sont intimement liés aux processus de mise en place des contacts entre neurones et l'établissement des circuits neuronaux.

En 1996, Ziv et Smith émettent l'hypothèse que les filopodes seraient les précurseurs développementaux des épines dendritiques (Ziv and Smith, 1996). Les filopodes sont des structures en forme de doigt, longues (> 3µm) et fines (0,1–0,3 µm), sans tête, sans PSD et composées principalement d'actine filamenteuse. Ziv et Smith ont démontré dans un système *in vitro* de culture de neurones d'hippocampe de rat que les filopodes exploraient l'environnement dans le but d'initier des contacts, de guider les axones jusqu'aux dendrites. Les filopodes sont au moins aussi nombreux que les épines formées sur les dendrites, et leur disparition coïncide avec l'apparition des épines dendritiques. Enfin, ils permettent la mise en place de synapses axo-dendritiques fonctionnelles.

Cependant les filopodes sont émis par les neurones épineux comme par les neurones non-épineux, suggérant un rôle fondamental dans le développement de l'arborisation dendritique. En réalité deux types de filopodes existent. L'un, à l'extrémité terminale de la dendrite en croissance, au niveau du cône de croissance, qui laissera place à une branche dendritique stable. L'autre type de filopode se situe latéralement à la dendrite en croissance et laissera place à des épines dendritiques (Dailey and Smith, 1996; Ziv and Smith, 1996; Fiala et al., 1998; Portera-Cailliau et al., 2003). La mise en place d'une branche dendritique stable dépend intimement de la formation de synapses le long de celle-ci (Niell et al., 2004). La drebrine, partenaire de l'actine, recrute PSD-95 dans les filopodes afin qu'ils évoluent en épines, c'est-

à-dire en synapse matures (Takahashi et al., 2003). En effet, les rassemblements locaux de PSD-95 d'un côté et de la synaptophysine (protéine des vésicules synaptiques) de l'autre, sont corrélés spatialement et temporellement avec la morphogenèse des épines (Okabe et al., 2001; Prange and Murphy, 2001).

Les filopodes sont des structures extrêmement dynamiques en particulier pendant le développement où des milliers de connexions synaptiques doivent être établies rapidement (Dailey and Smith, 1996; Zuo et al., 2005a; Zuo et al., 2005b). Les filopodes s'allongent et se rétractent en utilisant les mécanismes de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine (Hotulainen et al., 2009). Ainsi tout ce qui perturbe la dynamique de l'actine perturbe la morphogenèse des épines dendritiques et la transmission synaptique.
Cependant, pendant le développement, tous les contacts formés par les filopodes ne sont pas conservés. Des études d'imagerie *in vivo* de la jeune souris ou de tranches d'hippocampe, suggèrent que seulement 10 à 20 % des filopodes seront transformés en épines et parmi ces épines un grand nombre disparaîtra dans les jours suivants (Zuo et al., 2005a; De Roo et al., 2008).

1.3.2. Maintien des épines dendritiques *in vivo*

La formation et le maintien des épines dendritiques sont intimement liées à l'expérience c'est à dire aux stimulations du système nerveux périphérique. Par exemple chez le rat, la privation sensorielle depuis la naissance et jusqu'à l'adolescence réduit le nombre de synapses, alors qu'un environnement riche pendant la même période induit une augmentation de la complexité dendritique et du nombre de synapses dans différentes régions du cerveau (Valverde, 1967, 1971; Greenough et al., 1973; Fiala et al., 1978; Knott et al., 2002). La densité des épines augmente pendant la synaptogenèse. Par exemple chez le rat, sur les dendrites des cellules pyramidale du CA1 dans le stratum radiatum, la densité des épines double entre le 15ème jour après la naissance et l'adulte (Harris et al., 1992).
Les méthodes d'imagerie du cortex par microscopie biphotonique *in vivo* ont permis d'examiner la stabilité des épines sur de longues durées et ainsi de calculer leur durée de vie. Des études montrent que les épines dendritiques sont plus stables chez l'adulte que dans le cerveau en développement (Majewska and Sur, 2003). Certaines épines peuvent être présentes tout au long de la vie d'une souris, comme dans le cortex visuel d'une souris âgée de 4 mois (Grutzendler et al., 2002) ; et d'autres épines peuvent être présentes pendant une courte durée

(120 jours) comme dans le cortex en tonneau d'une souris âgée de 4 mois (Trachtenberg et al., 2002). En revanche une autre étude menée chez des souris âgées de 6 mois, a mesuré une durée de vie des épines dendritiques égale pour le cortex visuel et le cortex en tonneau, de seulement un mois (Holtmaat et al., 2005).
Il apparaît donc des divergences, selon la région du cerveau étudiée, l'âge des adultes, le fond génétique des souris, mais aussi la technique employée, c'est-à-dire le type de fenêtre crânienne effectuée (Xu et al., 2007).

1.3.3. Bases moléculaires de la morphologie des épines dendritiques

La régulation positive ou négative de gènes spécifiques a permis ces dernières années d'identifier les gènes important pour la régulation du nombre et de la taille des épines dendritiques.

1.3.3.1. L'actine

L'actine est particulièrement enrichie dans les épines dendritiques sous sa forme filamenteuse (Matus et al., 1982), elle confère aux épines la capacité de changer de forme rapidement (Fischer et al., 1998). L'activité synaptique contrôle la dynamique de l'actine (Fischer et al., 2000). Ce qui bloque la dynamique de l'actine, bloque la LTP (Kim and Lisman, 1999; Krucker et al., 2000) et augmente légèrement la LTD (Chen et al., 2004). Ainsi, les protéines interagissant avec l'actine et influençant sa polymérisation ou sa dépolymérisation ont un impact sur la plasticité synaptique ; il s'agit entre autres de la cofiline (Meng et al., 2002), de la cortactine (Hering and Sheng, 2003; Iki et al., 2005), de la profiline (Ackermann and Matus, 2003), de l'α-actinine (Nakagawa et al., 2004) etc.
La force mécanique exercée par les filaments d'actine semble contribuer directement à la formation et au maintien des épines ; et au grossissement des épines lors de la LTP. La réorganisation du cytosquelette d'actine est indispensable au maintien de la LTP (Fukazawa et al., 2003). Par ailleurs, la polymérisation de l'actine sous la membrane plasmique influence la diffusion des protéines ancrées dans cette même membrane (Richards et al., 2004) et potentiellement le trafic des récepteurs AMPA modulant ainsi la distribution des récepteurs glutamatergiques dans la membrane postsynaptique (Choquet and Triller, 2003). Les protéines de la famille Rho, petites GTPases, régulent par différents aspects le cytosquelette

d'actine (Hall, 1994), et sont impliquées dans le maintien (Nakayama et al., 2000) et la motilité des épines dendritiques (Tashiro and Yuste, 2004).

1.3.3.2. Transport des ARN messagers et synthèse protéique locale

Des analyses quantitatives de microscopie électronique ont révélé que la vaste majorité des polyribosomes présents dans les dendrites sont précisément positionnés sous les sites postsynaptiques, à la base des épines dendritiques (cf paragraphe 1.1.) (Steward and Levy, 1982). Les polyribosomes, ainsi localisés, peuvent être influencés par des signaux électriques et/ou biochimiques provenant de la synapse, mais aussi du tronc dendritique lui-même. Par exemple, deux heures après l'induction de la LTP, le nombre de polyribosomes augmente à l'intérieur des épines dendritiques dans la région CA1 de neurones d'hippocampe en tranche (Ostroff et al., 2002).
Les études de la LTP chez les mammifères ont identifié deux phases distinctes au cours de la plasticité : une phase précoce (de courte durée 1 à 3 h) indépendante de la synthèse protéique et une phase tardive (de longue durée, supérieure à 8 h) dépendante de la synthèse de nouvelles protéines (Stanton and Sarvey, 1984; Sutton and Schuman, 2006). Des études récentes en imagerie en temps réel ont montré que le grossissement des épines dans la LTP dépend de la synthèse de nouvelles protéines (Tanaka et al., 2008; Yang et al., 2008b).

La synthèse d'un pré-ARN messager nécessite une dizaine de minutes à plusieurs heures dans certains cas extrêmes ; puis ce pré-ARN doit ensuite subir des modifications de ses extrémités 5' et 3' et un épissage. L'obtention d'un ARNm mature est donc un processus très long en comparaison à la synthèse protéique. En effet, la synthèse complète d'une protéine de 50 kDa par exemple ne nécessite environ qu'une minute. De plus, l'ARNm étant simultanément parcouru par plusieurs ribosomes ; il est possible en quelques minutes, à partir d'un seul ARNm, d'obtenir de nombreuses copies d'une même protéine. Ainsi, à partir d'un seul ARNm, la composition protéique peut être modifiée localement très rapidement. Dans le cas des neurones, la traduction dendritique locale apparaît comme indispensable, d'une part face à l'éloignement des neurites par rapport au soma et d'autre part face à la nécessité de répondre rapidement à un besoin local de nouvelles protéines.

Les ARN messagers sont transportés dans des granules appelés RNP (RiboNucleoprotein Particles). Le transport des ARNm comprend plusieurs étapes (cf figure 6) : (1) la reconnaissance dans le noyau des ARN par des protéines liant les ARN (facteurs agissant en *trans*) ; (2) l'export des complexes ARNm/RNP du noyau vers le cytoplasme ; (3) l'association d'autres facteurs incluant des moteurs moléculaires pour former des RNP fonctionnels ; (4) le transport des RNP sur les microtubules; (5) la localisation et l'amarrage spécifiques des RNP à leur destination ; et enfin (6) la régulation de la traduction des ARNm par des signaux spécifiques (Lasiecka et al., 2009).

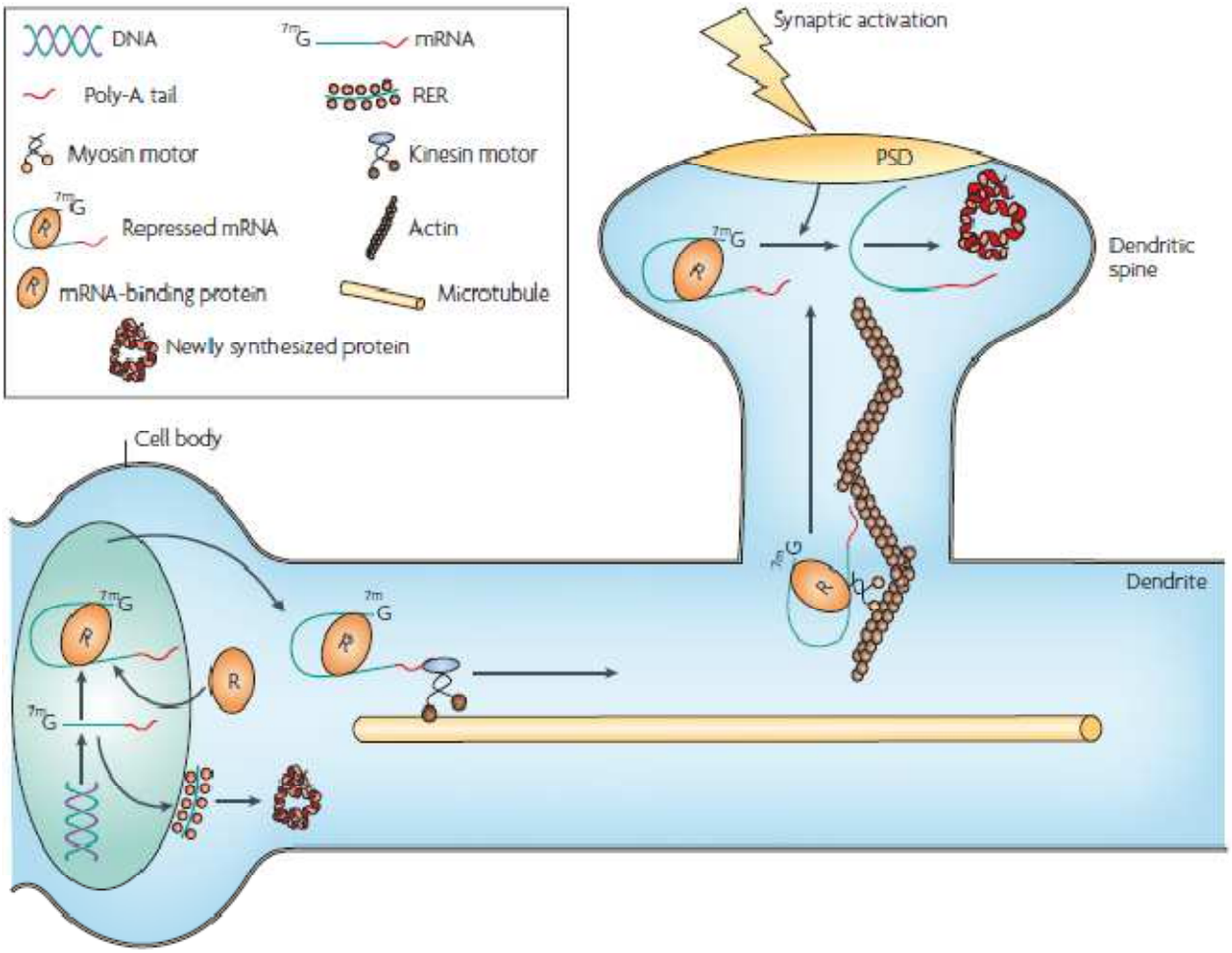


Figure 6 : Modèle de la traduction des ARNm dans les épines dendritiques. La liaison d'un ARN messager spécifique dans le noyau par une protéine liant les ARNm (R) isole cet ARNm de la machinerie de synthèse protéique du soma, inhibant sa traduction. Ces ARNm réprimés sont ensuite empaquetés dans des granules afin d'être transportés dans la dendrite par les moteurs moléculaires kinésines, sur les microtubules. Suite à l'activation synaptique, les granules sont dispersés et les ARNm sont emmenés dans les épines par les moteurs moléculaires myosines via le cytosquelette d'actine. La traduction est activée par la neutralisation de la répression par les protéines liant les ARN. 7mG, 7-méthyl-guanosine ; PSD, postsynaptic density ; RER, rough endoplasmic reticulum. D'après (Bramham and Wells, 2007).

Chacune de ces étapes commence aujourd'hui à être élucidée ; en revanche, pour un ARNm donné, toutes les données concernant ces six étapes ne sont pas connues. Les données provenant du transport d'ARN dans des cellules non neuronales ont fait grandement avancer les recherches dans les neurones.

Les éléments en *cis,* permettant la reconnaissance des ARNm par des protéines ligands plus ou moins spécifiques, sont localisés dans la séquence non traduite en 3' (3'UTR, 3' UnTranslated Region). Par exemple la suppression de la région 3'UTR de l'ARNm de la CamKIIα, restreint l'ARNm de la CamKIIα au niveau du soma, diminue la LTP et empêche la mémorisation spatiale (Miller et al., 2002).

Une synthèse spécifique locale des protéines au niveau des sites synaptiques activés implique d'isoler les ARNm de la machinerie de synthèse protéique du soma. Pendant le transport, la traduction des ARNm est réprimée jusqu'à ce qu'ils atteignent leur destination finale. Les RNP contiennent aussi des ARN non traduits et des micro ARN (Cao et al., 2006; Dahm et al., 2007). Les micro-ARN semblent être impliqués dans la répression des ARNm lors de leur transport. Puisque la machinerie de traduction est présente dans les dendrites, et en association avec les ARNm ; pourquoi certains ARNm sont ils traduits alors que d'autres restent dormants ? La réponse pourrait résider dans la présence des protéines liant spécifiquement les éléments *cis* des ARN, et régulant leur traduction.
Par exemple, dans des cultures primaires de neurones d'embryons de poulet, la protéine ZBP1 (Zip code Binding Protein 1) lie, dans le noyau, 54 nucléotides de la région 3'UTR de l'ARNm de l'actine-β (appelée ZIP code, préalablement identifiée par (Ross et al., 1997)) ; puis accompagne l'ARNm de l'actine-β dans les RNP cytoplasmiques. ZBP1 inhibe la traduction de cet ARNm en empêchant la formation du complexe ribosomal 80S ; et la phosphorylation de ZBP1 par Src permet la libération de l'ARNm de l'actine-β et sa traduction (Huttelmaier et al., 2005). La protéine FMRP (Fragile X syndrome Mental Retardation Protein) est impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm. La simple interaction de FMRP avec les ARNm, réprime leur traduction ; et la déphosphorylation de FMRP active la traduction (Ceman et al., 2003). La protéine Staufen lie elle aussi les ARNm. Elle est impliquée dans le transport dendritique des ARNm (Tang et al., 2001) et dans la régulation de leur traduction (Kim et al., 2005).
La mutation de FMRP induit un retard mental, le syndrome du X fragile, et affecte les épines dendritiques chez l'homme (Hinton et al., 1991) et la plasticité synaptique chez la Drosophile

(Zhang et al., 2001). Staufen est nécessaire à la formation et au maintien des épines dendritiques des neurones d'hippocampe de rat (Goetze et al., 2006) ; et est impliquée dans le processus de mémorisation chez la Drosophile (Dubnau et al., 2003). Ces données soulignent l'importance dans la fonction neuronale, du transport des ARNm dans les dendrites.
De nombreux acteurs du fonctionnement de la synapse sont emmenés dans les dendrites et/ou dans les épines dendritiques tels les ARNm de la CamKIIα (Havik et al., 2003), des sous-unités GluR1 et GluR2 des récepteurs AMPA (Kacharmina et al., 2000; Ju et al., 2004), de Shank1 et Shank3 (Zitzer et al., 1999; Bockers et al., 2004), de l'actineβ (Eom et al., 2003; Tiruchinapalli et al., 2003), de Ndl1, protéine stabilisatrice de l'actine (Fujii and Takumi, 2005) etc.

Le transport des ARNm et des RNP, dans des cellules non neuronales, nécessite le cytosquelette de tubuline et les moteurs moléculaires, entre autres ceux de la famille des kinésines. C'est pourquoi l'équipe de Kanai a cherché à identifier dans les neurones, les molécules associées à la protéine kinésine KIF5 (Kanai et al., 2004). C'est ainsi, qu'elle identifia de nombreuses protéines de liaison des ARNm et des granules d'ARNm telles que des hnRNP, des protéines ribosomiales, FMRP, Staufen, TLS (Translocated in Liposarcoma), etc. mais aussi des ARNm et notamment ceux de la CamKII et de Arc (Activity Regulated Cytoskeleton associated protein). L'équipe d'Elvira a identifié le moteur moléculaire dynéine en association à des RNP ; ainsi que le facteur d'épissage TDP-43 (TAR DNA Binding protein of 43 kDa) (Elvira et al., 2006). La translocation des ARNm à l'intérieur des épines dendritiques implique quant à elle, le cytosquelette d'actine et le moteur moléculaire MyosinVa (Yoshimura et al., 2006).

L'équipe de Kanai identifia aussi, parmi les protéines liant les ARNm, des protéines de la machinerie de traduction. Les facteurs d'initiation eIF2A (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha) et d'élongation eEF1A (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha) font partie des RNP (Kanai et al., 2004; Elvira et al., 2006). Notre laboratoire a identifié l'ARNm du facteur d'élongation eEF1A, en association dans le compartiment somatodendritique, au facteur d'épissage, Sam68 (Src-associated in mitosis of 68 kDa) (Grange et al., 2004; Grange et al., 2009). Les facteurs d'épissage accompagnent eux aussi les ARNm dans les dendrites. Par exemple, le facteur d'initiation eIF4AIII, impliqué dans l'épissage des pré-ARNm dans le noyau, a été trouvé associé aux ARNm dendritiques de FMRP et de Arc (Giorgi et al., 2007). eIF4AIII fait partie du complexe de jonction exonique

(Exon Junction Complex, EJC). Ce complexe se dépose sur les ARN au cours de l'épissage et leur reste lié pendant l'export nucléaire. L'EJC participe dans le cytoplasme au NMD, Non-sens Mediated Decay. Il s'agit d'un système de reconnaissance et de destruction des ARNm contenant un codon stop prématuré, visant à protéger la cellule de la formation d'une protéine anormale, tronquée. Cependant, des travaux récents montrent que des protéines d'épissage telles que celles de l'EJC influencent également l'efficacité de traduction des ARNm normaux (Le Hir and Seraphin, 2008). C'est une des raisons pour lesquelles nous avons porté notre attention sur les facteurs d'épissage Sam68 et TLS (cf Résultats).

Tous les ARNm cellulaires ne sont pas représentés dans les dendrites. Cependant, la majorité des ARNm dendritiques nécessaires au renforcement synaptique semblent être présents à l'état basal et de façon constitutive, dans des régions dendritiques distales (Moccia et al., 2003; Poon et al., 2006; Matsumoto et al., 2007) ; ils subissent donc une délocalisation permanente depuis le noyau. Il existe cependant un cas d'ARNm dont la localisation est précisément régulée en fonction de l'activité synaptique. Il s'agit de l'ARNm de la protéine Arc (Activity Regulated Cytoskeleton associated protein). Le gène codant Arc fait partie d'une famille de gène à expression précoce (IEG, Immediate Early Gene). L'expression de ces gènes est induite de façon rapide par l'activité cellulaire. Dans le cas de Arc, la stimulation de la voie perforante du cortex enthorinal, dans un cerveau de rat, provoque le transport de l'ARNm de Arc dans les arborisations dendritiques des cellules granulaires du gyrus denté (Wallace et al., 1998). Cette localisation de l'ARNm de Arc dépend des récepteurs NMDA (Steward and Worley, 2001). Ainsi, l'induction de la LTP génère un signal qui provoque la localisation des ARNm Arc près des synapses activées. Arc semble jouer un rôle clé dans le processus de mémorisation à long terme ; les mécanismes modulant sa fonction commencent à peine à être élucidés (Bramham et al., 2009).

Par ailleurs, la dégradation protéique médiée par le système du protéasome (UPS, Ubiquitin Proteasome System) est aussi requise pour la mise en place de la LTP (Fonseca et al., 2006; Karpova et al., 2006). En effet, l'inhibition du protéasome par différentes drogues diminue la potentialisation des synapses de la région CA1 induite par la stimulation des collatérales de Schaffer. La LTD requiert elle aussi, la dégradation de protéines par le système du protéasome. Par example, la mise en place de la LTD par la stimulation des mGluR, nécessite tout d'abord la synthèse de la protéine FMRP, mais est suivie très rapidement par la dégradation de FMRP par le système du protéasome (Hou et al., 2006).

Ainsi, à travers la synthèse locale et la dégradation de protéines en fonction de l'activité neuronale, les inputs synaptiques peuvent directement remodeler la composition protéique et par là même le fonctionnement d'épines dendritiques individuelles.

1.3.3.3. Les endosomes

Les endosomes présents dans les épines dendritiques, permettent par fusion avec la membrane plasmique, l'insertion au niveau des synapses, des protéines nécessaires à leur fonction (cf plus bas paragraphe 2.2). Les endosomes de recyclage, par exemple, constituent un pool de réserve pour apporter rapidement des récepteurs aux neurotransmetteurs, à la surface afin d'induire une LTP (Park et al., 2004). De plus, les endosomes de recyclage, positifs pour Rab11, présents dans le tronc dendritique sont aussi recrutés afin d'apporter des récepteurs AMPA ; ils sont délocalisés du tronc dendritique vers l'intérieur de l'épine, suite à l'induction de la LTP (Brown et al., 2007). Ces données ont été confirmées par l'équipe de Wang. Ils ont constaté que l'inhibition de l'interaction entre Rab11 et le moteur moléculaire MyosinV, empêchait le recrutement des endosomes dans les épines dendritiques, suite à l'activation des récepteurs NMDA_un protocole utilisé pour induire la potentialisation synaptique dans des cultures de neurones d'hippocampe (Wang et al., 2008c).
Les endosomes, en plus de l'apport de récepteurs, fournissent de la membrane pour la formation et l'élargissement des épines dendritiques (Park et al., 2006). Ils sont aussi une source de membrane en soi, c'est-à-dire indépendamment de l'apport de récepteurs. En effet, l'expression d'un mutant dominant négatif de Rab4 n'altère pas significativement la LTP ni la distribution des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA, en revanche il provoque une réduction drastique de la taille des épines dendritiques (Brown et al., 2007).

1.3.3.4. Les protéines de la densité postsynaptique

La protéine majoritaire de la PSD, PSD95 sert de brique de base pour l'assemblage de la PSD et de point d'ancrage pour le recrutement de récepteurs et de complexes de signalisation. PSD-95 est directement impliquée dans la plasticité synaptique (Migaud et al., 1998), en effet PSD95 est nécessaire à l'insertion des récepteurs AMPA dans les synapses

(Ehrlich and Malinow, 2004) et à l'élargissement des épines suite à une LTP (Ehrlich et al., 2007). De plus, la surexpression de PSD-95 provoque l'augmentation de la taille et du nombre d'épines dendritiques (El-Husseini et al., 2000). PSD-95 intervient aussi dans la maturation et la stabilisation des synapses (De Roo et al., 2008). L'induction de la LTP par activation locale directe à l'aide de glutamate photolysé, induit dans un premier temps la déstabilisation de la PSD, à travers le remplacement rapide et transitoire de PSD-95 et SHANK2 (Steiner et al., 2008).

La protéine Shank, via sa capacité à recruter Homer (protéine qui interagit avec les récepteurs métabotropiques du glutamate) à la PSD, favorise la maturation des épines dendritiques et l'élargissement des têtes des épines (Sala et al., 2001). Cependant, l'expression d'un variant d'épissage de Homer (Homer1a) sous l'effet de l'activité synaptique, a un effet négatif sur la maturation des synapses ; il effectue ainsi un rétrocontrôle négatif de la structure et de la fonction synaptique (Sala et al., 2003).

1.3.3.5. Autres acteurs moléculaires

Molécules d'adhérence

Le maintien des épines nouvellement formées et de leurs synapses nécessite de conserver la liaison des structures présynaptiques et postsynaptiques. Cette liaison est assurée par les molécules d'adhérence. Par exemple, la N-cadhérine via son interaction avec elle-même (Bozdagi et al., 2000) et avec la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA (Saglietti et al., 2007). La molécule d'adhérence nétrine-G permet aussi le maintien des synapses via son interaction avec PSD95 (Kim et al., 2006a).

La métalloprotéase de la matrice MMP-9 (matrix metalloproteinase 9), est une protéase extracellulaire, nécessaire au maintien de la LTP (Nagy et al., 2006) et à la mémorisation à long terme (Nagy et al., 2007) (test de rappel de la mémoire dans une tâche d'évitement passif ; en l'occurrence, la mémoire est testée en fonction de la capacité des rats à éviter un choc électrique). L'une des cibles de la MMP-9 est la télencéphaline (Tian et al., 2007). La télencéphaline est une molécule d'adhérence de la famille des immunoglobulines, nécessaire au maintien de la LTP (Sakurai et al., 1998), à la formation des filopodes et qui retarde la synaptogenèse (Matsuno et al., 2006). La MMP-9 a pour cible d'autres molécules d'adhérence comme les intégrines, elle permet le remodelage de l'environnement des épines afin de permettre leur élargissement (Wang et al., 2008b).

Récepteurs aux neurotransmetteurs

L'expression des récepteurs à la surface de la membrane postsynaptique est nécessaire au maintien des épines dendritiques. En effet le blocage pharmacologique du récepteur NMDA augmente la motilité des épines ; et l'inhibition de l'expression de la sous-unité NR1du récepteur NMDA, par la technique de l'ARN interférant augmente la motilité des épines et induit leur disparition (Alvarez et al., 2007). De même, des tranches d'hippocampe de souris invalidées pour le gène de NR1 présentent une diminution du nombre d'épines (Ultanir et al., 2007) ; cependant ces épines ont une taille moyenne plus grande, suggérant un mécanisme compensatoire. En revanche, la surexpression de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA dans des neurones d'hippocampe en culture, induit une augmentation de la taille et du nombre d'épines; et induit même la formation d'épines dans des interneurones GABAergiques de l'hippocampe d'ordinaire non-épineux (Passafaro et al., 2003).

Protéines kinases et phosphatases de la signalisation transynaptique

De nombreuses protéines kinases et phosphatases sont impliquées dans la plasticité synaptique. La plus étudiée, la CamkII (Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II) est indispensable à la potentialisation à long terme (Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989; Pettit et al., 1994; Lledo et al., 1995). Le grossissement des épines dendritiques suite à l'induction de la LTP, par l'activation locale directe à l'aide de glutamate photolysé, dans la région CA1 d'hippocampe en tranche, nécessite la CamkII (Matsuzaki et al., 2004). La CamkII phosphoryle de nombreuses molécules de la signalisation transynaptique. Ces substrats sont notamment les récepteurs glutamatergiques (McGlade-McCulloh et al., 1993), la stargazine (Tomita et al., 2005), PSD95 (Steiner et al., 2008), Homer1b (Yoshimura et al., 2002) etc. La protéine phosphatase, calcineurine est impliquée quant à elle dans la dépression à long terme (Klee et al., 1979; Mulkey et al., 1993; Mulkey et al., 1994). Les récepteurs tyrosine kinase tels les récepteurs Trk des facteurs neurotrophiques (NGF, BDNF et NT) sont impliqués dans la plasticité synaptique (Castren et al., 1993; Casey et al., 2002; Tanaka et al., 2008) ; et ceux de l'éphrine interviennent dans la morphogénèse des épines dendritiques (Dalva et al., 2000).

Lipides

La composition lipidique de la membrane est aussi importante pour le maintien des synapses et la morphologie des épines dendritiques. Les dendrites sont riches en radeaux

lipidiques ; il s'agit de microdomaines de cholestérol et de sphingolipides. Dans les cellules, les radeaux lipidiques sont impliqués dans le trafic membranaire, la formation de complexes protéiques de signalisation et la régulation du cytosquelette d'actine. L'équipe d'Hering a montré que la déplétion chimique du cholestérol et des sphingolipides dans des cultures de neurones d'hippocampe de rat, provoque la diminution du nombre d'épines dendritiques et l'augmentation de la taille des épines restantes (Hering et al., 2003). Une déplétion sévère de cholestérol et de sphingolipides conduit même à la mort neuronale. Ils ont observé aussi une augmentation de l'internalisation des récepteurs AMPA. Les radeaux lipidiques assurent la stabilité à la surface membranaire des récepteurs AMPA et ainsi le maintien des épines dendritiques.

1.4. Pathologie des épines dendritiques

La morphologie et le nombre des épines dendritiques étant intimement liés à la fonction neuronale, une altération de la structure de l'épine ou le dérèglement des mécanismes de formation et d'élimination des épines peut affecter les circuits neuronaux et induire toutes sortes de déficits cognitifs. En effet, de nombreuses maladies neurologiques sont associées à des altérations de la morphologie ou de la densité des épines. Des analyses post-mortem en microscopie électronique de cerveaux de patients atteints de différentes maladies neurologiques, montrent une perte des épines dendritiques dans différentes régions du cerveau et une modification de la taille des épines dendritiques (cf tableau 1).

Maladies	**Changements de l'épine**	**Région du cerveau touchée**	**Références**
Syndrome du X fragile	épines sont plus longues et plus tortueuses	néocortex	(Hinton et al., 1991)
	augmentation de la densité	néocortex	(Irwin et al., 2001)
Syndrome de Down	diminution de la densité	hippocampe	(Ferrer and Gullotta, 1990)
		néocortex occipital	(Takashima et al., 1981)
Niemman-Pick	diminution de la densité	néocortex temporal et frontal	(Masliah et al., 1989)
Maladie des motoneurones	diminution de la densité	néocortex frontal	(Ferrer et al., 1991)
Huntington	augmentation de la densité et de la taille	striatum	(Ferrante et al., 1991)
Alzheimer	diminution de la densité	néocortex	(Gertz et al., 1987)
		hippocampe	(Scheibel, 1979; De Ruiter and Uylings, 1987; El Hachimi and Foncin, 1990; Ferrer and Gullotta, 1990; Einstein et al., 1994)
	augmentation de la taille	néocortex	(Baloyannis et al., 1992)
	diminution de la taille	néocortex	(Scheff et al., 1990; Scheff and Price, 1993)
		hippocampe	(Einstein et al., 1994)
Démence Frontale	diminution de la densité	néocortex frontal	(Catala et al., 1988; Ferrer et al., 1991; Baloyannis et al., 2001)
Parkinson	diminution de la densité	locus coeruleus	(Patt and Gerhard, 1993)
		substance noire	(Patt et al., 1991)
Creutzfeldt-Jacob	augmentation de la taille	néocortex temporal	(Baloyannis et al., 1995)

Tableau 1 : Changements pathologiques des épines dendritiques dans le système nerveux chez l'homme (liste non exhaustive).

Parmi ces maladies neurologiques, certaines apparaissent durant le développement, telles que le syndrome de Down et le syndrome lié au X fragile, dans ces conditions, les filopodes ne sont pas convertis en épines matures, laissant les dendrites des adultes dans un état immature (Comery et al., 1997). D'autres maladies apparaissent à l'âge adulte, comme la maladie d'Alzheimer et les Démences Frontales. Dans la maladie d'Alzheimer (MA), des études immunocytochimiques post mortem ont permis de corréler davantage le dysfonctionnement

cognitif avec la perte des synapses plutôt qu'avec la mort neuronale (DeKosky and Scheff, 1990; Terry et al., 1991). Une des caractéristiques anatomopathologiques de la MA, est la présence de plaque formées par l'agrégation fibrillaire de peptide amyloïde bêta (Aβ). Ce peptide sous forme soluble provoque chez des neurones d'hippocampe de rat, la perte des épines dendritiques et une augmentation de la longueur des épines restantes (Lacor et al., 2007).

2. Le rôle de la voie endolysosomiale dans la fonction neuronale : implication dans les maladies neurodégénératives

2.1. Organisation et fonctions de la voie endolysosomiale

La composition protéique et lipidique de la membrane plasmique est déterminante pour le fonctionnement cellulaire, en particulier pour les neurones. En effet, les neurones sont des cellules extrêmement polarisées et dont la surface est extraordinairement étendue. Le maintien de la composition protéique de la surface membranaire conditionne leur capacité à recevoir, traiter et transmettre l'information nerveuse. Pour générer et maintenir leur morphologie, les neurones doivent envoyer sélectivement les protéines dans les compartiments axonaux ou somato-dendritique. Le réseau trans-Golgien assure le tri des protéines nouvellement synthétisées vers des vésicules qui assureront leur transport jusqu'à la surface membranaire de l'axone et des dendrites. La voie endocytaire joue, elle, un rôle dans la régulation homéostatique des récepteurs membranaires. Les protéines membranaires circulent constamment entre la surface cellulaire et des compartiments internes spécialisés dans le tri de protéines, les endosomes. Aussi, les protéines transmembranaires mal repliées, les récepteurs des facteurs de croissance activés, les récepteurs des hormones et des cytokines, sont pris en charge par la voie endolysosomiale et dégradés. Alors que les récepteurs des neurotransmetteurs ou les récepteurs des facteurs neurotrophiques peuvent être endocytés puis ré-exprimés à la surface membranaire, c'est-à-dire recyclés.

La voie endolysosomiale est composée de différents organelles intracellulaires, les endosomes. Le réseau endosomial est composé d'endosomes de recyclage, d'endosomes précoces, d'endosomes tardifs et de lysosomes. Les protéines endocytées depuis la surface membranaire sont, une fois dans les endosomes précoces, soumises à tri, à l'issue duquel elles seront dirigées soit vers la voie de recyclage, soit vers la voie de dégradation. Deux modèles ont été proposés pour décrire l'acheminement des protéines jusqu'aux endosomes tardifs, étape qui précède la dégradation. Le modèle du transport par vésicules propose que les compartiments précoces et tardifs préexistent et qu'ils communiquent via un trafic vésiculaire dépendant des microtubules (Griffiths and Gruenberg, 1991). Le second modèle propose que les endosomes précoces deviennent graduellement des endosomes tardifs et des lysosomes (Murphy, 1991). Ces modèles sont tous deux encore discutés à l'heure actuelle.

Les protéines transmembranaires de surface sont incluses dans des vésicules, formées par endocytose de la membrane plasmique via des puits de clathrine, des cavéoles, ou des voies indépendantes de ces deux structures majeures.

La clathrine a donné son nom à une voie d'endocytose car elle représente le constituant principal des structures membranaires spécialisées, les puits recouverts de clathrine (Grant and Donaldson, 2009). La clathrine est constituée de trois chaînes lourdes associées par leur domaine C-terminal, chacune d'elles étant associée à une chaîne légère. Lors de l'endocytose, la protéine adaptatrice AP-2 recrute la clathrine, permettant la formation locale d'un pavement de clathrine et l'invagination de la membrane. La GTPase dynamine est ensuite requise pour terminer la formation de la vésicule d'endocytose ; la dynamine se multimérise autour du cou de la vésicule naissante, et son action mécanique provoque la fission de la membrane (Roux et al., 2006). Le manteau de clathrine, visualisé en microscopie électronique, a été appelé « triskèle », par analogie au symbole celte. Les récepteurs de la transferrine, des lipoprotéines de basse densité (LDL), de l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou de l'insuline sont internalisés de manière dépendante de la clathrine.

Les cavéoles ont une structure particulière en oméga inversé et sont constituées de cavéoline (Parton and Simons, 2007). Les cavéolines forment de grands oligomères et sont liées à la membrane plasmique grâce à la palmitoylation de leur domaine C-terminal. La cavéoline liant le cholestérol, les cavéoles sont particulièrement enrichies en cholestérol et en glycosphingolipides. Les cavéoles permettent l'internalisation du récepteur de l'EGF et du TGF (Transforming growth factor), des intégrines et de leur ligand, la fibronectine ; et de diverses glycoprotéines associées aux radeaux lipidiques. Par ailleurs, les cavéoles ont été détournée par les micro-organismes pathogènes (virus et bactéries), qui les utilisent comme voie d'entrée dans la cellule ; elles permettent aussi l'internalisation de toxines bactériennes.

Les vésicules d'endocytose fusionnent ensuite avec les endosomes précoces ou endosomes de tri. Les endosomes précoces ont une morphologie tubulo-vésiculaire. D'une part, par tubulation de leur membrane, ils peuvent former des vésicules ; les protéines destinées à être recyclées sont incluses dans ces vésicules. Ces vésicules sont alors nommées endosomes de recyclage et sont capables de fusionner directement avec la membrane plasmique. Les endosomes de recyclage constituent un pool de réserve de protéines transmembranaires et de

lipides. D'autre part, par invagination de leur membrane, les endosomes précoces peuvent former des vésicules intraluminales ; les cibles destinées à être dégradées sont incluses dans ces vésicules intraluminales. Tandis que ces microvésicules internes s'accumulent, l'endosome de tri va s'acidifier en acquérant des hydrolases acides, on le nomme alors endosome tardif ou corps multivésiculés (MVB, MultiVesicular Body ou MVE, MuliVesicular Endosome). Enfin, les protéines cibles seront dégradées par les hydrolases lysosomiales suite à la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes.

Il est possible de suivre en fonction du temps, le parcours d'une protéine endocytée à travers les différents compartiments endosomiaux. Chaque compartiment se caractérise ainsi à la fois par sa position (précoce ou tardive) au cours de cette cinétique, et par sa composition protéique spécifique (Schmid et al., 1988; Beaumelle et al., 1990).
La protéine EEA1 (early endosome associated protein 1) est associée aux endosomes précoces (Mu et al., 1995). Le récepteur de la transferrine circule uniquement à travers les endosomes de recyclage (Dautry-Varsat et al., 1983; Klausner et al., 1983), et est ainsi utilisé comme marqueur de ces endosomes. Les petites protéines G de la famille des Rab sont distribuées le long de la voie endolysosomiale. Elles contrôlent la reconnaissance hétéro et homotypique des divers types d'endosomes lors de leur fusion. Les protéines Rab11 et Rab4 sont situés au niveau des endosomes de recyclage, Rab4 et Rab5 au niveau des endosomes de tri, Rab7 et Rab9 au niveau des endosomes tardifs (Pfeffer, 2001). Le récepteur au mannose-6-phosphate est associé aux endosomes tardifs (Griffiths et al., 1988). Les glycoprotéines lgp120 (ou LAMP1, Lysosomal Associated Membrane Protein 1) et CD63 (Cluster of Differentiation 63, ou LAMP3 Lysosomal Associated Membrane Protein 3) sont associées aux endosomes tardifs et aux lysosomes (Lewis et al., 1985; Metzelaar et al., 1991).
Ces divers marqueurs permettent donc de suivre, par colocalisation, la succession des compartiments traversés par une protéine endocytée.

Le système endolysosomial est présent dans tous les types cellulaires, cependant dans les neurones les endosomes ont des localisations particulières (Cooney et al., 2002), cf. figure 7. En effet, le tronc axonal est presque dépourvu d'activité endocytaire. L'internalisation se produit uniquement dans les terminaisons axonales, afin de récupérer la membrane de vésicules fusionnées suite à la libération des neurotransmetteurs (Heuser, 1989). Les dendrites en revanche, possèdent une activité endocytaire intense sur toute leur longueur. Les épines dendritiques possèdent des endosomes précoces tubulés mais pas vésiculés. Les endosomes

multivésiculés sont localisés au pied des épines et transportés le long des dendrites, via les microtubules, jusqu'au soma pour fusionner avec les lysosomes. Les lysosomes sont centralisés au niveau du corps cellulaire et des segments proximaux des dendrites.

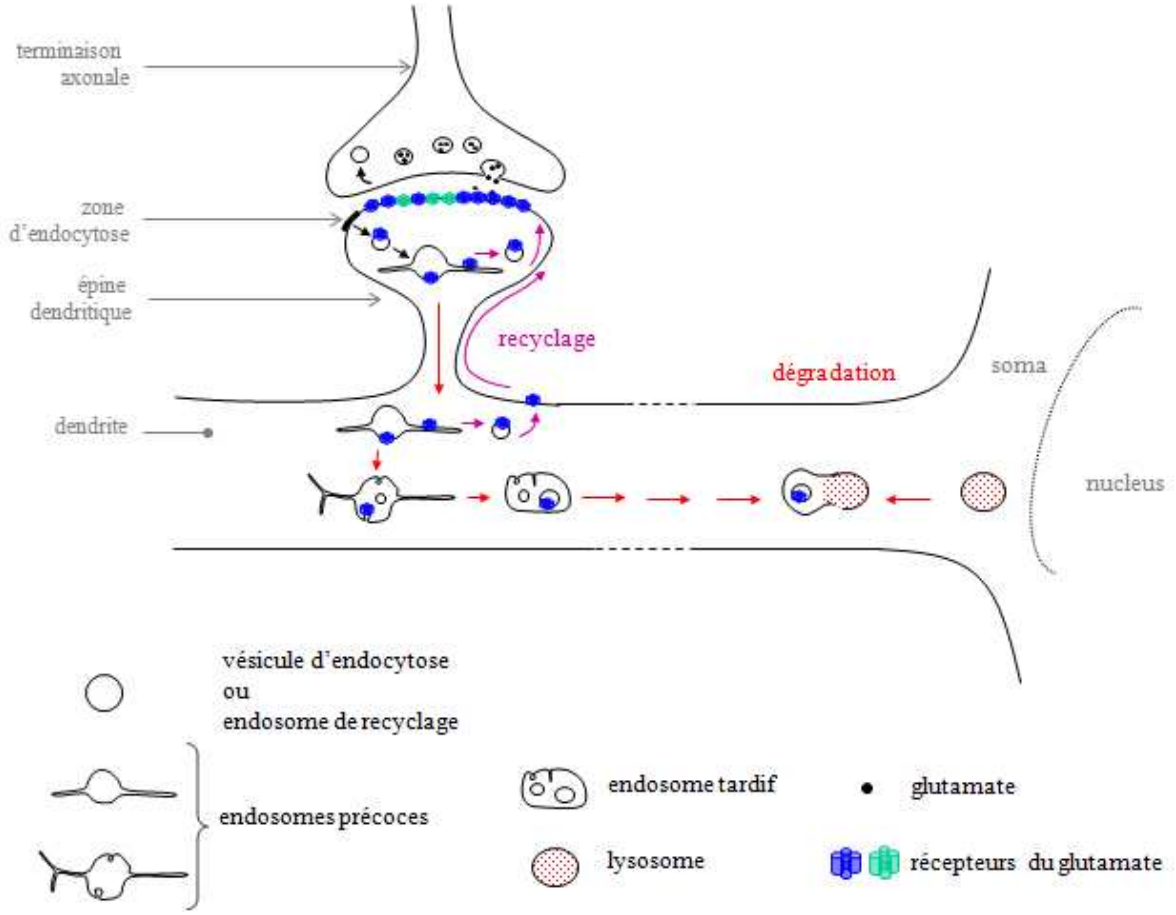


Figure 7 : Représentation schématique de la voie endolysosomiale dans un neurone. Les endosomes précoces sont présents dans les épines dendritiques, les endosomes tubulovésiculaires et multivésiculés sont localisés aux pieds des épines dendritiques ; alors que les lysosomes sont centralisés au niveau du soma. L'endocytose des récepteurs à lieu au niveau de la zone d'endocytose, localisée à proximité de la densité postsynaptique.

2.1.1. Rôle de la voie endolysosomiale dans la fonction neuronale

Le fait qu'une protéine endocytée soit dégradée plutôt que recyclée dépend de motifs présents dans sa structure, mais aussi de signaux physiologiques qui peuvent modifier la proportion de substrats retenus dans les endosomes tardifs. De tels signaux peuvent profondément altérer l'équipement d'une cellule en récepteurs spécifiques. Des régulations de ce type peuvent jouer un rôle majeur dans les fonctions spécifiques des neurones.

L'expression en surface des récepteurs des facteurs neurotrophiques est contrôlée par la voie endolysosomiale. Les récepteurs Trk sont endocytés de manière clathrine dépendante (Grimes et al., 1997; Zheng et al., 2008), et peuvent être adressés aux lysosomes pour y être dégradés, recyclés au niveau de la membrane plasmique ou bien transportés de manière rétrograde vers le soma (Chen et al., 2005b; Saxena et al., 2005). Une étude menée par Santi et al. a montré que le recyclage et la re-sécrétion du BDNF jouaient un rôle important dans le maintien de la potentialisation à long terme dans des tranches d'hippocampe, suggérant un rôle du recyclage des récepteurs TrkB dans la régulation de la LTP (Santi et al., 2006).

Les données concernant le trafic des récepteurs aux neurotransmetteurs dans les mécanismes de LTP et de LTD sont nombreuses. Les premières études impliquèrent dans la mise en place de la LTP la fusion de membranes au niveau postsynaptique (Lledo et al., 1998), et l'insertion de récepteurs AMPA dans les épines dendritiques (Shi, 1999; Hayashi, 2000). L'endocytose clathrine dépendante des récepteurs AMPA, est impliquée dans la mise en place de la LTD (Carroll et al., 1999b; Beattie, 2000; Man et al., 2000; Lee et al., 2002). Cependant les mécanismes d'endocytose et d'exocytose des récepteurs AMPA sont tous deux nécessaires à la LTP. En effet, l'endocytose des récepteurs AMPA est nécessaire à l'induction de la LTP (Luscher et al., 1999) et dépend de la dynamine, l'inhibition biochimique ou l'expression d'un mutant dominant négatif de la dynamine empêche l'induction de la LTP (Carroll et al., 1999a).

Les études d'Ehlers et Lin, ont montré que l'activité synaptique régule finement la composition en récepteurs de la membrane postsynaptique et le devenir de ces récepteurs une fois endocytés. Ils peuvent être différentiellement envoyés vers les endosomes de recyclage ou vers la voie de dégradation. Les récepteurs AMPA sont retirés de la membrane

postsynaptique suite à une activation des récepteurs NMDA puis sont rapidement réinsérés dans la membrane postsynaptique (Ehlers, 2000; Lin et al., 2000). En revanche une activation des récepteurs AMPA sans activation des récepteurs NMDA, conduit les récepteurs AMPA endocytés vers les endosomes tardifs et les lysosomes (Ehlers, 2000).

Le travail d'Ehlers et de ses collaborateurs a révélé la présence de zones d'endocytose (EZ, Endocytic Zone) au niveau des membranes des épines, à proximité des PSD (Blanpied et al., 2002) (cf figure 7). Il est possible d'y observer la formation de puits de clathrine (Blanpied et al., 2002), et la localisation des protéines AP2 et dynamine (Racz et al., 2004). Les EZ sont stables car couplées à la PSD grâce à l'interaction direct entre la dynamine 3 et Homer, et via le complexe Homer/Shank (Lu et al., 2007). Les récepteurs AMPA seraient préférentiellement endocytés au niveau des EZ ; en effet l'expression d'un mutant de la dynamine n'interagissant plus avec Homer, casse la liaison de la zone d'endocytose et la PSD et provoque la perte des récepteurs AMPA synaptiques ; ainsi que la diminution de la transmission synaptique (Lu et al., 2007). La présence de la zone d'endocytose à proximité de la PSD permettrait une endocytose et un recyclage local des récepteurs AMPA, assurant ainsi leur stabilité à la synapse. Les épines dépourvues d'EZ voient leurs récepteurs AMPA diffuser librement dans la membrane vers des zones d'endocytose plus distantes ; dans ce cas, l'absence de recyclage local, empêche la recapture des récepteurs conduisant à leur perte au niveau de la synapse.

Les acteurs protéiques du tri des récepteurs aux neurotransmetteurs vers les différentes voies endosomiales commencent à être connus. Les récepteurs NMDA sont des composants stables de la PSD chez l'adulte. En revanche durant le développement, ils sont soumis à une forte endocytose. Les sous-unités des récepteurs NMDA interagissent, avec différentes affinités, avec la protéine adaptatrice AP2. Ces différences dans l'interaction avec AP2 induisent la sous-unité NR2A à diriger les récepteurs vers la voie de dégradation ; et la sous-unité NR2B à les diriger vers la voie de recyclage (Lavezzari et al., 2004). Les récepteurs AMPA sont quant à eux continuellement soumis à une endocytose constitutive et à une endocytose dépendante de l'activité synaptique. L'envoi des récepteurs AMPA vers la voie de recyclage est régulé par la protéine NEEP21 (Neuron-Enriched Endosomal Protein 21 kDa). La perte de fonction de NEEP21 diminue le taux de recyclage de GluR1 et GluR2, suite à la stimulation de leur endocytose (Steiner et al. 2002). Dans le cas de GluR2, cet effet est médié par l'interaction, activité dépendante, entre NEEP21 et GRIP1 (GluR2 Interacting Protein 1). L'inhibition de cette interaction par la surexpression d'un fragment de NEEP21 interagissant

avec GRIP1 et agissant comme un dominant négatif, provoque l'accumulation de GluR2 dans les endosomes précoces et les lysosomes (Steiner et al., 2005).

2.1.2. Les complexes ESCRT, agents du tri endolysosomial

Les analyses génomiques et phylogénétiques comparatives ont révélé une forte conservation de la machinerie de tri responsable de l'acheminement des protéines transmembranaires vers les endosomes tardifs et les lysosomes (Field and Dacks, 2009). Cette machinerie est le mieux décrite dans le cas de la levure.

Selon le mécanisme le plus décrit, le marquage des protéines membranaires destinées à être endocytées et dégradées (récepteurs de surface par exemple) s'effectue par la multi-ubiquitination des portions cytosoliques. L'ubiquitine est une petite protéine identifiée tout d'abord comme étant un marqueur des protéines (notamment cytosoliques) destinées à être dégradées par le protéasome. Cependant, elle est aussi un marqueur des protéines membranaires destinées à être dégradées par les lysosomes. L'ubiquitine représente le principal signal d'envoi des protéines vers la voie de dégradation. Les protéines cibles sont ubiquitinylées au niveau de la membrane plasmique, puis endocytées. Une fois dans l'endosome précoce, elles sont transférées dans des micro-vésicules intraluminales, puis gagnent les endosomes tardifs. Elles seront ensuite dégradées par les hydrolases lysosomiales, suite à la fusion des corps multivésiculés avec les lysosomes.
Le transfert des protéines ubiquitinylées dans les microvésicules requiert la participation séquentielle des complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complexe Required for Transport).

Les gènes des complexes ESCRT ont tout d'abord été identifiés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* par le phénotype vacuolaire spécifique dit de « Classe E », conféré par leurs allèles déficients. La vacuole est l'équivalent du lysosome chez la levure. Parmi les différentes classes de mutants Vps (vacuolar protein sorting) affectés dans l'acheminement de protéines marqueurs vers la vacuole, la classe E se caractérise par la présence d'endosomes anormalement grands, retenant du matériel normalement destiné à la vacuole (Raymond et al., 1992). Les Vps de classe E ont des homologues chez les mammifères, qui font partie des complexes ESCRT-0, -I, -II ou -III, ou bien sont associés à ces complexes (cf. tableau 2). Des aspects fondamentaux de la biogénèse des endosomes multivésiculés et de la fonction des ESCRT ont été conservés à travers l'évolution ; cependant, la fonction exacte de chaque

protéine ESCRT chez les mammifères pourrait différer partiellement de celle de son homologue chez la levure. De plus ces protéines présentent de nombreuses isoformes (cf. tableau 2), suggérant l'acquisition chez les mammifères de nouvelles fonctions.

Par exemple, les protéines du complexe ESCRT-II sont impliquées dans la localisation de l'ARNm bicoïd dans l'embryon de Drosophile (Irion and St Johnston, 2007). La localisation antérieure précise de cet ARNm est indispensable à la mise en place d'un gradient morphogène le long de l'axe antéropostérieur qui définit la tête et le thorax de l'embryon. Le mutant de VPS22 provoque la formation d'un gradient dans la moitié antérieure de l'embryon, induisant un phénotype semi-létal. Le phénotype des mutants de VPS25 et VPS36 est létal, les Drosophiles ne pondent pas d'œuf.
La protéine CHMP1 est probablement impliquée dans la répression de l'expression génique. En effet, une analyse double hybride dans la levure révèle une interaction entre CHMP1 et des protéines semblables aux Polycombs de la Drosophile et de la souris (Stauffer et al., 2001). Leurs analyses suggèrent que CHMP1 forme des domaines de chromatine condensée, inaccessibles à la nucléase, dans des cellules HEK293. Plus récemment CHMP1A a été identifié comme suppresseur de tumeur, en particulier dans le pancréas (Li et al., 2008).

Levure	Mammifères	Complexes
Vps27	Hrs	ESCRT-0
Hse1	STAM 1, 2	ESCRT-0
Vps23	TSG101	ESCRT-I
Vps37	VPS37 A, B, C, D	ESCRT-I
Vps28	VPS28	ESCRT-I
Vps36	EAP45	ESCRT-II
Vps22	EAP30	ESCRT-II
Vps25	EAP20	ESCRT-II
Snf7 (Vps32)	CHMP4 A, B, C	ESCRT-III
Vps20	CHMP6	ESCRT-III
Vps2	CHMP2 A, B	ESCRT-III
Vps24	CHMP3	ESCRT-III
Bro1	Alix	associée à ESCRT-I et ESCRT-III
Vta1	LIP5	ATPase, associée à CHMP5
Vps60	CHMP5	associée à à LIP5
Vps46 (Did2)	CHMP1 A, B	?
Vps4	VPS4 A, B (SKD1)	ATPase, associée à ESCRT-III

Tableau 2 : Protéines de tri vacuolaires Vps (Vacuolar protein sorting) de la levure et leurs homologues chez les mammifères, et les complexes auxquelles les protéines de mammifères appartiennent. Adapté depuis (Russell et al., 2006).

Selon un modèle qui synthétise les résultats obtenus chez la levure et les mammifères, les quatre complexes, ESCRT-0, -I, -II et -III, sont recrutés de manière séquentielle au niveau des endosomes via des interactions lipidiques et protéiques (cf. figure 8).

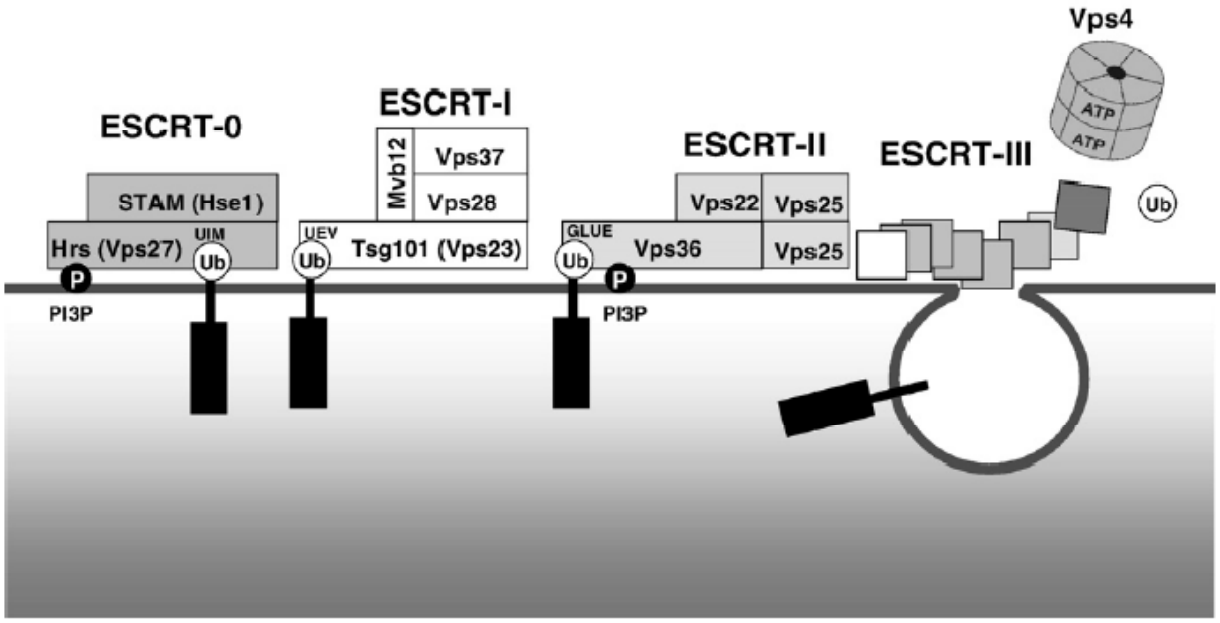


Figure 8 : Représentation schématique des complexes ESCRT dans la biogenèse des endosomes multivésiculés (MVE, MultiVesicular Endosome). Vsp 36 = EAP45, Vps22 = EAP30, Vps25 = EAP20 et Vps4 = VPS4. Entre parenthèse sont indiqués les noms des sous unité des complexes dans la levure. D'après (Stuffers et al., 2009).

Le complexe ESCRT-0 initie la reconnaissance sélective de l'ubiquitine grâce aux protéines Hrs (Hepatocyte groxth factor (HGF)-regulated Tyrosin kinase substrate) et STAM (signal transducing adaptor molecule) ; et s'associe aux endosomes grâce l'interaction entre Hrs et le phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P). Hrs recrute ensuite le complexe ESCRT-I via son interaction avec TSG101 (Tumor suppressor gene 101).

Le complexe ESCRT-I est composé des protéines TSG101, VPS37, VPS28 et MVB12 (Katzman David, 2001). TSG101 interagit avec l'ubiquitine. Le complexe central TSG101-VPS37 recrute MVB12 et VPS28. VPS28 recrute à son tour le complexe ESCRT-II via son interaction avec EAP45 (Morita et al., 2007).

Le complexe ESCRT-II est constitué des protéines EAP30, EAP20, et EAP45 (Babst et al., 2002b). EAP45 interagit avec l'ubiquitine et le PtdIns3P. EAP20 quant à elle interagit avec CHMP6, composante du complexe ESCRT-III.
Le complexe ESCRT-III est composé de différents membres de la famille des CHMP (Charged Multivesicular Body Protein), CHMP2, CHMP3, CHMP4 et CHMP6 (Babst et al., 2002a). Les protéines CHMP2-CHMP3 et CHMP4-CHMP6 formeraient deux sous-complexes. CHMP3 conserve l'interaction avec le PtdIns3P. Le complexe ESCRT-III n'a pas

de domaine de reconnaissance de l'ubiquitine, en revanche CHMP3 recrute la désubiquitinase AMSH (Associated Molecule of **S**H3 domain of **S**TAM) (Agromayor and Martin-Serrano, 2006) ; qui désubiquitinyle la protéine avant qu'elle ne soit endocytée.

2.1.3. Les protéines de la famille CHMP

Les CHMP sont de petites protéines polarisées. Les membres de la famille, 10 au total chez les mammifères, ont tous la même organisation. Les protéines sont formées de 6 hélices alpha ; les 3 premières hélices forment un domaine N-terminal basique (chargé positivement, en bleu dans la figure 9.a).et les 3 dernières hélices forment un domaine C-terminal acide (chargé négativement, en rouge dans la figure 9.a).

Les protéines CHMP existent sous forme inactives cytosoliques (Zamborlini et al., 2006; Lata et al., 2008a) le domaine acide est alors replié sur le domaine basique (cf. figure 9.b). Le fait de lever l'auto-inhibition permet le recrutement des CHMP au niveau des membranes (Lin et al., 2005; Muziol et al., 2006; Shim et al., 2007) et induit les CHMP à former des homo- et hétéro-polymères transitoires à la surface des endosomes (Saksena et al., 2007; Williams and Urbe, 2007). L'auto-inhibition est levée par la troncature de la partie C-terminale acide des CHMP. La configuration ouverte rend accessible la zone d'interaction (domaine basique) avec les membranes (cf. figure 9.c).

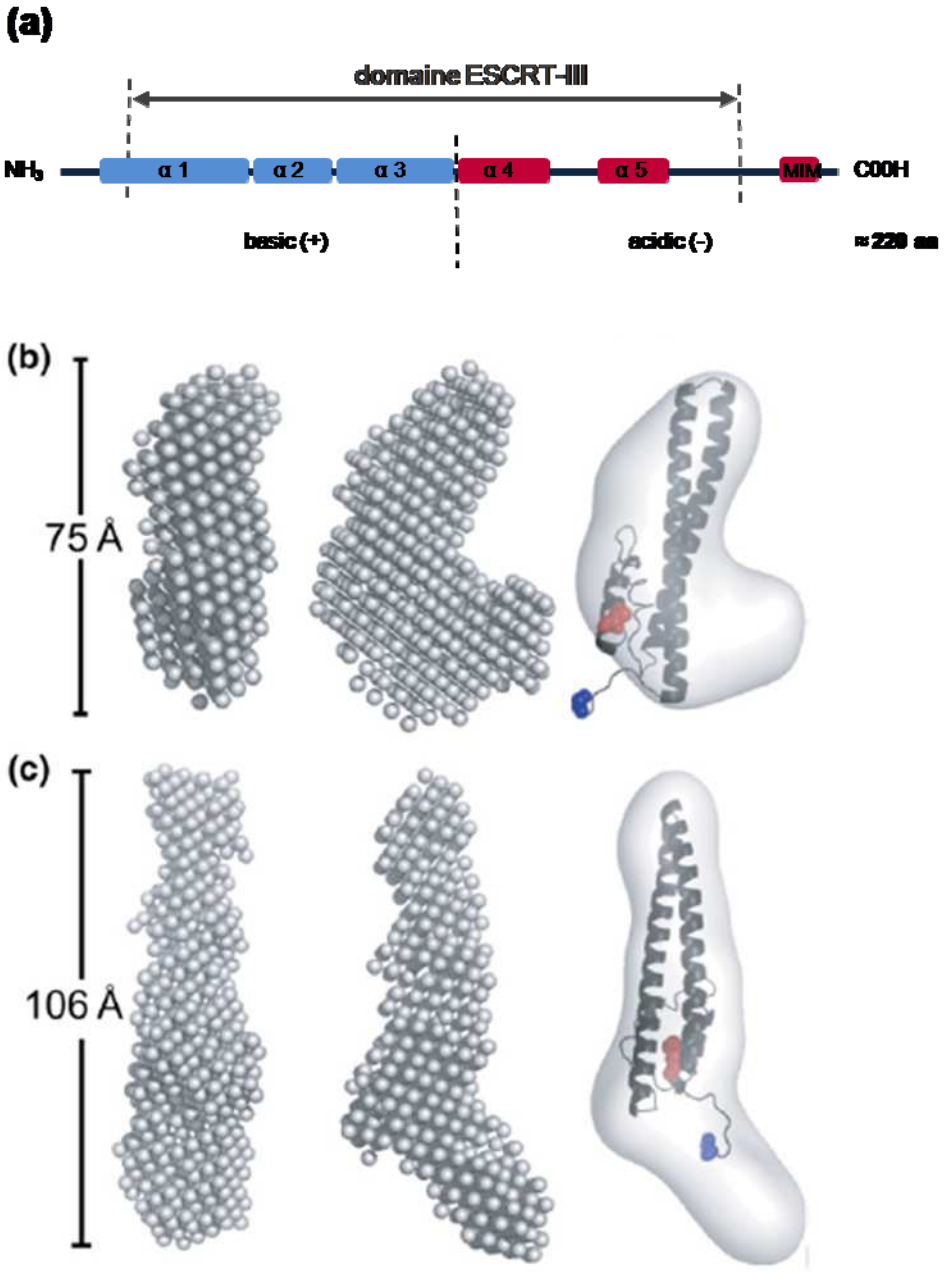


Figure 9 : (a) Représentation schématique de la structure secondaire des protéines CHMP du complexe ESCRT-III. Les CHMP sont des petites protéines d'environ 24 kDa, formées de 6 hélices alpha. Les 3 premières hélices du domaine N-terminal forme un domaine basique chargé positivement (en bleu) ; les 3 dernières hélices du domaine C-terminal forme un domaine acide chargé négativement (en rouge). La dernière hélice possède un domaine MIM (MIT Interacting Motif). Configurations fermée (b) et ouverte (c) de CHMP3. La structure cristallographique du domaine ESCRT-III (en épingle formée d'hélices alpha) est inscrite à l'intérieur du contour mesuré par diffusion X aux petits angles. Le basculement du domaine C-terminal (en rouge) rend accessible la surface d'interaction avec les membranes lipidiques (tournée vers la droite). L'adsorption aux membranes et la polymérisation des protéines sont couplées. Le domaine C-terminal recrute alors l'ATPase VPS4, qui dissocie les polymères. D'après (Lata et al., 2008a).

La sixième hélice alpha des CHMP forme un domaine MIM (MIT « Microtubule Interacting and Transport » Intercation Motif) (cf. figure 9.a). Dans la configuration ouverte, le domaine MIM est accessible et peut interagir avec le domaine MIT, porté par l'AAA-ATPase VPS4. C'est l'activité ATPase VPS4 de qui permet le désassemblage des polymères de CHMP (Babst et al., 1998). Les facteurs régulant l'ouverture ou la fermeture des CHMP commencent seulement à être identifiés ; des résultats très récents indiquent que Vps25 (ESCRT-II) active directement la fonction de vésiculation membranaire d'ESCRT-III (Im et al., 2009).

CHMP2 et CHMP3 forment chez la levure un sous-complexe (Babst et al., 2002a). Il est possible d'observer *in vitro* la formation d'hétéropolymères de CHMP2A et CHMP3 (Lata et al., 2008b). Cependant, il n'est pas possible d'observer une interaction des formes entières de CHMP2A et CHMP3. La formation de structures tubulaires est obtenue avec les formes tronquées, dépourvues d'une partie de leur extrémité C-terminale acide (CHMP2AΔC + CHMP3ΔC) ; c'est-à-dire en configuration ouverte, active. L'analyse en cryo-microscopie électronique révèle une structure tubulaire produite par les CHMP.

Il est aussi possible d'observer des tubes avec la forme entière de CHMP3 et CHMP2AΔC (cf. figure 10.A.). La partie C-terminale de CHMP3 est orientée à l'intérieur du tube et peut interagir avec VPS4B. L'ajout d'ATP induit la dépolymérisation des tubes. Les parties basiques de CHMP3 et CHMP2A sont exposées à l'extérieur des tubes, rendant une interaction avec les membranes possible. En effet, les polymères CHMP3ΔC-CHMP2AΔC s'associent *in vitro*, à des vésicules géantes synthétiques, composées de lipides (SOPC: 1-stéaroyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine). Les tubes peuvent changer, de manière non systématique, la courbure des vésicules lipidiques. En revanche, l'ajout du lipide DOPS (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphosérine) provoque la formation de tubes plus courts (cf. figure 10.B.), de filaments dont la frome évoque des hélices amples (cf. figure 10.C.) ; et les extrémités des tubes ont une forme conique (cf. figure 10.D.).
Ces observations suggèrent que la composition lipidique membranaire de la cellule peut influencer la structure supramoléculaire des polymères de CHMP.

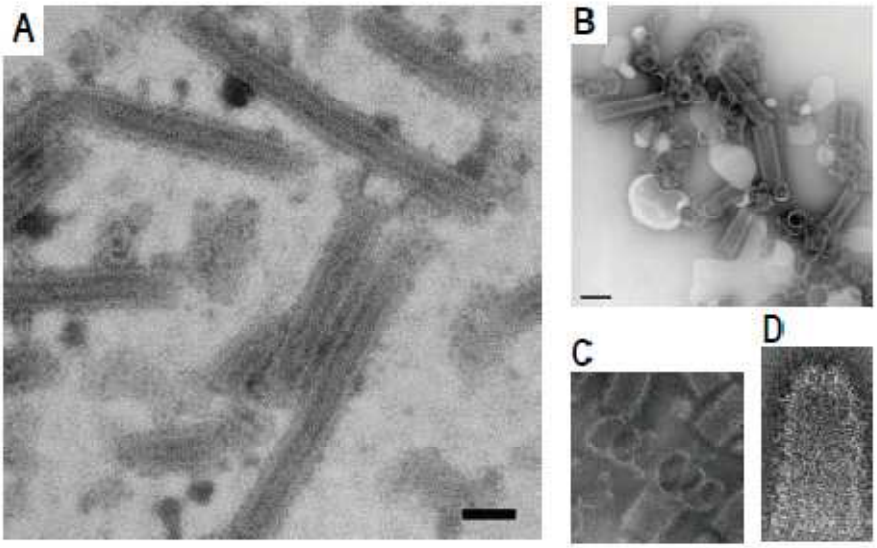


Figure 10 : Polymères de CHMP3-CHMP2A observés en microscopie électronique par marquage négatif. **A**. Polymères de CHMP3-CHMP2AΔC contenant dans la lumière du tube VPS4B. Échelle : 100 nm. **B**. Polymères de CHMP3ΔC-CHMP2AΔC assemblés en présence de larges vésicules composées des lipides DOPS:SOPC. Échelle : 100 nm. En présence de DOPS:SOPC les polymères de CHMP3ΔC-CHMP2AΔC, (**C**) forment des hélices amples (largeur de l'image ≈ 230 nm) et (**D**) leurs extrémités sont coniques (largeur de l'image ≈ 65 nm). Adapté de (Lata et al., 2008b).

L'équipe de Williams a quant à elle montré que l'homologue de CHMP3 dans la levure, Vps24, forme des filaments hélicoïdaux d'environ 15 nm de diamètre et de longueur variable, entre 80 et 2000 nm (Ghazi-Tabatabai et al., 2008). Contrairement à CHMP3, la forme entière de Vps24, est capable de s'assembler en filaments ; en revanche l'homologue de CHMP2, Vps2, ne forme pas de filaments. Ils ont aussi montré que Vps24 fusionnée à la partie C-terminale de Vps2, formaient des filaments ; sur lesquels l'ATPase Vps4 pouvait se fixer et induire le désassemblage des filaments. L'homologue de CHMP4, Snf7, forme lui aussi des polymères ; organisés différemment : en feuille, en anneaux et en filaments irréguliers (Ghazi-Tabatabai et al., 2008). Par ailleurs, surexprimées dans les cellules COS-7, les protéines CHMP4A ou CHMP4B s'assemblent en filaments circulaires sous la membrane plasmique ; le diamètre de ces filaments est de 5 à 6 nm (Hanson et al., 2008).

2.1.4. Formation des vésicules intraluminales des MVB

Le mécanisme de formation des vésicules du MVB par les ESCRT est aujourd'hui largement discuté, et de nombreux modèles ont été proposés.

Selon Nickerson et ses collaborateurs, les complexes ESCRT s'organiseraient en cercles concentriques autour du complexe ESCRT-0 (cf.figure 11). La formation d'anneaux d'ESCRT-III engendrerait la déformation de la membrane du MVB par les CHMP et ainsi la formation de vésicules ; l'hydrolyse de d'ATP par l'ATPase VPS4 fournirait l'énergie nécessaire à la scission finale de la vésicule et à la dépolymérisation des CHMP (Nickerson et al., 2007). Cependant ce modèle ne décrit pas comment, les complexes aideraient physiquement à créer des vésicules.

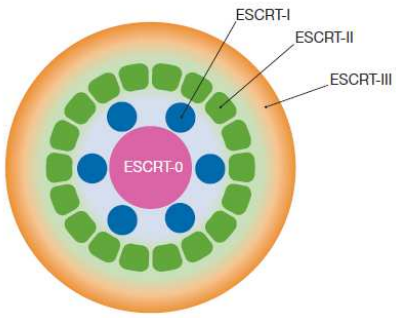


Figure 11 : Modèle concentrique de l'assemblage des ESCRT dans la formation vésicules du MVB. D'après (Nickerson et al., 2007).

Deux autres équipes décrivent, *in vitro*, un fonctionnement cyclique du complexe ESCRT-III, avec un assemblage ordonné comprenant trois étapes : la nucléation à partir de CHMP6 des filaments de CHMP4, la polymérisation de CHMP4, puis le capping de ces filaments par des hétéropolymères de CHMP3-CHMP2 (Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009).
Selon Saksena, la polymérisation de CHMP4 en spirale encerclerait les protéines destinées à être incluses dans les vésicules intraluminales ; et le confinement des protéines dans un espace restreint, engendrerait alors la déformation de la membrane du MVB et la formation de vésicules (cf. figure 12.a.). Une fois la vésicule formée, l'AAA-ATPase recrutée par le domaine MIM de CHMP3, désassemblerait le complexe (Saksena et al., 2009).

Wollert quant à lui se base sur les travaux de Hanson (Hanson et al., 2008) et propose que la polymérisation de CHMP4 en cercles concentriques sur les membranes, engendrerait la déformation de la membrane du MVB et la formation de vésicules (cf. figure 12.b.). L'équipe de Wollert montre que la dépolymérisation du complexe ESCRT est accomplie après la formation des vésicules (Wollert et al., 2009). Ainsi selon eux, seuls les ESCRT sont nécessaires à la scission des vésicules de la membrane du MVB.

En revanche, l'équipe de Hanson propose une polymérisation de CHMP4 en cercles excentriques ; et postule la nécessité de l'action de l'ATPase VPS4 pour désassembler la queue du filament de CHMP4 et permettre la formation de la vésicule (Hanson et al., 2008) (cf. figure 12.c.).

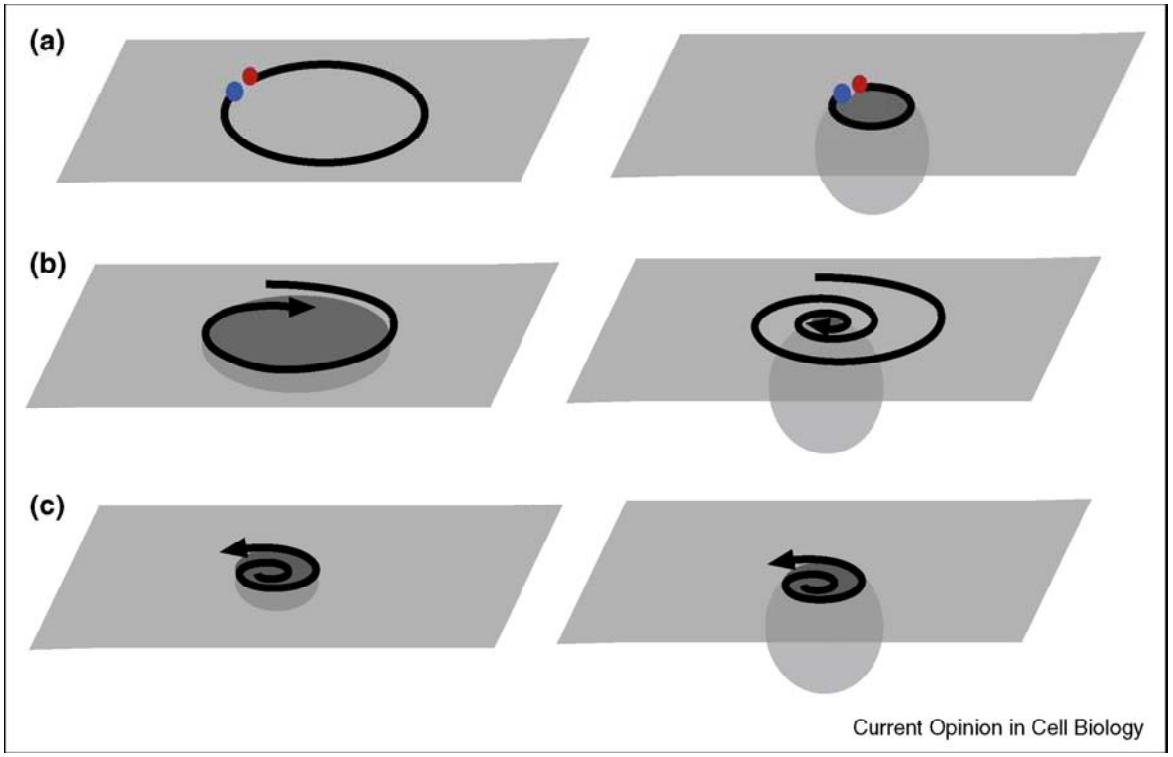


Figure 12 : Formation des vésicules du MVB par le complexe ESCRT-III. D'après (Hanson et al., 2009). (a) Modèle de Saksena. (b) Modèle de Wollert. (c) Modèle de Hanson.

L'équipe de Weissenhorn a montré que CHMP3 et CHMP2A forment des polymères et que ces polymères interagissent avec les lipides (Lata et al., 2008b). Ces chercheurs proposent que la polymérisation des CHMP sous la face cytosolique des membranes induit la déformation de celle-ci, puis la formation progressive d'une vésicule ; la fermeture du polymère permettrait le

rapprochement des membranes ; et enfin, la scission des membranes serait provoquée par la dépolymérisation des CHMP induite par l'activité ATPase de VPS4.

Les complexes ESCRT sont aussi mis en jeu dans d'autres processus topologiquement similaires à la formation des vésicules dans les endosomes (Carlton and Martin-Serrano, 2007). En effet, ils interviennent dans l'étape finale de la division cellulaire, la cytokinèse, où ils permettraient la séparation finale des cellules filles (Barr and Gruneberg, 2007) (cf. figure 13) ; ils sont recrutés par les virus afin de bourgeonner à l'extérieur de la cellule infectée (Bieniasz, 2006) (cf. figure 13). La forme activée de CHMP3, empêche le bourgeonnement des virus (Zamborlini et al., 2006). La fonction des ESCRT dans la cytokinèse et le bourgeonnement des virus fait intervenir une protéine adaptatrice, Alix (Alg2 Interacting Protein X ; Alg2 Apoptosis Link Gene 2). Alix est également impliquée dans le contrôle la mort cellulaire induite par le calcium (Trioulier et al., 2004) et la mort programmée des motoneurones durant le développement de l'embryon de poulet (Mahul-Mellier et al., 2006).

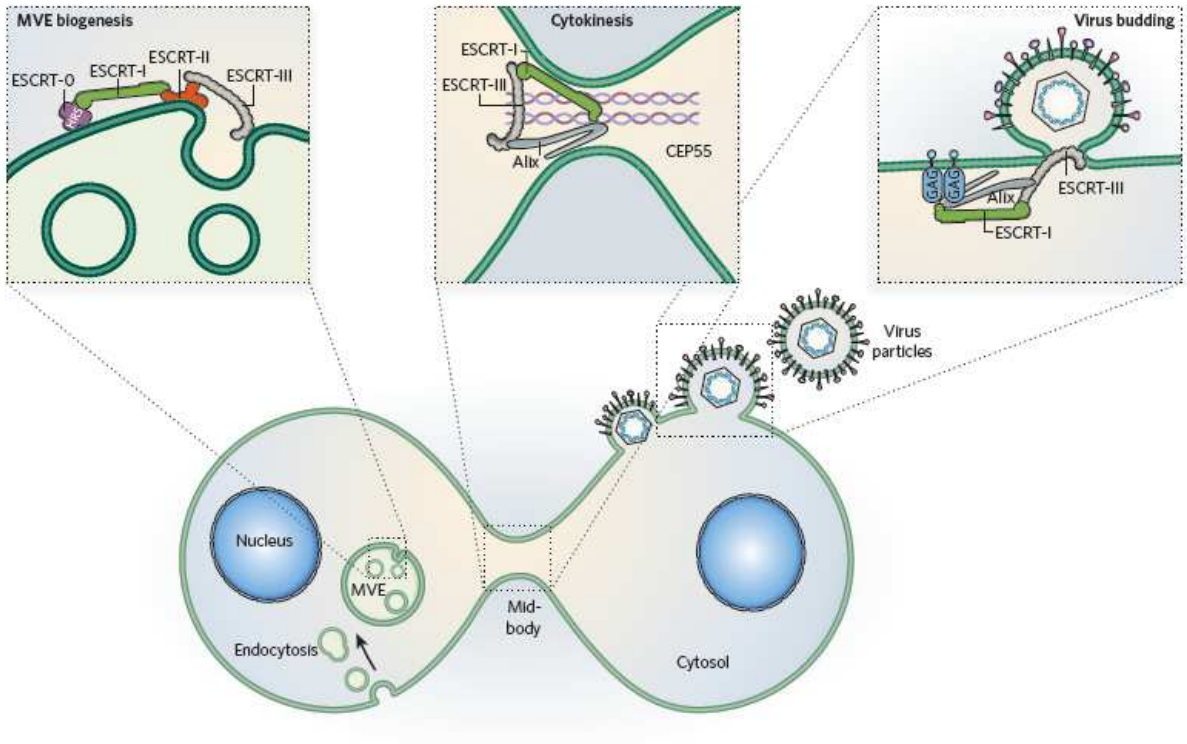


Figure 13 : Implication des ESCRT dans trois processus topologiquement similaires de déformation membranaire. D'après (Raiborg and Stenmark, 2009).

Les protéines du complexe ESCRT-III pourraient aussi intervenir dans le mécanisme d'autophagie. L'autophagie est un processus de dégradation de composants cytoplasmiques (cf. plus bas) et nécessite la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Cette fusion serait sous le contrôle des protéines du complexe ESCRT-III (Rusten and Stenmark, 2009).

2.2. Dysfonctionnements de la voie endolysosomiale : implication dans des maladies neurologiques

Un trait commun à de nombreuses maladies neurodégénératives, est que les neurones contiennent des endosomes anormaux par leur morphologie et leur composition protéique, indiquant des perturbations du système endolysosomial (Nixon, 2005). Des observations morphologiques de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer révèlent, dans les neurones, des endosomes anormaux, caractérisés par une grande taille et par une mixture de marqueurs des endosomes précoces (Rab5, EEA1), de recyclage (Rab4) et tardifs (récepteur du Manose-6-phosphate). Des endosomes aberrants sont aussi présents chez des patients atteints de sclérose amyotrophique latérale (ALS Amytrophic Lateral Sclerosis), du syndrome de Down et de la maladie de Niemann-Pick.

Il est aussi intéressant de noter que les souris invalidées pour le gène codant la désubiquitinase AMSH (Associated Molecule with the **S**H3 domain of **S**TAM), présentent une neurodégénérescence postnatale ; le cortex et plus particulièrement l'hippocampe présentent de sévère pertes neuronales (Ishii et al., 2001). Or, l'équipe d'Agromayor a montré que AMSH peut interagir avec ESCRT-III (en l'occurrence, CHMP1 A et B, CHMP2A et CHMP3) ; et que l'activité catalytique de AMSH est nécessaire dans la dégradation des protéines par les lysosomes (Agromayor and Martin-Serrano, 2006).

Les complexes ESCRT sont impliqués de manière directe ou indirecte dans divers maladies comme des cancers, des infections et des maladies neurodégénératives (MND) (Stuffers et al., 2009). Le tableau 3 présente les différentes MND dans lesquelles les ESCRT sont impliqués.

Complex	Subunit	Disease	Material	Refs
ESCRT-III	CHMP2B	Frontotemporal Dementia (FTLD-U) and ALS	Human cells	(Skibinski et al., 2005; Parkinson et al., 2006)
ESCRT-I/III	TSG101 / CHMP3 / CHMP2B	Neurodegeneration (FTLD-U, ALS, Huntington's disease)	Human cells, mouse cells	(Filimonenko et al., 2007)
ESCRT-I/II/III	Vps28 / Vps25 / Snf7 / Vps4	Neurodegeneration (Huntington's disease)	Drosophila	(Rusten et al. 2007)
ESCRT-III	CHMP4B / CHMP2B	Neurodegeneration (FTLD-U, ALS)	Drosophila, mice	(Lee et al., 2007)
ESCRT-I associated	TSG101	Spongiform neurodegeneration (hallmark of prion disease)	Human cells, rat tissue	(Kim et al., 2007)
ESCRT-I associated	TSG101	Charcot-Marie-Tooth disease (CMT1C)	Human cells, HEK cells	(Shirk et al., 2005)
ESCRT-III associated	CHMP1B	Hereditary spastic paraplegia	Monkey cells	(Reid et al., 2005)

Tableau 3 : Maladies neurodégénératives impliquant directement ou indirectement des sous unités des complexes ESCRT. D'après (Stuffers et al., 2009).

TSG101, par exemple, est impliqué de manière indirecte dans une neurodégénérescence spongiforme observée chez un mutant de souris (Kim et al., 2007). La perte des neurones dans cette maladie, laisse des trous dans le parenchyme cérébral, qui prend l'aspect d'une éponge. TSG101 est le substrat de l'ubiquitine ligase Mahogunin, mutée dans la neurodégénérescence spongiforme. La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1 (CMT1) atteint le système nerveux périphérique, provoquant la démyélinisation des axones. La mutation du gène SIMPLE (small integral membrane protein of the lysosome/late endosome) est la base moléculaire d'une des formes de cette maladie. SIMPLE interagit avec NEED4 (Neural precursor cell Expressed, Developmentally Downregulated 4) une ubiquitine ligase E3 du système de dégradation par les lysosomes, et TSG101 (Shirk et al., 2005). La fonction exacte de SIMPLE n'est pas connue, en revanche cette étude suggère un rôle pour SIMPLE dans la voie de dégradation endolysosomiale. CHMP1B est aussi un partenaire d'une protéine impliquée dans une maladie neurodégénérative, la spastine. La mutation de la spastine, induit une paraplégie spastique des membres bas uniquement. Il s'agit d'une dégénérescence axonale. La spastine est une AAA-ATPase, elle interagit via son domaine MIM avec CHMP1B. Récemment l'équipe de Yang a montré que CHMP1B recrute la spastine au niveau

du pont intercellulaire (*midbody*) lors de la division de deux cellules filles (Yang et al., 2008a). L'interaction CHMP1B-Spastine a lieu entre domaines MIM et MIT, et est donc analogue à l'interaction CHMP2A-Vps4.

La protéine CHMP2B est impliquée dans une maladie neurodégénérative, une forme héréditaire de démence fronto-temporale liée au chromosome 3 (FTD3, Fronto Temporal Dementia linked to chromosome 3) (Skibinski et al., 2005). Nous nous sommes particulièrement intéressés à CHMP2B, dans la mesure où pour la première fois, ce résultat indiquait qu'une protéine ESCRT était impliquée de manière directe dans une maladie humaine neurodégénérative.

2.2.1. CHMP2B et Démence FrontoTemporale

Léquipe de Skibinski a identifié en 2005, chez une famille de patients danois, des mutations dans le gène de la protéine CHMP2B. Ces patients souffrent de démence frontotemporale, due à une atrophie particulièrement extensive du cortex cérébral. CHMP2B étant porté par le chromosome 3, cette démence a tout d'abord été nommée : FTD3.

Les démences fronto-temporales (FTD FrontoTemporal Dementia) sont les plus répandues des démences pré-séniles après la maladie d'Alzheimer ; elles comptent pour 10 à 20 % des cas. Les FTD surviennent un peu avant l'âge de 60 ans et sont caractérisées par la dégénérescence des lobes frontaux et temporaux, conduisant des changements sévères de la personnalité et du comportement, avec une perte progressive de la parole, mais sans que la mémoire épisodique ne soit trop affectée (McKhann et al., 2001). Les FTD sont souvent associées à des mouvements désordonnés (syndrome parkinsonien) et des maladies des motoneurones (Ringholz and Greene, 2006).
Dans 30 à 50 % des cas, les FTD sont familiales. La pathologie des FTD inclut la présence anormale d'agrégats protéiques intracytoplasmiques, sans augmentation notable des dépôts d'amyloïde (Neumann et al., 2009b).

Les FTD de type *FTD-Tau*, présentent une accumulation de la protéine Tau (protéine associée aux microtubules). De nombreuses mutations du gène de la protéine Tau, porté par le chromosome 17, ont été identifiées.

Les FTD présentant des inclusions d'*ubiquitine* sont de deux types. Les inclusions sont toujours négatives pour la protéine Tau, mais peuvent être positives pour la protéine TDP-43, il s'agit alors des *FTD-TDP* ; les FTD à inclusions négatives pour TDP-43 sont alors nommées *FTD-UPS* (UPS, Ubiquitine Proteasome System).

Les FTD de type *FTD-TDP*, présentent une accumulation de TDP-43 (TAR DNA Binding protein of 43 kDa), protéine codée par le gène *TARDBP*, porté par le chromosome 1. TDP-43 est un facteur de transcription et d'épissage, mis en évidence en association aux granules d'ARNm, lors de l'analyse protéomique de fractions subcellulaires de cerveau de souris, enrichies en ribosomes (Elvira et al., 2006). L'équipe de Wang a récemment confirmé l'association de TDP-43 aux ARNm, dans les dendrites de neurones d'hippocampe de rat en culture (Wang et al., 2008a). Dans les FTD, TDP-43 est hyperphosphorylée, ubiquitinylée, tronquée et délocalisée du noyau vers le cytoplasme (Neumann et al., 2006). Jusqu'à aujourd'hui, seule une équipe a pu identifier une mutation dans le gène *TARDBP* chez deux patients atteints de maladie des motoneurones (Benajiba et al., 2009). En revanche de nombreuses études ont mis en évidence des mutations dans le gène *TARDBP* chez des patients atteints de Sclérose Amytrophique Latérale (ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis) (Lagier-Tourenne and Cleveland, 2009). L'ALS est une dégénérescence des motoneurones qui touche à la fois les motoneurones centraux et périphériques, conduisant à des paralysies fatales (paralysie des muscles respiratoires). D'autres structures du système nerveux central peuvent être touchées conduisant alors à des changements comportementaux, des déficits des fonctions exécutives (telles que la planification de tâches, l'initiative et les interactions sociales) et des déficits cognitifs. Les patients possèdent alors dans l'hippocampe et le néocortex, des inclusions intraneuronales cytoplasmiques positives pour l'ubiquitine (Wightman et al., 1992).

Les inclusions pathologiques des *FTD-UPS* peuvent être détectées avec des marqueurs du système du protéasome. Le sous type le plus commun des FTD-UPS sont les FTD-U. Ces FTD-U présentent des signes cliniques et anatomopathologiques différents. D'un point du vue clinique, les patients présentent des changements sévères de la personnalité et du comportement, mais sans aphasie, c'est-à-dire sans perte de la parole. Aux signes anatomopathologiques classiques (dégénérescence corticale des lobes frontaux et temporaux), s'ajoutent une sévère dégénérescence du striatum antérieur et une sclérose de l'hippocampe

(c'est-à-dire, un durcissement de l'hippocampe dû au développement anormal de tissu conjonctif fibreux).

L'analyse post mortem de quatre membres de la famille Danoise, chez qui les mutations de CHMP2B ont été identifié, indique la présence de petites inclusions d'ubiquitine dans les cellules granulaires de l'hippocampe ; et de manière plus rare, dans les neurones corticaux des lobes frontaux et temporaux (Holm et al., 2007). Ces inclusions sont positives pour p62 mais négatives pour TDP-43. Ces données tendent à reclasser la FTD3 en FTD-U.

L'équipe de Skibinski a identifié en 2005 une mutation ponctuelle dans le site accepteur d'épissage de l'exon 6 (étoile rouge dans la figure 14). Cette mutation conduit à un épissage aberrant des pré-ARNm. Le transcrit CHMP2B^{intron5} conserve l'intron 5, et le transcrit CHMP2B$^{\Delta 10}$ utilise un site cryptique dans l'exon 6.

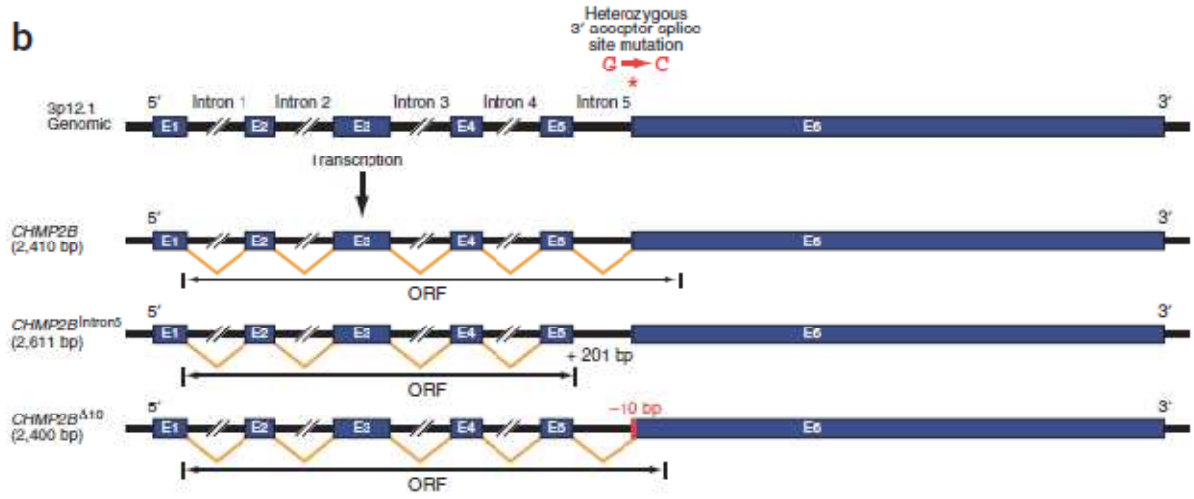


Figure 14 : Structure des pré-ARNm de CHMP2B et de ces mutants. L'étoile rouge indique la position de la mutation. Le transcrit CHMP2B^{intron5} conserve l'intron 5. Le transcrit CHMP2B$^{\Delta 10}$ utilise un site cryptique dans l'exon 6. E : exon, ORF : Open Reading Frame. D'après (Skibinski et al., 2005).

Les deux transcrits sont présents tous les deux dans toutes les cellules des patients.

La figure 15 illustre la structure primaire des protéines CHMP2B obtenues à partir de ces transcrits. La traduction peptidique de ces transcrits conduits à la production, dans le cas de CHMP2B^{intron5} d'une protéine tronquée, dans laquelle les 35 acides aminés C-terminaux sont

remplacés par une unique valine (V) ; et dans le cas de CHMP2B$^{\Delta 10}$ à une protéine dont les 28 derniers acides aminés sont aberrants (en vert dans la figure 15).

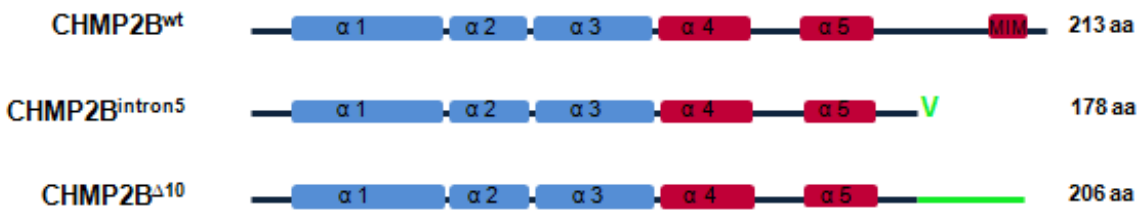


Figure 15 : Structure primaire des protéines CHMP2B de type sauvage (wt) et mutantes. V : valine qui remplace la partie C-terminale normale dans CHMP2B^{intron5}. La ligne verte dans CHMP2B$^{\Delta 10}$ indique la partie C-terminale aberrante portée par ce mutant.

Les mutants CHMP2B^{intron5} et CHMP2B$^{\Delta 10}$, dépourvu de leur domaine MIM, ne peuvent plus interagir avec l'ATPase VPS4. Le mutant CHMP2B^{intron5} est à l'image des mutants activés *in vitro*, capables de former des hétéropolymères à la surface des membranes.
Un troisième mutant a aussi été identifié dans l'étude par Skibinski. Il s'agit d'une mutation ponctuelle conduisant à la substitution d'un acide aspartique par une tyrosine en position 148, CHMP2B^{D148Y}, entre les hélices α4 et α5.

L'expression des mutants CHMP2B^{intron5} et CHMP2B$^{\Delta 10}$ dans une lignée neuronale (PC12), provoque la formation de structures positives pour le marqueur endosomial tardif CD63. La morphologie de ces endosomes, par rapport aux endosomes CD63 positifs en conditions normales, suggère qu'il sont aberrants (Skibinski et al., 2005). Cependant, le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$ ne génère pas systématiquement d'endosomes aberrants. Le mutant CHMP2B^{D148Y} quant à lui ne provoque pas la formation d'endosomes aberrants.

Depuis cette étude par Skibinski, d'autres équipes ont cherché des mutations de CHMP2B chez d'autres familles de patients.

L'équipe de Momeni a séquencé l'ADN de membres d'une famille d'Afrique du Sud d'origine européenne souffrant de FTD ; et a identifié chez deux membres, une mutation ponctuelle dans le gène de CHMP2B (Momeni et al., 2006). Aussi, ces jeunes enfants ne

présentent aucun signe de FTD ; et Momeni et ces collaborateurs n'ont pas étudié l'expression de la protéine CHMP2B. Cependant la mutation dans l'ADN conduirait à l'apparition d'un codon stop prématuré, et la protéine résultante serait délétée des ses 27 derniers acides aminés.

L'équipe de Parkinson a identifié deux mutations ponctuelles chez deux patients atteints de sclérose amyotrophique latérale (Parkinson et al., 2006), l'un possède une valine à la place d'une isoleucine CHMP2B^{I29V}, dans l'hélice α1. Le second patient possède une histidine à la place d'une glutamine CHMP2B^{Q206H} dans l'hélice α6, le domaine MIM. Cependant par extension des données de la cristallisation du domaine MIM de la forme de levure de CHMP2, la glutamine 206 ne serait pas impliquée dans l'interaction avec l'ATPase VPS4 (Obita et al., 2007).

L'équipe de Van Der Zee, a quant à elle, mis en évidence chez une famille belge une mutation non-sens dans le gène de CHMP2B conduisant à la production d'une protéine délétée de ses 48 derniers acides aminés (van der Zee et al., 2008). L'expression de ce mutant CHMP2B^{Q165X}, provoque aussi la formation d'endosomes aberrants dans une lignée cellulaire de neuroblastome humain (SK-N-SH).

La formation d'endosomes aberrants par les différents mutants activés de CHMP2B suggère un rôle pour cette protéine dans la voie endolysosomiale.

2.2.2. CHMP2B et autophagie

De nombreuses études chez Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster et les mammifères, révèlent un rôle pour les complexes ESCRT dans le processus autophagique (passé en revue par (Rusten and Stenmark, 2009)).

L'autophagie est un mécanisme de survie très conservé par l'évolution, conduisant du matériel cytoplasmique et des organelles vers les lysosomes pour qu'ils y soient dégradés (Eskelinen and Saftig, 2009). L'autophagie est activée par des conditions de stress, comme un déficit en acides aminés, des protéines mal repliées, des agrégats protéiques, des mitochondries endommagées, mais aussi par une infection virale. L'autophagie permet aussi

l'élimination des cellules apoptotiques lors de la mort cellulaire programmée durant le développement (Qu et al., 2007).

Après l'induction par un signal de stress (flèche rouge dans la figure 16), la première étape est la formation d'un autophagosome. L'autophagosome résulte du repliement d'une citerne membranaire plate autour d'une portion cytoplasmique ou d'un organelle. Ainsi l'autophagosome est constitué d'une double bicouche lipidique. La formation des autophagosomes est contrôlée par des petites protéines de la famille Atg. Les autophagosomes fusionnent ensuite avec les endosomes multivésiculés pour former un amphisome, puis avec les lysosomes pour former un autolysosome. Ces fusions dépendent de VPS4 et de Rab11.

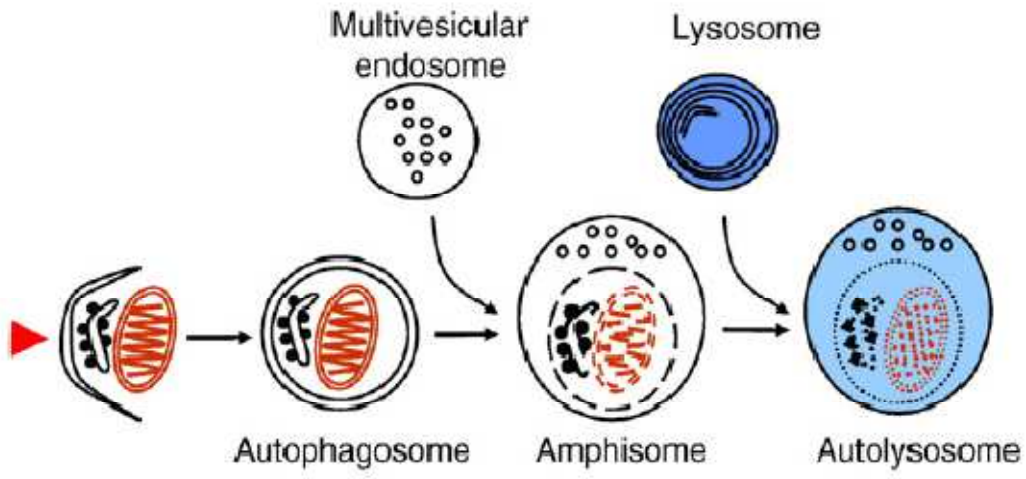


Figure 16 : Représentation schématique du mécanisme autophagique. La flèche rouge est rouge représentent le signal qui initie le processus autophagique. L'autophagosome est constitué d'une double bicouche lipidique ; il fusionne aves les corps multivésiculés pour former un amphisome, puis avec les lysosomes pour former un autolysosome. D'après (Eskelinen and Saftig, 2009).

Le processus autophagique joue un rôle primordial dans les maladies neurodégénératives dans lesquelles de nombreux agrégats de protéines sont formés et doivent être éliminés. Dans un modèle de la maladie de Huntington établi chez la Drosophile, l'accumulation de la protéine huntingtine polyglutaminée est éliminée par autophagie (Ravikumar et al., 2004). De plus, la sous régulation des gènes *Atg* chez la souris provoque une accumulation massive d'agrégats protéiques positifs pour l'ubiquitine et une neurodégénérescence (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006).

L'expression chez l'embryon de Drosophile d'un mutant de *shrub*, homologue de CHMP4, provoque des défauts de l'arborisation axonale et dendritiques des neurones sensoriels et de localisation des endosomes (Sweeney et al., 2006). Une arborisation neuritique normale peut être restaurée par l'expression des homologues murins de *shrub* (CHMP4 A et C) ; suggérant un rôle de CHMP4 dans la morphogénèse neuronale. Ces observations ont amené ces chercheurs à étudier le rôle des ESCRT-III dans le système nerveux des mammifères. L'arborisation dendritique est dramatiquement réduite dans des neurones corticaux de rat en culture dont l'expression de CHMP4A a été éteinte par siRNA pendant trois jours à partir du quinzième jours de culture (Lee et al., 2007). Les neurones infectés par les siCHMP4A présentent une quantité anormale d'autophagosomes et de rares MVB.

Parmi les trois mutants identifiés par Skibinski ($CHMP2B^{intron5}$, $CHMP2B^{\Delta 10}$ et $CHMP2B^{D148Y}$) seule l'expression de $CHMP2B^{intron5}$ provoque une réduction de l'arborisation dendritique et une mort des neurones (Lee et al., 2007). Les endosomes aberrants formés par $CHMP2B^{intron5}$, piègent CHMP4A et Rab7. $CHMP2B^{intron5}$ dépourvu de son domaine MIM ne pourrait se dissocier correctement de ses partenaires d'ESCRT-III (Lee et al., 2007). L'expression dans des cellules HEK de $CHMP2B^{intron5}$ provoque la formation d'autophagosomes, et dans les neurones, l'accumulation de LC3. La protéine LC3 est une protéine autophagique, nommée aussi Atg8. Ces amas sont aussi positifs pour l'ubiquitine.

Dans une étude plus récente, Gao et ses collaborateurs montrent que l'inhibition chimique ou génétique de l'autophagie retarde la mort des neurones exprimant $CHMP2B^{intron5}$ ou les siCHMP4A (Lee and Gao, 2009). Selon eux, $CHMP2B^{intron5}$ provoquerait l'accumulation d'autophagosomes induisant une neurodégénérescence.

Par ailleurs, l'équipe de Simonsen a montré une accumulation d'ubiquitine et de p62 (protéine liant les polyubiquitine et interagissant avec LC3) dans cellules HeLa exprimant $CHMP2B^{intron5}$ ou $CHMP2B^{\Delta 10}$ (Filimonenko et al., 2007). L'ubiquitine et p62 sont localisées dans les amas de $CHMP2B^{intron5}$ et $CHMP2B^{\Delta 10}$. En microscopie électronique les cellules HeLa exprimant $CHMP2B^{intron5}$ présentent une quantité anormale d'amphisomes. Ces données suggèrent que le processus autophagique est bloqué par les mutants de CHMP2B ; les amphisomes ne pourraient pas fusionner avec les lysosomes.

3. But de l'étude

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion d'aborder deux aspects des mécanismes moléculaires permettant le maintien des épines dendritiques et leur plasticité, c'est-à-dire les facteurs qui contrôlent la traduction des ARNm dans les dendrites et le système endolysosomial.

Dans les cellules neuronales, la régulation de la traduction d'ARNm spécifiques joue un rôle primordial dans la polarisation et le développement neuronal mais aussi dans la modification à long terme des connexions synaptiques, c'est-à-dire, la modification de la force synaptique et le remodelage morphologique des épines dendritiques. De nombreuses protéines de liaison aux ARNm interviennent dans le métabolisme des ARNm dendritiques et notamment des facteurs d'épissage qui restent liés aux ARNm matures. Il est important de caractériser de nouveaux acteurs protéiques intervenant dans le transport des ARNm, leur ciblage et le contrôle local de leur traduction, spécifiquement au niveau des synapses à potentialiser ou à déprimer.
Pendant ma thèse j'ai tout d'abord participé à la poursuite du travail engagé par Julien Grange. Les résultats de Julien suggéraient un rôle pour le facteur d'épissage Sam68 dans la régulation de la traduction d'ARNm en réponse à l'activité neuronale. Nous avons donc cherché à identifier les ARNm associés à Sam68 dans les neurones *in vivo*. Notre intérêt s'est aussi porté sur le facteur d'épissage TLS suite à l'identification de cette protéine parmi les nombreux composants du complexe du récepteur NMDA (Husi et al., 2000). TLS semblait, dans ce panel de protéines, la seule pouvant lier les ARN, suggérant sa participation dans l'amarrage et la régulation des ARNm au niveau des épines dendritiques. Nous avons exploré sa localisation intraneuronale, alors inconnue.

Les complexes ESCRT gouvernent des processus intracellulaires très conservés et dont la nature commence à être bien définie dans les cellules non neuronales. Le plus connu de ces processus concerne le fonctionnement des endosomes où les complexes ESCRT participent au tri des protéines. L'acheminement correct des protéines vers la voie de recyclage ou vers la voie de dégradation est primordial pour le bon fonctionnement neuronal. Un dysfonctionnement des endosomes a été identifié dans de nombreuses maladies neurodégénératives. De plus, le complexe ESCRT-III semble avoir un rôle générique

consistant à étirer et scinder des tubes de membrane lipidique en agissant de l'intérieur. Cette activité pourrait être importante pour la formation ou le maintien de structures spécifiques telles que les épines dendritiques.

L'équipe de Skibinski a identifié en 2005, une mutation dans le gène d'une protéine du complexe ESCRT-III, CHMP2B. La fonction exacte de CHMP2B dans les cellules de mammifères est aujourd'hui encore inconnue. Cependant, par analogie à la levure, nous avons émis l'hypothèse que les mutants de CHMP2B perturbent le fonctionnement endosomial ; et bien que les mutations de CHMP2B concernent une minorité de patients, l'existence même de ces patients démontre qu'une perturbation de l'appareil endosomial peut jouer un rôle moteur dans la maladie. L'analyse détaillée du mode d'action de CHMP2B dans les neurones jettera une lumière nouvelle sur les mécanismes de la neurodégénérescence corticale dans les pathologies caractérisées par des dysfonctionnements des endosomes.

Le but de cette partie de mon travail est d'élucider le mode d'action de CHMP2B dans les neurones, pour comprendre la physiopathologie des DFT. Notre hypothèse de travail est que la perturbation des ESCRT a pour premier effet de perturber les synapses, via le dérèglement du trafic endosomial de récepteurs synaptiques, ou plus directement en agissant sur la membrane neuronale.

Pour cela, en collaboration avec K. Pernet-Galay (GIN), j'ai étudié la distribution ultrastructurale de la protéine CHMP2B endogène dans neurones d'hippocampe de souris in situ, grâce à la microscopie électronique, couplée à un immunomarquage à l'or colloïdal. Puis j'ai étudié l'expression de CHMP2B de type sauvage et de ses mutants dans la lignée cellulaire BHK et dans des neurones d'hippocampe de rat en culture par la technique d'immunofluorescence. J'ai étudié la morphologie des épines dendritiques des neurones d'hippocampe exprimant CHMP2B de type sauvage et ses différents mutants ; ceci a été réalisé à l'aide du logiciel NeuronStudio. Afin d'évaluer si les modifications morphologiques induites par les mutants pouvaient être corrélées à des changements fonctionnels au niveau des synapses, en collaboration avec A. Bouron (CEA Grenoble), nous avons mesuré l'amplitude et la fréquence des mini courants postsynaptiques excitateurs des neurones par la technique de patch clamp. Enfin, nous avons évalué le rôle de la protéine endogène dans la spinogenèse à l'aide du système d'interférence de l'ARN, en transfectant les neurones avec des shRNA (small hair pin RNA) dirigé contre l'ARNm de CHMP2B.

Matériel et Méthodes

Concernant les expériences des articles 1 et 2, merci de vous référer aux paragraphes Matériel et Méthodes des articles.

1. Clonage

1.1. Reconstitution de la forme de type sauvage CHMP2B^{wt} et construction du mutant CHMP2B^{intron5}

L'ADNc de CHMP2B est obtenu par transcription inverse d'acides ribonucléiques (ARN) de cellules embryonnaires humaines de rein (HEK, Human Embryonnary Kidney), puis par réaction de polymérisation en chaîne selon la technique de Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 2006).

Les ARN totaux sont tout d'abord extraits de 14.10^6 cellules HEK. Les cellules sont lysées dans une solution dénaturante (4 M guanidine thiocyanate, 25 mM citrate de sodium pH 7.0, 0.5% *N*laurosylsarcosine, 0.1 M mercaptoéthanol), puis les ARN extraits par séparation de phase grâce au phénol et au chloroforme. Ils sont ensuite précipités à l'isopropanol puis solubilisés dans du tampon TES (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5%SDS).
L'ensemble des ADNc est obtenu par la réaction de transcription, à l'aide de la transcriptase inverse du virus leucémogène murin Moloney (MMLV-RT, Moloney Murine Leukemia Virus - Reverse Transcriptase, Clonetch). 2µg d'ARN sont placés à 70°C pendant 5 minutes ; sont ensuite ajoutés : 1X tampon RT, 0,5 mM dNTP, 10mM DTT, 0,5 U RNasine, 50 µM hexamères nucléotidiques aléatoires, 200 U MMLV-RT. La réaction a lieu 1h à 37°C puis 5 minutes à 95°C afin d'inactiver l'enzyme. Ils sont ensuite soumis à une nouvelle extraction au chloroforme, précipités et dosés.
L'amplification spécifique du cDNA de CHMP2B par réaction de polymérisation en chaîne, est réalisée à l'aide d'un mélange de deux ADN polymérases : la *Taq* (issue de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*) et la *Pwo* (issue de l'archébactérie hyperthermophile *Pyrococcus woesei*) : Expand High Fidelity (Roche Applied Science). La réaction est

composée de 2µL cDNA, 3,75 U Expand High Fidelity, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,6 µM oligonucléotides, 0,4 mM dNTP. La première étape de dénaturation dure 2 minutes à 95°C ; la seconde étape de dénaturation incluse dans les cycles de polymérisation dure 45 secondes à 95°C, l'hybridation dure 45 secondes à 55°C pour la fabrication de la forme de type sauvage et 43°C pour le mutant CHMP2B^{intron5}, l'élongation dure 1 minute à 72°C ; ces étapes sont répétées 32 fois. Enfin une élongation finale est réalisée pendant 7 minutes à 72°C. Les amorces CHMP-2B_XhoI_HA tag 5' et CHMP-2B_PstI_XhoI 3' ont servi à amplifier CHMP2B^{wt}, et les amorces CHMP-2B_XhoI_HA tag 5' et CHMP-2B ^{intron5} _XhoI 3', le mutant CHMP2B^{intron5}. L'amorce CHMP-2B_XhoI_HA tag 5' permettant d'apporter deux étiquettes HA.

Les fragments PCR ainsi obtenus sont purifiés avec le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Ils sont ensuite digérés avec les enzymes de restriction XhoI et PstI, puis clonés dans le plasmide pcDNA 3.1.

Nom des amorces	Séquence des amorces (orientation 5'-3')
CHMP-2B _XhoI_HA tag 5'	CTCTCGAGGCCACCATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTACCCAT ACGACGTCCCAGACTACGCTGCGTCCCTCTTCAAGAAGAA
CHMP-2B _PstI_XhoI 3'	TACTCGAGCTGCAGTCACTAATCTACTCCTAAAGCCTTGAGT
CHMP-2B ^{intron5} _XhoI 3'	TACTCGAGTCACACCTTTCCAGAAATTTCAAT

Tableau 1 : Amorces ayant servi à la construction de la forme de type sauvage et du mutant CHMP2B^{intron5}.

1.2. Construction du mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$

CHMP2B$^{\Delta 10}$ résulte d'un épissage aberrant de l'ARN messager au niveau du deuxième exon, tout comme CHMP2B^{intron5}. La partie C-terminale de CHMP2B$^{\Delta 10}$ est aberrante en comparaison à celle de la forme de type sauvage. CHMP2B$^{\Delta 10}$ et CHMP2B^{intron5} ont en commun la partie N-terminale. Il est donc possible de construire CHMP2B$^{\Delta 10}$ à partir de CHMP2B^{intron5}.

Tout d'abord, la partie C-terminale de CHMP2B$^{\Delta 10}$ est construite de novo, en utilisant la technique de mégaprimer. Il s'agit de fabriquer deux longues amorces (environ 90 paires de

bases) ayant une trentaine de nucléotide en commun ; de les apparier, de les remplir à l'aide d'une polymérase, puis d'amplifier la matrice ainsi obtenue. Les longues amorces sont appellées ici : forward matrice et reverse matrice. Les 26 derniers nucléotides de forward matrice et les 26 derniers nucléotides de reverse matrice peuvent s'apparier.
Fabrication de la matrice : les amorces forward matrice (5ng) et reverse matrice (5ng) sont tout d'abord appariées dans le tampon de la polymérase avec 200µM de dNTP. La température de dénaturation est montée jusqu'à 76°C pendant 5 minutes ; puis on hybride progressivement les amorces en abaissant la température de un degré en un degré (à chaque température la réaction dure une minute) jusqu'à atteindre 72°C. On ajoute alors 3,75 U de polymérase (Expand High Fidelity, Roche Applied Science). La réaction de polymérisation dure 6 minutes à 72°C. L'amplification de la matrice est réalisée par ajout à la réaction de 1 µM des amorces : forward MvaI et reverse NotI. La première étape de dénaturation dure 2 minutes à 95°C ; la seconde étape de dénaturation incluse dans les cycles de polymérisation dure 15 secondes à 95°C, l'hybridation dure 30 secondes à 47°C, l'élongation dure 30 secondes à 72°C ; ces étapes sont répétées 30 fois. Enfin une élongation finale est réalisée pendant 6 minutes à 72°C. L'amorce forward MvaI devait originellement apporter un site de restriction MvaI ; nous pensions au début sous cloner la matrice dans le plasmide contenant CHMP2B^{intron5}, mais des ennuis avec l'anticorps polyclonal anti-HA nous ont amenés à changer l'étiquette devant CHMP2B$^{\Delta 10}$. L'amorce reverse NotI quant à elle, apporte un codon stop et un site de restriction NotI qui servira à sous cloner le fragment PCR obtenu.

D'autre part il s'agit d'amplifier CHMP2B^{intron5} à l'aide des amorces : forward delta10 et reverse 2Bi5. La première étape de dénaturation dure 2 minutes à 95°C ; la seconde étape de dénaturation incluse dans les cycles de polymérisation dure 15 secondes à 95°C, l'hybridation dure 30 secondes à 58°C, l'élongation dure 45 secondes à 72°C ; ces étapes sont répétées 30 fois. L'amorce forward delta10 permet d'apporter une étiquette Myc et reverse 2Bi5 d'éliminer le codon stop de CHMP2B^{intron5}.

Enfin, CHMP2B$^{\Delta 10}$ est obtenu en utilisant de nouveau la technique de mégaprimer ; les longues amorces sont alors la matrice d'une part et CHMP2B^{intron5}d'autre part. Ces deux segments d'ADN ont 50 nucléotides en commun.
Les amorces CHMP2B^{intron5} (50ng) et matrice (50ng) sont tout d'abord appariées dans le tampon de la polymérase avec 200µM de dNTP. La température de dénaturation est montée

jusqu'à 95°C pendant 5 minutes ; puis on hybride progressivement les amorces en abaissant la température de un degré en un degré (à chaque température la réaction dure une minute) jusqu'à atteindre 72°C. On ajoute alors 3,75 U de polymérase (Expand High Fidelity, Roche Applied Science). La réaction de polymérisation dure 8 minutes à 72°C. L'amplification de CHMP2B$^{\Delta 10}$ est réalisée par ajout à la réaction de 1 µM des amorces : forward myc et reverse delta10. La première étape de dénaturation dure 2 minutes à 95°C ; la seconde étape de dénaturation incluse dans les cycles de polymérisation dure 15 secondes à 95°C, l'hybridation dure 30 secondes à 58°C, l'élongation dure 1 minute à 72°C ; ces étapes sont répétées 30 fois.

Nom des amorces	**Séquence des amorces (orientation 5'-3')**
forward matrice	ATGCCCAGGATATTGTGAATCAAGTTCTTGATGAAATTGGAATTGAAATTT CTGGAAAGGTGTTGCACCAACTTCTAGAAGCTTACC
reverse matrice	TAATCTTGAATTGCCATTTAGACGCTTCATCTGTGATGTAGACGTTGTAGTA AAGGTAAATGGTAAGCTTCTAGAAGTTGGTGCAAC
forward MvaI	ATGCCCAGGATATTGTG
reverse NotI	ATAGTTTAGCGGCCGCTCACTATAATCTTGAATTGCCATTTAG
forward delta10	CCGGATATCATGGAGCAAAAGCTCATTTCTGAAGAGGACTTGAATGAAGG CTCCGGAATGGCGTCCCTCTTCAAGAAG
reverse 2Bi5	TCCAGAAATTTCAATTCCAATTTC
forward myc	CCGGATATCATGGAGCAAAAG
reverse delta10	ATAGTTTAGCGGCCGCTCAC

Tableau 2 : Amorces ayant servi à la construction du mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$.

Le fragment PCR ainsi obtenu est purifié avec le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Il est ensuite digéré avec les enzymes de restriction EcoRV et NotI, puis clonés dans le plasmide pcDNA 3.1.

1.3. Construction des CHMP2B-shRNA

Les oligonucléotides (cf tableau 3) sont tout d'abord resuspendus dans de l'eau afin d'obtenir une concentration finale de 3µg/µL. Ils sont ensuite appariés, dans un tampon composé de 100 mM acétate de potassium, 30 mM HÉPÈS (pH 7,4) et 2 mM acétate de magnésium, pendant 10' 70°C (après une courte étape de dénaturation, 4' 95°C). La phosphorylation des

oligonucléotides est réalisée par une unité de polynucléotide kinase T4 (PNK) 1 X tampon, 1mM ATP, pendant 30' 37°C ; la PNK est ensuite inactivée en chauffant 10' à 70°C.
Le duplex ainsi obtenu possède des extrémités lui permettant de se liguer avec le plasmide d'accueil pSUPER lui même digéré par Hind III et Bgl II. L'opération de ligation est réalisée avec la ligase T4 (Invitrogen) pendant 1 h à température ambiante. Enfin, la totalité de la ligation est transformée par électroporation dans des bactéries DH5α.

Nom des amorces	**Séquence des amorces (orientation 5'-3')**
forward sh CHMP2B	GATCCCCGACACTACAAACAATGCAGTTCAAGAGACTGCATTGTTTGTAGT GTCTTTTTA
reverse sh CHMP2B	AGCTTAAAAAGACACTACAAACAATGCAGTCTCTTGAACTGCATTGTTTGT AGTGTCGGG

Tableau 3 : Oligonucléotides ayant servi à la construction des small hair pin dirigées contre CHMP2B.

2. Culture cellulaire

2.1. Lignée BHK-21

Les BHK-21 sont des cellules rénales de jeune de hamster (Baby Hamster Kidney, BHK). Elles sont ensemencées dans du milieu GMEM (Glasgow Modified Eagle Medium, Gibco) supplémenté de tryptose phosphate, de 2 mM de L-glutamine (Gibco), de 5% de sérum de veau foetal (Gibco) et 10 $U.mL^{-1}$ Pénicilline/Streptomycine (Gibco).
Pour les expériences d'immunofluorescence, les cellules sont ensemencées à $1,44.10^4$ cellules par cm^2 dans des boîtes de 35 mm contenant des lamelles de verres. Pour les expériences de biochimie, les cellules sont ensemencées à $2,8.10^4$ cellules par cm^2 dans des boîtes de 35 mm.

2.2. Culture primaire de neurones d'hippocampe de rat

Préparation

Pour que la poly-D-lysine adhère sur les lamelles de verre (Marienfeld, n°0111540, diamètre 14 mm), celles-ci doivent tout d'abord subir un traitement de 72 heures à l'acide nitrique 70 % (Sigma, n°438073) pour devenir hydrophiles. Elles sont abondamment rincées

et conservées dans de l'eau distillée stérile. Les lamelles sont incubées une nuit à 37°C avec de la poly-D-lysine 50 µg/mL (Sigma, n°P7280) dissoute dans du tampon borate (50 mM acide borique, 13 mM borax, pH 8,5). Le lendemain, les lamelles sont abondamment rincées à l'eau distillée stérile et placées dans le milieu d'ensemencement, constitué de DMEM (Gibco, n°41966029) supplémenté avec 10% de sérum de cheval (Gibco, n°26050).

Mise en culture

Les neurones d'hippocampe sont prélevés sur des embryons de rat OFA au 19ème jour de vie embryonnaire, conformément à la Directive n°86/609 du Conseil de la Communauté Européenne.

La femelle gestante est anesthésiée à l'isoflurane avant la décapitation. L'utérus contenant les embryons est prélevé par laparotomie, puis placé dans une boîte contenant du HBSS chaud (5 mM glucose, 10 mM HEPES, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM $NaHCO_3$, 440 µM KH_2HPO_4, 270 µM Na_2HPO_4, 10 $U.mL^{-1}$ Pénicilline/Streptomycine, pH 7,4). Les embryons sont transférés dans une nouvelle boîte avec du HBSS chaud, où ils sont décapités. Les cerveaux sont extraits des boîtes crâniennes. Par observation sous loupe binoculaire, les hémisphères cérébraux sont séparés puis les méninges soigneusement enlevées ; les hippocampes peuvent alors être prélevés. Ils sont placés au fur et à mesure dans du HBSS chaud. Après trois rinçages à l'HBSS chaud, les hippocampes sont traités avec 0,25% trypsine-EDTA (Gibco, n°25200) supplémenté avec 15 mM HÉPÈS et 33 mM glucose pendant 15 min à 37°C. Ils sont ensuite lavés deux fois à l'HBSS chaud. Pendant 2 minutes à 37°C, la trypsine est ensuite stopper avec 2 mg/mL d'inhibiteur de trypsine (Sigma, n°T9003), auquel est ajouté 150 U/mL de DNase (10 µg/L ou, Sigma, n°D5025) afin de digérer l'ADN des cellules lysées pendant la dissection, et faciliter la dissociation mécanique. Les hippocampes sont ensuite lavés deux fois à l'HBSS chaud et triturés dans 1 mL de HBSS chaud, avec une pipette 1000 µL et un cône avec un filtre. Les neurones sont comptés sur lame de Malassez et semés à la densité de 12000 cellules par centimètre carré, sur les lamelles préalablement préparées. Le milieu d'ensemencement est constitué de DMEM (Gibco, n°41966029) supplémenté avec 10% de sérum de cheval (Gibco, n°26050). Deux heures plus tard ce milieu est remplacé par le milieu de culture, constitué de Neurobasal (Gibco, n°21103049) supplémenté avec du B27 (Gibco, n°17504044) concentré 1 fois, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate de sodium, et 10 U/mL Pénicilline/Streptomycine. Quatre jours après la mise en culture, un antagoniste pyrimidique, la cytosine-bêta-D-arabinose (AraC,

Sigma, n°C6645) est ajouté au milieu (5 µM) afin de stopper la division des cellules gliales présentes dans la culture de neurones. Tous les quatre jours, un quart de milieu de culture supplémenté d'AraC, est ajouté à la culture afin de fournir de nouveaux nutriments aux neurones en développement.

Concernant les expériences de biochimie, les neurones sont semés à plus forte densité : 24000 cellules par centimètre carré.

Évaluation de la culture

La qualité d'une culture de neurones d'hippocampe se mesure par la capacité des neurones à former des réseaux neuritiques complexes et fins, à former de belles épines dendritiques type *« mushroom »* après au moins 15 jours de vie *in vitro* et à survivre après 21 jours de vie *in vitro.*

La dissociation mécanique et la qualité du supplément de culture B27 déterminent la qualité de la culture de neurones. Le B27 est un mélange de protéines, d'hormones, de vitamines, d'antioxydants et de lipides, dont la composition exacte est tenue secrète. L'équipe de Hell a démontré les variations entre lots de B27 en terme de survie neuronale et de morphologie, pour différents types neuronaux (Chen et al., 2008b). Nous avons pris soin et cela depuis le début de ma thèse de sélectionner les lots de B27. La transfection d'une protéine fluorescente rouge cytosolique permet de visualiser en détail la morphologie des neurones, et donc leurs épines dendritiques. Seuls les lots de B27 donnant une bonne morphologie des neurones ont été conservés.

3. Transfection

3.1. Tansfection des cellules BHK-21

La transfection est réalisée 6 heures après l'ensemencement, avec un polymère cationique, le JetPEI (Polyplus transfection), directement dans le milieu de culture des BHK-21.

Pour une boîte de 35mm contenant quatre lamelles sur lesquelles les BHK-21 sont à 40 % de confluence :

Dans un tube Eppendorf, 2µg d'ADN sont ajoutés à 100 µL de NaCl 150 mM. Dans un second tube Eppendorf 4 µL de JetPEI sont ajoutés à 100 µL de NaCl 150 mM. Les deux tubes sont agités au vortex et incubés 5 minutes à température ambiante. Puis le mélange JetPEI / NaCl est ajouté au mélange ADN / NaCl. Le tube est agité au vortex et incubé 25 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite ajouté goutte à goutte dans le milieu de culture, sur les cellules.

Les cellules seront analysées 24 à 72 h plus tard.

3.2. Transfection des neurones

Le milieu de transfection est préparé à partir de MEM 10X (Gibco, n° 21430020), supplémenté avec 15 mM HÉPÈS, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate de sodium. Le pH du milieu est ajusté à 7,35 avec de la soude.

Pour une boîte de 35mm contenant quatre lamelles sur lesquelles les neurones ont 10 jours de vie en culture (jour *in vitro*, JIV) :

Dans un tube Eppendorf, les ADN sont prémélangés puis ajoutés à 250 µL de milieu de transfection ; le tube est agité doucement et incubé 5 minutes à température ambiante. 1,5 µL de PlusReagent sont ajoutés au fond du tube contenant l'ADN ; le tube est agité doucement et incubé 5 minutes à température ambiante. 4 µL de lipofectamine LTX (Invitrogen, n°15338-100) sont ajoutés au fond du tube contenant l'ADN ; le tube est agité doucement et incubé 25 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, le milieu de culture des neurones est remplacé par 2 mL de milieu de transfection, et les neurones sont placés à 37°C sans CO_2. Le milieu de culture des neurones est conservé à 37°C.

Le mélange est ensuite ajouté directement sur les neurones en plongeant le cône dans le milieu de transfection ; les 250 µL sont répartis de manière équivalente sur les quatre lamelles.

Après 1 heure à 37°C, le milieu de transfection est replacé milieu de culture d'origine des neurones.

4. Immunocytofluorescence

Les cellules (neurones ou BHK) sont fixées avec une solution fraîchement préparée contenant 4 % de paraformaldéhyde (PFA), 4 % de sucrose et du PBS à pH 7,4, pendant 8 minutes à température ambiante. La perméabilisation des cellules est réalisée avec une solution à 0,3 % Triton-X100 dans du PBS, pendant 10 minutes à température ambiante. Les sites antigéniques sont saturés avec 2 % de sérum de chèvre préimmun (Goat Pré Immun, GPI) et 1 % d'albumine bovine (Bovine Serum Albumine, BSA) en solution dans du PBS, pendant 1 heure à température ambiante. Les anticorps primaires et secondaires sont incubés 1 heure à température ambiante dans le milieu de saturation. Après chaque incubation avec les anticorps, les cellules sont rinçées trois fois avec du PBS pendant 5 minutes, et une fois à l'eau avant d'être montées sur lames avec du Mowiol (Calbiochem).

Concernant le marquage de surface des sous-unités GluR2, l'anti-GluR2 est incubé sur les neurones vivants, pendant 15 minutes à 37 °C 5 % CO_2 dans du milieu de culture conditionné et équilibré. Les neurones sont ensuite lavés avec du PBS 1 mM $MgCl_2$ et 2,5 mM $CaCl_2$ à pH 7,4, puis fixés à la PFA 4 %, sucrose 4 % et du PBS à pH 7,4. Les sites antigéniques sont bloqués dans le milieu de saturation (cf plus haut) et l'anticorps secondaire est incubé une nuit à 4 °C dans le milieu de saturation.

La fraîcheur de la PFA, associée au glucose, garantissent la conservation parfaite des structures fines en l'occurrence, des épines dendritiques.

5. Western blot et immunodétection

Les cellules sont lysées dans un tampon lyse contenant 1% de Triton-X100, 0,2 % de SDS, et des inhibiteurs de protéases et phosphatases.

La concentration protéique de chaque échantillon est mesurée en triplicata avec un réactif de Bradforf afin de déposer sur gel la même quantité de chaque échantillon à analyser. Les protéines des lysats sont bouillis 5 minutes dans du tampon Laemmli (2% SDS, 140 mM β-Mercaptoéthanol) avant d'être séparées sur gel de polyacrylamide 8 % en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) à 55 mA pendant 3h.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (polyvinyl-difluoridene) par électrotransfert en conditions semi-sèches. Un papier whatman est placé sur l'anode, imbibé d'un tampon contenant 30% d'éthanol et 30g/L de Tris. La membrane de PVDF est posée sur ce papier whatman et mouillée d'un tampon contenant 30% d'éthanol et 3g/L de Tris. Le gel est placé sur la membrane. Un second papier whatman, imbibé d'un tampon contenant 0,004% de SDS, 5,29 g/L d'acide caproïque et 3g/L de Tris, est posé sur le gel et est alors en contact avec la cathode. Le transfert dure 1h30 à 0,8 mA par cm^2 de membrane.
Après le transfert, la membrane est rinçée à l'eau distillée et incubée pendant 1 heure dans du TBS (Tris 20 mM, 150 mM NaCl, pH 7,5) 0,05 % de Tween 20 et 5 % de lait (TBSTL). L'immunodétection est réalisée avec un anticorps primaire dans du TBSTL; puis par un anti-corps secondaire conjugué à la peroxydase du radis noir ou HRP (Horseradish Peroxydase, Jackson Immunoresearch) dans du TBSTL. La révélation est effectuée avec le kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

Concernant l'immunodétection de l'ubiquitine, les cellules sont lysées en présence de 10 mM de N-éthylmaléïmide, afin d'éviter toute ubiquitinylation non spécifique durant la lyse ; après le transfert sur la membrane de PVDF, celle-ci est incubée est un tampon dénaturant et réducteur (guanidine HCl 6M, β-mercaptoéthanol 5 mM, PMSF 1 mM) pendant 1 heure à 4°C afin de rendre accessible l'ubiquitine. Après saturation des sites antigéniques avec du TBS 5 % BSA pendant 6 heures à RT, la membrane est incubée une nuit avec l'anti-ubiquitine dans du TBS 5 % BSA. L'anticorps secondaire est ensuite incubé 1 heure à RT dans du TBS 5 % BSA.

6. Anticorps

6.1. Anticorps primaires

Nom	**Déterminant(s) antigénique(s)**	**Fabricant et référence**	**Concentration IF**	**Concentration WB**
HA	monoclonal	Cell Signaling 2367	0,1 µg/mL	10 ng/mL
HA	polyclonal	Sigma H6908	35 ng/mL	/
c-myc	monoclonal	Santa Cruz sc-40	2 µg/mL	200 ng/mL
c-myc	polyclonal	Santa Cruz sc-789	2 µg/mL	/
GluR2	monoclonal	Chemicon MAB 397	100 µg/mL	/
CHMP2B	polyclonal	AbCam ab33174	7 µg/mL	700 ng/mL
CHMP2B	polyclonal	Covalab /	3 µg/mL	/
EEa1	polyclonal	AbCam ab2900	0,5 µg/mL	/
Lamp1	polyclonal	AbCam ab24170	5 µg/mL	/
Ubiquitine	monoclonal	Zymed 13-1600	5 µg/mL	3 µg/mL
Actine	monoclonal	Chemicon MAB1501	/	10 ng/mL

6.2. Anticorps secondaires

Nom	**Déterminant(s) antigénique(s)**	**Fabricant**	**Concentration IF**	**Concentration WB**
Alexa 488	monoclonal	Molecular Probes A11029	2 µg/mL	/
Alexa 488	polyclonal	Molecular Probes A11034	2 µg/mL	/
Alexa 594	monoclonal	Molecular Probes A11032	2 µg/mL	/
Alexa 594	polyclonal	Molecular Probes A11037	2 µg/mL	/
Mouse-HRP	polyclonal	Jackson Immunoresearch 115-035-166	/	50 ng/mL
Rabbit-HRP	polyclonal	Jackson Immunoresearch 111-035-044	/	50 ng/mL

7. Microscopie électronique

Une souris de type sauvage a été fixée par perfusion avec 50 ml de PFA 2% et glutaraldéhyde 0.2% dans un tampon phosphate 0.1 M pH7.2. L'hippocampe est prélevé

délicatement et la région CA1 de l'hippocampe médian est disséquée et fixée pendant 1 nuit dans 2% de PFA dans un tampon phosphate 0.1 M. L'échantillon est ensuite infusé dans du sucrose pendant 2 heure avant d'être congelé dans l'azote liquide. Des sections ultrafines sont réalisées à l'aide d'un ultra-cryo-microtome et les coupes prélevées dans une goutte de méthylcellulose/sucrose. Pour l'immunomarquage les grilles contenant les coupes sont déposées sur des gouttes de PBS/Glycine 50 mM puis sur des gouttes de PBS / 10 % BSA afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques. Les coupes sont ensuite incubées avec le premier anticorps primaire dirigé contre CHMP2B (AbCam) pendant 1 heure puis, après plusieurs lavages en PBS / 1 % BSA, mis en présence de protéine A-Gold 15 nm (Utrecht University, The Nederland) pendant 1heure. Les étapes de saturation et d'incubation avec les anticorps sont répétées une seconde fois avec notre anticorps anti-CHMP2B et une protéine A-Gold 10 nm. Les coupes sont ensuite enrobées dans du méthylcellulose 2% / Acétate d'Uranyle 5% dans la proportion 8/2. L'échantillon est finalement observé au microscope électronique à transmission (JEOL 1200EX) et l'acquisition des images se fait par l'intermédiaire de plans films photographiques (Kodak 4489).

8. Microscopie photonique confocale

8.1. Acquisitions

Les neurones sont observés à l'aide d'un microscope confocal Leica LAS AF – TCS SPE. Concernant les expériences de morphologie des épines dendritiques, les acquisitions sont strictement réalisées dans les mêmes conditions. Puissance du laser 532 nm : 50 %, collection des longueurs d'ondes d'émission : 595 nm à 700 nm, ouverture du pinhole : 1 AU, pas entre chaque plan z : 0,2 µm, résolution de l'image : 512 pixels / 512 pixels, vitesse du balayage : 400 Hz, nombre de balayage pour chaque pixel : 4, photon-multiplicateur gain : 1100 V, off set : 0 ; zoom numérique = 1,5.

Concernant les observations des marquages des endosomes, de LC3-GFP et de CHMP2B endogène, les acquisitions sont réalisées dans les mêmes conditions que ci-dessus ; collection des longueurs d'ondes d'émission de l'Alexa488 ou de la GFP : 498 nm à 532 nm ; et le zoom numérique = 2.

8.2. Analyse d'images

Chaque image représente une projection des intensités maximales des images d'une pile. Ces projections ont été obtenues avec le logiciel Metamorph (Molecular Imaging).

Concernant l'analyse de la morphologie des épines, les piles d'images (environ 20 à 30 sections optiques par segment dendritique) en format tif, ont été traitées directement par le logiciel NeuronStudio. Ce logiciel a été développé par l'équipe de Wearne pour détecter et analyser les épines dendritiques (Rodriguez et al., 2006; Rodriguez et al., 2008). La taille d'un voxel est de 0,143 µm x 0,143 µm x 0,2 µm soit environ 0,004 μm^3. L'algorithme de segmentation Isodata est intégré au logiciel NeuronStudio et permet un seuillage dynamique local de la fluorescence, de la surface dendritique, pour définir l'inclusion des voxels dans l'objet. Le point de départ pour la détection automatique et la reconstruction de la dendrite est défini par l'utilisateur ; classiquement, ce point est fixé à proximité de la base d'une dendrite proximale. Au niveau des bifurcations pour qu'une nouvelle branche dendritique soit créée, la dendrite doit avoir une longueur minimum de 5 µm et le ratio du point d'attache doit être de 1,5.

Après la modélisation de la surface dendritique, les épines sont détectées. Les protubérances dont le volume minimum est de 5 voxels (0,020 μm^3), la longueur comprise entre 0.2 µm – 3 µm, et une largeur maximale de 3 µm, sont retenues comme étant des épines. Concernant la classification empirique des épines, nous avons utilisé les paramètres définis par (Rodriguez et al., 2008). Les épines dont le ratio : diamètre minimum de la tête sur diamètre minimum du cou = 1,1, ont un cou. Les épines qui ont un cou et dont le diamètre minimum de la tête est de 0,35 µm, sont classées dans la catégorie « mushroom spines ». Les épines qui n'ont pas de cou et dont le volume minimum est de 10 voxels (0,040 μm^3) sont classées dans la catégorie « stubby spines ». Toutes les autres épines sont classées dans la catégorie « thin spines ». Pour chaque épine le logiciel fourni les données qu'il a mesuré. Ces données sont ensuite transférées dans un fichier Excel ou Gnumeric pour être analysées.

Résultats

1. Article 1 : Specific interaction between Sam68 and neuronal mRNAs : implication for the activity-dependent biosynthesis of elongation factor eEF1A.

Journal of Neuroscience Research. 2009 Janvier ;87(1):12-25.

Julien Grange, Agnès Belly, Stéphane Dupas, Alain Trembleau, Rémy Sadoul, Yves Goldberg.

Contexte de l'étude

Depuis quelques années, la biologie cellulaire a montré que certaines protéines de la machinerie d'épissage des ARNm influençaient également des étapes cytoplasmiques de l'expression génétique : localisation intracellulaire des ARNm matures, traduction et dégradation. C'est ainsi que la reconnaissance et la dégradation d'ARNm anormalement épissés au cours de la traduction dépend du complexe de jonction exonique (Exon Junction Complex, EJC), qui se dépose sur les ARN au cours de l'épissage et leur reste lié pendant l'export nucléaire. Des travaux récents montrent que des protéines d'épissage telles que celles de l'EJC influencent également l'efficacité de traduction des ARNm normaux (Le Hir and Seraphin, 2008). Dans le cas des neurones, le fait que des protéines d'épissage escortent des ARNm jusque dans les dendrites suggère qu'une régulation traductionnelle par ces protéines pourrait avoir un rôle à jouer dans la synthèse de protéines associées à la plasticité synaptique. Plusieurs laboratoires dont le nôtre ont démontré la présence de protéines d'épissage dans le compartiment somato-dendritique. Nous avons porté notre attention sur l'une d'entre elles, appelée Sam68, caractérisée par son affinité particulière pour des tyrosine-kinases de la famille Src, dont on sait qu'elles participent à la signalisation synaptique. Sam68 (Src-associated in mitosis of 68 kDa) appartient à la famille des protéines STAR (Signal Transduction and Activation of RNA) caractérisées par un domaine d'auto-association et de liaison aux ARNs dénomé domaine STAR ou domaine GSG (Lukong and Richard, 2003). Ce domaine GSG est une version étendue du module KH (hnRNP-K homology), structure de liaison protéine-ARN extrêmement conservée dans l'évolution. Outre la région de liaison aux

ARN, Sam68 possède 5 domaines riches en proline dénombré de P0 à P5. Ces sites sont des domaines potentiels d'interaction avec des domaines SH3, conférant à Sam68 la propriété de s'associer avec de nombreuses protéines de la signalisation cellulaire, notamment des tyrosines kinases de la famille Src. Sam68 possède aussi dans sa région C-terminale de nombreux résidus tyrosines qui sont des sites potentiels de phosphorylation et d'interaction avec les domaines SH2 de protéines variées, dont les kinases de la famille Src. Ainsi, Sam68 pourrait-être particulièrement adaptée au rôle d'interface entre la régulation des ARN et la machinerie de signalisation active dans les synapses stimulées. Dans les cellules en lignée, Sam68 reste le plus souvent confinée au noyau. Cependant, Sam68 favorise la traduction de certains ARNm rétroviraux (ARNm incomplètement épissés d'HIV), ce qui laisse supposer une possible interaction avec l'appareil de traduction.

Julien Grange, anciennement en thèse dans le laboratoire, a montré que la protéine Sam68 fait partie de ces protéines d'épissage qui accompagnent les ARNm dans les dendrites.
Julien a étudié la distribution subcellulaire de Sam68 en biochimie et en microscopie électronique dans le cerveau de rat (Grange et al., 2004). Sam68 est présente dans des homogénats de cortex, d'hippocampe, de cervelet, et de striatum. Le fractionnement subcellulaire de tissus corticaux indique que Sam68 est enrichie dans la fraction nucléaire ; mais est aussi présente dans la fraction cytosolique et la fraction synaptosomale, où elle est associée aux membranes insolubles dans le Triton-X100. L'analyse en microscopie immuno-électronique d'un cerveau de rat révèle que Sam68 est majoritairement nucléaire mais possède une composante somatodendritique où elle s'associe au réticulum endoplasmique et aux polyribosomes libres. L'association de Sam68 à des polyribosomes dérivés de synaptosomes a été confirmée en biochimie par co-sédimentation sur gradient de sucrose. Pour démontrer que Sam68 se liait *in vivo* à des ARNm dendritique spécifique, Julien a pu détecter par RT-PCR l'ARNm de l'αCaMKII dans des préparations de Sam68 immunoprécipitées à partir de cortex de rat. L'interaction spécifique entre Sam68 et une séquence issue de cet ARNm a été confirmée *in vitro* par des expériences de retard sur gel semi-quantitatif. Dans une étude séparée, le laboratoire a montré que la dépolarisation membranaire prolongée de neurones d'hippocampe en culture provoquait la relocalisation de Sam68, du noyau vers le cytoplasme (Ben Fredj et al., 2004). La protéine se localise dans le soma et les dendrites, où elle s'accumule dans des granules riches en ARN. La délocalisation de Sam68 dans les dendrites est un processus d'export nucléaire actif, requérant l'ouverture des canaux calciques de type-L

(dépendants du voltage), l'activité de la protéine d'export nucléaire, exportine1 et l'intégrité des microtubules.

Ces données suggéraient un rôle pour Sam68 dans la régulation d'ARNm dont la traduction est stimulée par l'activité neuronale. Nous avons donc cherché à identifier les ARNm associés à Sam68 dans les neurones *in vivo* ; puis pour l'un d'entre eux, Eef1a1 (Elongation Factor 1 a1), à déterminer si Sam68 pouvait intervenir dans sa régulation. Notre attention s'est particulièrement portée sur Eef1a1 dans la mesure où cet ARNm code un facteur de traduction et de régulation de l'actine, impliqué dans la plasticité synaptique (Huang et al., 2005; Tsokas et al., 2005), et abondant dans la densité postsynaptique (Cho et al., 2004).

Résultats

Afin d'identifier les ARNm associés à Sam68, nous avons immunoprécipité un lysat de cortex de rat en conditions non dénaturantes, en parallèle avec des IgG anti-Sam68 ou avec les IgG préimmunes du même lapin (évaluation du bruit de fond) (Schéma de la procédure, Figure 1.A.). Les ARNm associés sont amplifiés de manière linéaire afin de conserver leurs proportions relatives (Van Gelder et al., 1990). Ils sont ensuite marqués pendant la transcription par incorporation d'UTP (uridine tri phosphate) couplée soit à la cyanine 3 (Cy3) soit à la cyanine 5 (Cy5). Les ARNm sont ensuite mélangés et hybridés sur la micro-puce « 15K » du NIA, portant 15 000 ADNc de souris déposés ponctuellement (Tanaka et al., 2000). Pour chaque ADNc la fluorescence aux deux longueurs d'onde est mesurée puis les deux valeurs sont comparées (Figure 1.B.). Les ARNm sont considérés comme ayant été immunoprécipités spécifiquement lorsque le niveau de fluorescence est largement plus élevé dans la condition où on a utilisé l'anti-Sam68 que dans la condition où on a utilisé l'anticorps préimmun. Les valeurs de fluorescence ont été converties en scores z afin d'évaluer l'abondance relative de chaque ARNm par rapport à la moyenne de la population, et ainsi d'identifier ceux qui seraient sur-représentés dans l'immunoprécipité. Le tableau A.I. présente les ARNm spécifiquement immunoprécipités. L'ARNm le plus enrichi, Eef1a1, code pour une isoforme d'un facteur d'élongation de la traduction, eEF1A ; cette protéine est une actrice importante de la synthèse protéique et des changements synaptiques à long terme. En effet, sa synthèse est stimulée par l'application de stimulation haute fréquence de tranches

d'hippocampe (Tsokas et al., 2005), mais aussi par l'activation des récepteurs métabotropique du glutamate (Huang et al., 2005).
Nous avons confirmé cette association, en immunoprécipitant Sam68 et en amplifiant Eef1a1 avec des amorces spécifiques (Figure 2.A. panneau du haut). Nous avons aussi confirmé de la même manière l'association entre Sam68 et les ARNm codant la calmoduline 1 (Calm-1), l'actineβ et Uch-L1 (Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1) (Figure 2.A. panneau du bas).
Nous avons reconstitué l'association entre Sam68 et Eef1a1 dans un système hétérologue, des cellules HEK293 exprimant transitoirement une forme étiquetée de Sam68, myc-Sam68 (Figure 2.B et C.).

Afin de déterminer si Eef1a1 appartient à la population des ARNm dont la traduction est activée par les changements synaptiques, nous avons utilisé notre système de dépolarisation *in vitro* de neurones corticaux en culture ; qui consiste à appliquer de manière prolongée une concentration élevée de potassium (25 mM KCl), induisant une dépolarisation générale de la membrane. Les neurones sont ensuite lysés en conditions non dénaturantes et les surnageants post-nucléaires sont déposés sur gradient de sucrose. Après centrifugation, le contenu en ARN de chaque fraction de sucrose est identifié par lecture de l'absorbance à 260 nm. Une RT-PCR avec des amorces spécifiques pour Eef1a1 est réalisée sur chaque fraction. Ainsi nous avons montré que suite à la dépolarisation membranaire Eef1a1 est plus présent dans la fraction polysomiale (Figure 3.A.). Cette fraction correspond à des ARN associés à des ribosomes, c'est-à-dire à des ARNm en cours de traduction. Ainsi, dans notre système *in vitro*, la dépolarisation des neurones active la traduction d'Eef1a1. Ce résultat est en accord avec l'augmentation de la quantité de protéine d'eEF1A dans les neurones corticaux suite à la dépolarisation (Figure 3.B.). Après la dépolarisation, Sam68 s'accumule dans les fractions contenant les polysomes et les granules d'ARN (Figure 3.C.). Ainsi dans des neurones dépolarisés, l'augmentation de la traduction d'Eef1a1 correspond à la présence de Sam68 dans les ribonucléoprotéines associées aux ARNm en cours de traduction.
Ces résultats suggèrent que Sam68 peut réguler la synthèse d'eEF1A.

Afin d'évaluer le rôle de Sam68 dans la régulation de la traduction d'ARNm neuronaux, nous avons utilisé un mutant de Sam68 ne remplissant plus ses fonctions nucléaires mais conservant la capacité d'interagir avec des séquences ARN, Sam68ΔC. En effet, ce mutant a perdu sa séquence de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localisation Signal) et deux sites

de phosphorylation (Figure 4.F.). Dans des lignées cellulaires en culture, ce mutant dirige les ARNm cibles vers des structures inactives pour ce qui est de la traduction et agit donc comme un dominant négatif (Soros et al., 2001). Transfecté dans des neurones d'hippocampe en culture, le mutant est exclu des noyaux et se concentre en agrégats dans le corps cellulaire, et les dendrites (Figure 4.A2. et B.). Le niveau relatif d'expression d'eEF1A endogène est évalué par un marquage immunofluorescent avec un anticorps monoclonal anti-eEF1A. L'immunoréactivité d'eEF1A des neurones exprimant le mutant est plus basse que celle des neurones non transfectés du même champ (Figure 4.C1. et C2.) ; et que celle des neurones exprimant la forme de Sam68 de type sauvage (Figure 4.E).
Ces résultats suggèrent que Sam68 est impliquée dans l'activation de la traduction de l'ARNm de Eef1a1.

Dans des cellules non neuronales, Sam68 interagit avec des molécules de la signalisation associées aux membranes (Lukong and Richard, 2003). Nous nous sommes demandé si Sam68 pouvait interagir physiquement avec des récepteurs synaptiques. Nous avons préparés des membranes synaptiques à partir de cortex de rat et immunoprécipité Sam68. Nous avons détecté une interaction avec la sous unité NR1 du récepteur NMDA et avec PSD95 (Figure 5. Pistes 1 à 6). En revanche, nous n'avons pas détecté d'interaction avec les sous unité GluR2/3 des récepteurs AMPA (Figure 5. Pistes 7 à 9) ; Sam68 est donc spécifiquement recruté par le complexe du récepteur NMDA. De plus malgré la faiblesse (connue) de l'anticorps anti-NR1 en matière d'immunoprécipitation, Sam68 est détecté lorsqu'on immunoprécipite NR1 (Figure 5. Pistes 10 et 11). Vu sa présence dans le complexe formé par PSD-95 et le récepteur NMDA, Sam68 pourrait en théorie fournir une plateforme d'amarrage pour des ARNm neuronaux spécifiques et/ou recruter spécifiquement des facteurs de traduction à des sites subsynaptiques.

Cette étude indique que Sam68 est associée dans le cerveau à un éventail large mais sélectif d'ARNm cytoplasmiques codant des protéines impliquées dans la plasticité à long terme. La dépolarisation induit le recrutement de Sam68 aux polysomes, et par là même l'ARNm d'Eef1a1 se trouve engagé dans la traduction ; de plus, le fait que le mutant Sam68ΔC inhibe l'accumulation de la protéine eEF1A, suggère que Sam68 est impliquée dans l'activation de la traduction de l'ARNm de Eef1a1.

Journal of Neuroscience Research 87:12–25 (2009)

Specific Interaction Between Sam68 and Neuronal mRNAs: Implication for the Activity-Dependent Biosynthesis of Elongation Factor eEF1A

Julien Grange,[1,2] Agnès Belly,[1,2] Stéphane Dupas,[3,4] Alain Trembleau,[3,4] Rémy Sadoul,[1,2] and Yves Goldberg[1,2,5]*

[1]Université Joseph Fourier, Grenoble Institute of Neuroscience, Grenoble, France
[2]INSERM Research Centre U836, Grenoble Institute of Neuroscience, Grenoble, France
[3]Ecole Normale Supérieure, Paris, France
[4]CNRS, UMR 8542, Paris, France
[5]CEA, GPC, Grenoble Institute of Neuroscience, Grenoble, France

In cultured hippocampal neurons and in adult brain, the splicing regulatory protein Sam68 is partially relocated to the somatodendritic domain and associates with dendritic polysomes. Transfer to the dendrites is activity-dependent. We have investigated the repertoire of neuronal mRNAs to which Sam68 binds in vivo. By using coimmunoprecipitation and microarray screening techniques, Sam68 was found to associate with a number of plasticity-related mRNA species, including Eef1a1, an activity-responsive mRNA coding for translation elongation factor eEF1A. In cortical neuronal cultures, translation of the Eef1a1 mRNA was strongly induced by neuronal depolarisation and correlated with enhanced association of Sam68 with polysomal mRNAs. The possible function of Sam68 in Eef1a1 mRNA utilization was studied by expressing a dominant-negative, cytoplasmic Sam68 mutant (GFP-Sam68ΔC) in cultured hippocampal neurons. The level of eEF1A was lower in neurons expressing GFP-Sam68ΔC than in control neurons, supporting the proposal that endogenous Sam68 may contribute to the translational efficiency of the Eef1a1 mRNA. These findings are discussed in the light of the complex, potentially crucial regulation of eEF1A biosynthesis during long-term synaptic change. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: dendritic mRNA; activity-dependent translation; RNA-binding protein; plasticity

The translation of neuronal mRNAs is regulated by their association with specific RNA-binding proteins, an increasing variety of which have been identified (Kiebler and Bassell, 2006; Bramham and Wells, 2007). In the well-studied cases of CPEB, FMRP, and ZBP-1, the proteins maintain the target mRNAs in a dormant state during transport or storage; this inhibitory function is thought to be suppressed by activity-dependent phosphorylation events, e.g., in the vicinity of synapses (Huang et al., 2002; Bagni and Greenough, 2005; Huttelmaier et al., 2005). In addition to these predominantly cytoplasmic proteins, recent evidence from nonneuronal systems indicates that nuclear proteins of the splicing machinery may also contribute to the control of translation. For example, SR splicing factors continuously shuttle between nucleus and cytoplasm, where they can bind to mature mRNAs and promote translation (Sanford et al., 2004). Translational efficiency can also be increased by splicing proteins that are deposited onto RNA substrates during the splicing process itself and that remain bound to the mRNA after nuclear processing and export have been completed (Le Hir et al., 2000; Wiegand et al., 2003; Kunz et al., 2006). Interestingly, a diversity of splicing factors has been found to exist in neuronal dendrites (Glanzer et al., 2005). One of those is Sam68, a ubiquitous RNA-binding protein implicated in signal-dependent splice site selection, which can also function as an adaptor and substrate for Src family kinases (Matter et al., 2002; Lukong and Richard, 2003; Paronetto

The first two authors contributed equally to this work.

Alain Trembleau's current address is Université Pierre et Marie Curie Paris 6, F-75005 Paris, France, or CNRS, UMR 7102, F-75005 Paris, France.

Contract grant sponsor: INSERM; Contract grant sponsor: Université Joseph Fourier; Contract grant sponsor: Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche; Contract grant sponsor: Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC); Contract grant sponsor: Fondation pour la Recherche Médicale.

*Correspondence to: Dr. Yves Goldberg, PhD, Université Joseph Fourier, Grenoble Institute of Neuroscience, Bâtiment Edmond. J. Safra, Site Santé, Domaine de la Merci, F-38042 Grenoble Cedex 9, France. E-mail: yves.goldberg@ujf-grenoble.fr

Received 7 December 2007; Revised 7 April 2008; Accepted 27 May 2008

Published online 18 August 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21824

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

et al., 2007). In cultured cell lines, Sam68 is a nuclear, nonshuttling protein; however, it is required to enhance the nuclear export and/or translation of certain retroviral mRNAs, indicating a potential interaction with translation-activating factors (McLaren et al., 2004; Modem et al., 2005). Besides viral mRNAs, Sam68 can bind to a select population of mature cellular mRNAs derived from cultured HeLa cells (Itoh et al., 2002); the functional outcome of these binding interactions has not been determined.

We previously reported that Sam68 was among the proteins associated with neuronal mRNAs (Ben Fredj et al., 2004; Grange et al., 2004). In adult cortical and hippocampal tissue, biochemical fractionation and immunoelectron microscopy indicated that Sam68 molecules were associated with dendritic polysomes, suggesting a possible positive role in translational regulation (Grange et al., 2004; Khandjian et al., 2004). In cultured hippocampal neurons, a minor but detectable fraction of endogenous or green fluorescent protein (GFP)-tagged Sam68 molecules was found to occur in the soma and dendrites, concentrated in generally immobile, RNA-rich granules. After prolonged membrane depolarization by elevated KCl, the proportion of Sam68 in the cytoplasm was strongly increased, because of massive migration of the protein to these somatodendritic sites (Ben Fredj et al., 2004). These results suggest that Sam68 may play a part in the regulation of those mRNAs that become translationally activated in response to electrical activity. To test this hypothesis, we have investigated the identity of mRNA species that were bound to Sam68 in cortical neurons in vivo. We found that one major target was Eef1a1, an mRNA known to be activated during long-term synaptic change in the hippocampus. In cultured neurons, depolarization enhanced the association of both Sam68 and the Eef1a1 mRNA with polyribosomes and increased the amount of its product, the eEF1A protein. Expression of a dominant-negative Sam68 mutant confined to the cytoplasm was able to lower the amount of eEF1A, supporting the proposal that Sam68 promotes the translation of neuronal Eef1a1.

MATERIALS AND METHODS

Immunoprecipitation of Sam68-Associated RNA and Preparation of Amplified RNA Probes

Cortical Sam68-RNA complexes were prepared as previously described (Grange et al., 2004). Briefly, the cortex from one adult rat was dissected and lysed at 4°C in polysome dissociation buffer [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM dithiothreitol (DTT), 100 nM microcystine-LR (Sigma, St. Louis, MO), protease inhibitors (Complete; Roche Molecular)] containing 0.5% Triton X-100, 160 mM sucrose, 30 mM EDTA, pH 8.0, and 400 U/ml RNAsin (Promega, Madison, WI). After clarification by centrifugation at 82,000*g* for 20 min at 4°C, the lysate was precleared with protein G-Sepharose beads (GE Healthcare), then immunoprecipitated with affinity-purified anti-Sam68 IgG (AD-1) or with preimmune protein A-purified IgG from the same rabbit. Immune complexes were collected onto protein G-Sepharose beads, washed, and processed for RNA purification using the "RNEasy" kit (Qiagen France, Courtaboeuf, France). The immunoprecipitated poly-A^+ RNAs were linearly amplified by cDNA synthesis and T7 polymerase transcription (Gelder et al., 1990), using the MessageAmp aRNA Kit (Ambion, Austin, TX). According to whether the template RNA originated in the specific immunoprecipitate or the preimmune control, either cyanine 3 (Cy3) or cyanine 5 (Cy5)-labeled UTP was incorporated during transcript synthesis, as per the manufacturer's instructions. Transcripts amplified from the specific immunoprecipitate and the corresponding control were mixed in equal amounts and used to probe the 15,000 cDNAs arrayed on the NIA 15K microarray (Tanaka et al., 2000). To control for possible biasing by differential incorporation of Cy3 and Cy5, the experiment was repeated with swapping of the fluorophores between "specific" and "background" transcripts.

Quantitation of Hybridization

After hybridization and washing, digital images of the microarray at 635 nm and 532 nm were acquired by laser scanning confocal microscopy. Fluorescent spots were delineated and quantitated with GenePix software (Axon Instruments, Burlingame, CA). Raw fluorescence values (F) in each channel were converted into their Log_2. After Cy3 labelling of background RNAs, immunoprecipitation of any given mRNA was considered specific when the value in the Cy5 channel exceeded that in the Cy3 channel by at least 4 Log_2 units (a 16-fold difference). When background RNAs were labelled with Cy5, the cutoff was brought down to 0.5 Log_2 unit (an 1.4-fold difference). This differential cutoff was applied to compensate for the systematic bias in labelling efficiency in favor of Cy5. Note that the requirement for higher Cy3 labelling of specifically immunoprecipitated RNAs is conservative and likely excludes a number of Sam68-associated mRNAs. Z scores were calculated as $(Log_2F - \langle Log_2F \rangle)/\sigma_{Log_2F}$, where $\langle Log_2F \rangle$ is the mean and σ_{Log_2F} is the standard deviation, both calculated over the entire population of fluorescence values in the relevant channel (Mayne et al., 2001). Reproducibility of the overall population of z scores was measured by simple linear regression between experiments, and 95% confidence intervals were calculated for the z scores of Table IA using *t* statistics ($n = 3$), and individual mRNAs with lower confidence limit $z_{min} < -1.0$ were rejected for inclusion in the table; more than 80% of these scores had lower limit above zero. Frequencies of GO descriptors were computed from ~4,000 functionally described genes of the microarray (available through http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/NIA-CloneSet-GoTermFinder. html).

Polymerase Chain Reactions

Immunoprecipitated or total RNA was reverse-transcribed with the universal primer $GGAATTC(T)_{17}$, and the resulting cDNA was amplified by using the gene-specific primer pairs listed in Table II. For classical PCR, after 2 min at 95°C, 30 cycles were performed (15 sec at 95°C, 30 sec annealing and 30 sec at 72°C for each cycle). For quantitative

PCR by real-time fluorometry (Light Cycler; Roche Molecular Systems), DNA was denatured at 95°C for 5 min, then subjected to ~35–40 amplification cycles (15 sec at 95°C, 5 sec annealing, 15 sec at 72°C, all temperature changes at 20°C/sec). Annealing took place at 55°C, except for that of Arc (57°C). The relative amounts of specific DNA template were determined by counting the number of cycles needed to reach the inflection point ("crossing point" at which $d^2[DNA]/dt^2 = 0$) of the DNA accumulation curve (typically between 25 and 32) and standardized by relating to a scale generated with known amounts of total cDNA. The specificity of the amplification product was confirmed by checking its melting curve with the Light Cycler and its size on an agarose gel.

Immunoprecipitation of RNA-mycSam68 Complex From HEK Cells

HEK-293 cells were grown in Dulbecco's modified minimum essential medium, containing 10% fetal calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA). The myc-Sam68 expressing plasmid was a kind gift from I. Barlat and B. Tocqué (at the time at Aventis Pharma, Vitry, France). One 6-cm dish of cells was transfected with either myc-Sam68 or with control vector (containing a CMV promoter), and, 48 hr later, cells were lysed in polysome dissociation buffer. After clarifying by centrifugation, the lysate was immunoprecipitated with 2 μg anti-myc monoclonal antibody (12CA5; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and protein G-Sepharose beads, as described for brain lysates. Total RNA was isolated and amplified by RT-PCR as decribed above.

Neuronal Cultures and Transfections

Primary cultures of rat hippocampal neurons were prepared from fetal (E19) hippocampi and seeded at a density of 6,000 cells/cm^2 onto poly-L-lysine-coated glass coverslips (Marienfeld, Germany), adhering to the procedure described by Goslin and Banker (Banker et al., 1998), except that the culture medium was Neurobasal with B27 supplement (Invitrogen). Housing and handling of animals complied with the regulations issued by the European Union and INSERM and were approved by the local veterinary authorities. The GFP-Sam68 (WT) and GFP-Sam68ΔC plasmids were kind gifts from S. Richard (McGill University, Montréal, Quebec, Canada). The mRFP1 plasmid (expressing monomeric red fluorescent protein) was a kind gift from R.Y. Tsien (UCSD, San Diego, CA). Transfection was performed at 9 DIV by calcium phosphate coprecipitation, exactly according to Goetze et al. (2004). We used a mix of 2.5 μg GFP-Sam68 and 0.5 μg mRFP1 plasmids per coverslip. Expression of the GFP-Sam68 and GFP-Sam68ΔC plasmid was stable for the next 10 days. Neurons were fixed at 14–19 DIV and processed for immunofluorescent staining.

Primary cortical neurons were prepared from E16 fetal cortices, using essentially the same procedure as for hippocampal neurons. The cortical cells were seeded at a density of 10^5 cells/cm^2 onto poly-L-lysine coated 10-cm dishes (Nunc). Neurons at 9 DIV were treated for 3 hr with either depolarizing medium (containing, in mM: KCl, 25; $CaCl_2$, 1.8; $MgCl_2$, 0.8; NaCl, 100; $NaHCO_3$, 26; NaH_2PO_4, 1; glucose, 30; Hepes-NaOH, 15) or control solution (same except for KCl, 5; NaCl, 120).

Sedimentation of Polysomes on Sucrose Gradients

RNA-protein complexes were fractionated as described by Krichevsky and Kosik (2001). Briefly, cortical neurons were lysed in low-salt buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM RNasin, 1 mM dithiothreitol, 0.3% Triton X-100, and 0.05 M sucrose) containing protease inhibitors (EDTA-Free Complete; Roche Molecular), 1 mM vanadate, and 100 nM microcystin LR. Nuclei and the majority of mitochondria were sedimented by centrifugation for 10 min at 10,000*g* at 4°C. The NaCl and $MgCl_2$ concentrations in the cytoplasmic extracts (supernatants) were adjusted to 170 and 13 mM, respectively. Linear sucrose gradients (15–45% w/w in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) were prepared using an AutoDensi Flow apparatus (Büchner). Cytoplasmic extracts (1.2 ml) were overlaid onto 10.6-ml gradients and centrifuged at 32,000 rpm for 2.5 hr at 4°C in a SW41 rotor. Fractions of 1 ml volume were collected with online UV absorbance measurement at 254 nm (GE Healthcare Akta Prime). For Western immunoblotting, the protein content of the fractions was concentrated by trichloroacetic acid precipitation, redissolved in Laemmli buffer, and analyzed on 8% polyacrylamide/SDS gels. For RT-PCR, RNA was extracted by treating the relevant fractions with Trizol reagent (Invitrogen), precipitated with ethanol, and subjected to RT-PCR with the same primers as described above.

Detection of eEF1A Protein Increase by Immunoblotting

Cortical neurons were treated with control or depolarizing medium as above, then lysed in ice-cold RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease inhibitors (EDTA-Free Complete; Roche Molecular). After clarification by centrifugation (15 min at 12,000*g*), equal protein amounts of each lysate were analyzed by 10% polyacrylamide-SDS gel electrophoresis and immunoblotting, first with anti-eEF1A monoclonal antibody (UBI), then with antiactin polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology). Immunoreactive bands were revealed by chemiluminescence (Pierce Femto) and autoluminography. The films were digitized by scanning, and the integrated intensity of the bands was determined by using Metamorph software (Universal Imaging). Immunoblotting and exposure conditions were calibrated so that the integrated intensity of the bands was in the linear range with respect to protein amount.

Immunofluorescence of eEF1A in Hippocampal Neurons

Neurons were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) containing 4% sucrose (30 min, 4°C), permeabilized with 0.2% Triton X-100, blocked with 10% preimmune goat serum in PBS (25°C, 1 hr), and stained with 1 μg/ml anti-eEF1A monoclonal antibody (UBI) in PBS containing 3% goat serum (25°C, 2 hr), then with Alexa 350-conjugated secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR). After washing, coverslips were mounted with Mowiol and observed on a Zeiss microscope fitted with an epifluorescence setup

and a cooled CCD camera (Zeiss Axiocam) or with a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 510).

For quantitation of eEF1A fluorescence, fields containing transfected neurons were imaged at low magnification (×20). Imaging conditions were identical for all fields. Images were processed with Metamorph (Universal Imaging). For each image, a background image was produced with a low-pass filter and subtracted to remove low-frequency fluorescence noise resulting, e.g., from local unevenness in illumination. Next, a lower fluorescence threshold was set, which allowed automatic delineation and analysis of the fluorescent objects (cells), using Integrated Morphometric Analysis. The same threshold was used throughout the entire analysis. The relative eEF1A fluorescence of each transfected neuron, i, was calculated according to the equation: $IF_{transf.,i} = eEF1A_{transf.,i}/\langle eEF1A\rangle_{nontransf.}$ where $eEF1A_{transf.,i}$ is the mean gray level per pixel within the transfected neuron, and $\langle eEF1A\rangle_{nontransf.}$ is the average (over 15 surrounding neurons) of the mean gray level per pixel within nontransfected neurons. These $IF_{transf.,i}$ values were averaged over the entire set of transfected neurons, to yield the values in Figure 4E.

Immunoprecipitation of Sam68-NMDA Receptor Complexes

Rat cortical synaptic membranes were prepared by differential centrifugation as described by Grange et al. (2004) and resuspended in ice-cold buffer containing 4 mM Hepes (pH 7.4), 1 mM preboiled sodium orthovanadate, 1 mM dithiothreitol, 100 nM microcystin (Sigma), and a mix of protease inhibitors (''Complete''; Roche). An aliquot of suspension (530 μl, 4.5 μg/μl total protein) was solubilized by adding 1:9 vol of detergent solution (10% sodium deoxycholate in 0.5 M Tris, pH 9.0) and gently agitating for 20 min. Triton X-100 (0.1% final concentration) was then added, and the extract was dialyzed overnight against immunoprecipitation buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM sodium orthovanadate, 5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, 1 nM microcystin, and protease inhibitors). The dialyzed extract was centrifuged for 30 min at $10^5 g$ in a TL-100 tabletop ultracentrifuge (Beckman), and the supernatant (300 μg protein diluted to 500 μl buffer per IP) was used for immunoprecipitation for 3 hr with 10 μg affinity-purified anti-Sam68 polyclonal antibody, or preimmune IgG purified from the same rabbit, or with anti-NR1 monoclonal antibody (Pharmingen). Immunoprecipitates were collected onto protein G-Sepharose beads and analyzed by SDS-PAGE (8% polyacrylamide gel) and Western immunoblotting. Antibodies used for immunoblotting were purchased from UBI (anti-PSD95 monoclonal antibody) and Chemicon (anti-GluR2/3 rabbit polyclonal antibody). The bands were revealed by chemiluminescence (Pierce Femto).

RESULTS

Identification of Eef1a1 in the Repertoire of Sam68-Associated mRNAs

Following an approach initiated by Tenenbaum et al. (2000), we decided to use a combination of coimmunoprecipitation and array screening to probe the repertoire of Sam68-associated mRNAs in cortical neurons. Sam68-mRNA complexes were immunoprecipitated from a rat cortical cytoplasmic extract with an anti-Sam68 antibody, as previously reported (Ben Fredj et al., 2004). A parallel immunoprecipitation was performed with preimmune antibody. The poly-A^+ RNAs associated with the Sam68 and control immunoprecipitates were linearly amplified by cDNA synthesis and T7 polymerase-mediated transcription, as initially described by Eberwine and coworkers (Gelder et al., 1990), and the amplified transcripts were fluorescently labeled with Cy3 or Cy5, respectively. The two transcript populations were then mixed and hybridized with the ~15,000 cDNAs of the NIA ''15K'' clone set arrayed onto a glass slide (Tanaka et al., 2000), and for each cDNA the fluorescence values at both wavelengths were measured and compared (Fig. 1A,B). A given mRNA was considered to be specifically immunoprecipitated when the fluorescence level was consistently higher in the channel corresponding to the immunospecific than in the background precipitation. To compare mRNA abundance measurements across several experiments, normalized measures of the relative abundance of each mRNA in the immunoprecipitated population were calculated by converting the fluorescence values into z scores (Mayne et al., 2001; Lopez de Silanes et al., 2004; see Materials and Methods). Duplicate assays of the same RNA population showed that z scores were highly reproducible through the entire set of ~15,000 genes, except for a limited number of low-abundance mRNAs, indicating that abundance measurements were not grossly perturbed by fluctuations in the hybridization and detection procedure (Fig. 1C). When distinct experiments with different brain samples were compared, fluctuations in individual z scores were larger, likely because of random differences in the hydrolysis or dissociation rates of individual mRNAs during immunoprecipitation. The correlation between samples remained sufficient to ensure that the species scoring highest ($z > 1.5$) in one trial retained an 85% probability of scoring positive ($z > 0$) in a second trial (Fig. 1D). To obtain reliable identification of the most abundant mRNAs in the immunoprecipitate, z scores were measured in three independent experiments, mRNAs were ranked by decreasing mean z score, and some species with unacceptably large standard deviations were excluded. Table IA shows those specifically immunoprecipitated mRNA species for which the mean relative abundance was highest after applying this screen.

The dual-channel procedure was then used to compare the relative abundances of mRNA species in the immunoprecipitated vs. total poly-A^+ populations. The total population of poly-A^+ RNAs present in the input extract (before immunoprecipitation) was amplified, and the resulting Cy5-labeled transcripts were mixed with an aliquot of Cy3-labeled transcripts derived from the Sam68 immunoprecipitate. After hybridization to the array, z scores were calculated for each channel. The species of Table IA scored 0.6–1.0 units higher in

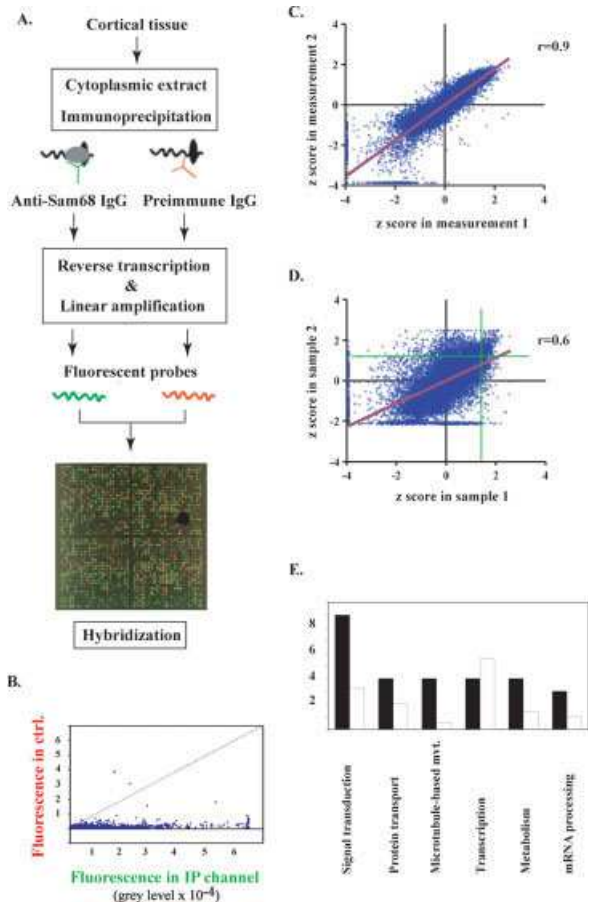


Fig. 1. **A:** Scheme of the RNA-protein coimmunoprecipitation procedure and image of a representative hybridization experiment. Green channel: Cy5-labelled probes obtained by amplification of poly-A^+ mRNA immunoprecipitated with the anti-Sam68 antibody. Red channel: Cy3-labelled probes obtained after immunoprecipitation with control (preimmune) antibody. **B:** Distribution of paired fluorescence values obtained in A. X-axis: specifically immunoprecipitated transcripts. Y-axis: adventitious transcripts. Large numbers of transcripts are more abundant in the specific immunoprecipitate than in the control. **C:** Within-sample reproducibility of z score measurements. The results of two different hybridization experiments performed with the same sample are compared. The regression line is shown in red. **D:** Between-sample reproducibility of z scores. The results of hybridization experiments performed on two different brain extracts are compared. The regression line is shown in red. Note that mRNAs with the highest values in either sample (to the right of the vertical green line and above the horizontal green line) are mostly confined to the top right quadrant. **E:** Functional profile of the 43 mRNAs displaying the highest mean z scores in the immunoprecipitates (see Table IA). For each transcript, a generic function was registered (identified by Gene Ontology descriptors of the mRNA in the NIH database; see Table IA). Solid bars: number of occurrences of the indicated functional descriptors in the 43 mRNA sample. Open bars: expected number of occurrences of the descriptors, based on their frequencies among mRNAs of the microarray. The difference is highly significant ($P < 0.0001$, χ^2 test), indicating enrichment for specific functional categories. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

the immunoprecipitated than in the total population, consistent with their enrichment.

There was a discernible pattern in the biological functions of these mRNAs (Fig. 1E). When assessed by Gene Ontology annotation for generic cellular process or component, more than 20% of the mRNAs (nine transcripts) were involved in intracellular or receptor-associated signal transduction, insofar as they coded for, e.g., receptor subunits, protein kinases, protein phosphatases, and associated regulatory factors. Another 20% of the mRNAs coded for proteins involved in protein transport, as regulators either of vesicular traffic or of microtubule-dependent motion. These proportions are significantly higher than what would be expected based on the overall distribution of biological functions among the genes represented on the microarray (Fig. 1E). By comparison, transcription regulators appeared to be underrepresented among the major Sam68-associated mRNAs. Assessment of the litterature further indicates that some of the proteins in Table IA contribute to exocytic and endosomal traffic (Arf-1, vacuolar ATPase) or to cytoskeletal regulation (stathmin), even though this is not apparent from their GO function label. All of these processes are heavily involved in the local response to stimuli that affect neuronal homeostasis and plasticity. Indeed, more than one-third of the genes in Table IA code for proteins directly involved in synaptic plasticity, connectivity development, or neurodegenerative disease (Table IB).

The β-actin mRNA, which was among the most abundant species detected in our screen, had formerly been detected by RT-PCR in immunoprecipitates of brain Sam68 (Ben Fredj et al., 2004) and was known as a specific target for recombinant Sam68 (Itoh et al., 2002). This provided a positive control for the immunoprecipitation procedure. The gephyrin mRNA provided a negative control, in that it was found neither by RT-PCR nor in the microarray analysis (data not shown; Grange et al., 2004).

The most enriched mRNA, Eef1a1, coded for the ubiquitous isoform of translation elongation factor eEF1A, an important player in both protein synthesis and long-term synaptic change (see Discussion). The z score of the Eef1a1 fluorescence indicates that the representation of Eef1a1 among immunoprecipitated mRNAs is significantly higher than average ($P = 0.004$).

RT-PCR with gene-specific primer pairs (see Table II) was used to confirm the specific coimmunoprecipitation of a range of mRNAs detected in the microarray analysis, with a focus on transcripts coding for proteins implicated in synaptic plasticity. In addition to β-actin, we confirmed the coprecipitation of the Eef1a1 calmodulin I and Uch-L1 mRNAs, respectively, selected among the high- and low-scoring transcripts of Table IA. (Fig. 2). Notably, Uch-L1 is also strongly involved in the pathogenesis of Parkinson's and Alzheimer's diseases (references in Table IB). Interestingly, the Arc/Arg 3.1 mRNA, which was present among the less abundant mRNAs in the microarray analysis (below

TABLE IA. Identity and Generic Function of Major Sam68-Associated mRNAs*

ID	Name	Mean z ± S.D.	*P* Value	Process or Component	GO
AW557547	Translation elongation factor 1 alpha 1, Eefla1	2.66 ± 0.97	0.004	Protein biosynthesis	06412
BG086025	ATPase, H^+ transporting, VI subunit B, isoform 2, Atp6v1b2	2.55 ± 1.07	0.005	Proton transport	15992
BG076172	Calmodulin-1, Calm1	2.36 ± 1.11	0.009	Signal transduction	07165
BG088462	Zfhxla, C2-H2 zinc finger protein homebox 1a	2.35 ± 1.29	0.009	Regulation of transcription	06355
AW558451	Reticulon 3,Rtn3	2.28 ± 0.60	0.011	Protein transport	15031
BG088310	Prosaposin	2.1 ± 0.88	0.018	Metabolism	08152
BG071424	BRI3	2.04 ± 0.28	0.021	Integral to membrance	16021
BG073409	Stathmin 1,Stmn 1	1.98 ± 0.48	0.024	Signal transduction	07165
BG065012	14-3-3 eta, Y whah	1.86 ± 0.82	0.031	Signal transduction	07165
BG075901	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit, Gabra3	1.86 ± 0.36	0.031	Synaptic transmission	07268
BG076067	Inositol hexaphosphate kinase 1	1.86 ± 0.50	0.032	Metabolism	08152
BG085717	14-3-3 epsilon, Y whae	1.85 ± 0.84	0.032	Signal transduction	07165
BG082675	ADP-ribosylation factor 1, Arf-1	1.85 ± 0.90	0.032	Signal transduction	07165
BG075782	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma, Ppp1cc	1.83 ± 0.76	0.034	Signal transduction	07165
BG075243	Zinc transporter ZnT-3	1.8 ± 0.27	0.036	Cation transport	06812
BG077677	Beta-actin	1.78 ± 0.53	0.037	Cytoskeleton	07010
BG065113	Branched chain aminotransferase, bcat-1	1.78 ± 1.51	0.038	Metabolism	08152
BG064914	Malate dehydrogenase, Mor2	1.73 ± 0.61	0.042	Metabolism	08152
BG087365	Neuroplastin	1.69 ± 0.86	0.046	Surface receptor signal transduction	07166
BG073370	Tetratricopeptide repeat domain 3, Ttc3	1.69 ± 1.29	0.046	Protein binding	05515
BG074109	Heat shock protein 1, alpha, Hspca	1.67 ± 1.15	0.047	Chaperone activity	03754
BG088451	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2, Timp2	1.61 ± 0.77	0.053	Extracellular matrix	05578
BG075319	Mitogen activated protein kinase 3, pp44 MAPK, Erk1	1.61 ± 0.57	0.054	Signal transduction	07165
BG074398	Matrix glycoprotein sparcl1 / hevin	1.54 ± 0.64	0.062	Extracellular matrix	05578
BG073255	Tetraspanin TM4-A	1.5 ± 0.86	0.066	Integral to membrance	16021
BG082737	Proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein, prelp	1.46 ± 0.64	0.073	Extracellular matrix	05578
BG073185	BTB (POZ) domain containing 4, KBTBD4	1.41 ± 1.05	0.079	Regulation of transcription	06355
BG088334	Vacuolar protein sorting 41	1.4 ± 0.05	0.081	Protein transport	15031
BG087861	Dynein, cytoplasmic, intermediate chain 1, Dncic1	1.39 ± 0.39	0.082	Microtubule-based movement	07018
BG085988	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2, Hnrph2	1.35 ± 0.91	0.089	mRNA processing	06397
BG073339	Splicing factor, arginine/serine-rich 5, Srp40 / HRS	1.31 ± 0.72	0.096	mRNA processing	06397
AW553322	G protein-coupled receptor associated sorting protein 1	1.27 ± 0.86	0.102	Protein transport	15031
BG073253	RabllB	1.23 ± 1.25	0.109	Protein transport	15031
BG086823	Myeloid leukemia factor 2, parathymosin	1.23 ± 0.78	0.109	Immune response	06955
BG072963	Dynein heavy chain	1.23 ± 0.21	0.110	Microtubule-based movement	07018
BG086722	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1, UCH-L1	1.16 ± 0.98	0.122	Ubiquitin-dependent protein catabolism	06511
BG086087	Fanconi anemia-associated protein of 100 kDa, Faap100	1.11 ± 1.31	0.134	Response to DNA damage	06974
BG086010	Dynein intermediate chain 2, Dyncli2	1.11 ± 0.12	0.134	Microtubule-based movement	07018
BG088587	Beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein)	1.09 ± 0.43	0.137	Autophagy	06914
BG080018	Nuclear protein Nulp1/ bHLH Tcf25	0.99 ± 0.72	0.161	Regulation of transcription	06355
BG088909	Transducin-like enhancer of split 6, TLE6 / Grg6	0.99 ± 1.01	0.162	Regulation of transcription	06355
BG076556	Famesyltransferase beta subunit	0.98 ± 1.10	0.162	Regulation of cell proliferation	42127
BG069542	hnRNP-El, poly(rC)-binding protein 1	0.98 ± 1.38	0.163	mRNA processing	06397

*ID; Genbank identifier of cloned sequence on the NIA 15 K microarray. Name, name of transcript homologous to the sequence on the array (available through http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/15k.html). Mean z score and its standard deviation (n = 3) were calculated for each transcript as described in the text. *P* values were calculated from z scores, assuming normal distribution of scores. Biological process or component associated with transcripts was identified by reporting Gene Ontology (GO) descriptors used to annotate the transcripts in the NIA database (available through http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/NIA-CloneSet-GoTermFinder.html). Rightmost column: identification of the GO descriptors by their numbering in the Gene Ontology database.

criterion for inclusion in Table IA), could also be detected by RT-PCR (see Fig. 2A). Because both Arc and Eef1a1 are dendritic, activity-responsive mRNAs, this raises the possibility that upon exit to the somatodendritic compartment Sam68 may play a role in activity-induced translation of neuronal mRNAs.

Because Eef1a1 was the most enriched of Sam68-associated mRNAs in our assay, and because its translational regulation by synaptic inputs is well documented (see below), we decided to investigate further its relationship with Sam68. To reconstitute the interaction between Eef1a1 mRNA and Sam68 in a heterologous system, myc-tagged Sam68 or a control plasmid was transiently expressed in HEK 293 cells; cytoplasmic extracts prepared from the transfected cells were immunoprecipitated with anti-myc antibody, and the

TABLE IB. Sam68-Associated Transcripts With Documented Neurobiological Function

	Published evidence
Transcripts involved in synaptic plasticity	
Translation elongation factor 1 alpha 1, Eefla1	Tsokas et al., 2005; Huang et al., 2005
ATPase, H^+transporting, V1 subunit B2, Atp6v1b2	Munton et al., 2007
Calmodulin-1, Calml	Xia and Storm, 2005
14-3-3 Eta, Ywhah	Simsek-Duran et al., 2004
Protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma, Ppplcc	Hu et al., 2006
Beta-actin	Eom et al., 2003 Smalla et al., 2000
Neuroplastin	Thomas and Huganir, 2004
Mitogen activated protein kinase 3, pp44 MAPK, Erk1	
Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1, Uch-Ll	Sakurai et al., 2008
Transcripts involved in neurodegeneration	
14-3-3 epsilon, Ywhae	Toyo-oka et al., 2003
Tetratricopeptide repeat domain 3, Ttc3	Berto et al., 2007
Reticulon 3, Rtn3	He et al., 2004
Prosaposin	Matsuda et al. 2004
Bri3	Wickham et al., 2005
Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1, Uch-Ll	Liu et al., 2002a, 2002b Gong et al., 2006
Beclin-1	Pacheco et al., 2007
Transcript involved in psychiatric disease	
Gamma-aminobutyric acid receptor, subunit Gabra3	Massat et al., 2002

TABLE II. PCR Primers Used in This Study

Transcript	Primers
Arc	Forward: 5′-TGTTGGTAACTGCTCGTGTCTGTAG-3′
	Reverse: 5′-TTTGAGGTAAGATGGTGTGGGC-3′
β-actin	Forward: 5′-TGGCACCACACTTTCTACAATGAG-3′
	Reverse: 5′-AGGCATACAGGGACAACACAGC-3′
Calm-1	Forward: 5′-TCTTCAAGTGCCCCAATCCC-3′
	Reverse: 5′-TCAAGTCCACAGACACAGCCTACTC-3′
Eeflal	Forward: 5′-GGACAGCAAAAATGACCCACC-3′
	Reverse: 5′-TTGATGACACCCACAGCAACTG -3′
Gephyrin	Forward: 5′-AAAGAGGGGAGTGTGTTTTGGC-3′
	Reverse: 5′-AAGGCATTGAGTAAGTCATCTGGG-3′
NR1-1	Forward: 5′-CGTATCCTAGGCATGGTGTGG-3′
	Reverse: 5′-CCCGGTGCTCGTGTCnTGG-3′
β-Tubulin	Forward: 5′-CAGACCAGACAACTTCGTTTTCG-3′
	Reverse: 5′-GTATCAGACACTTTGGGCGAGG-3′
Uch-L1	Forward: 5′-TGCTGCTGCTGTTTCCCCTC-3′
	Reverse: 5′-CCATCCTCAAATCCCAGG1TG-3′

immmunoprecipitates were probed by RT-PCR using the Eef1a1-specific primer pair. Endogenous Eef1a1 transcripts were detected in anti-myc immunoprecipitates from myc-Sam68-expressing cells but not from control cells (Fig. 2C, lanes 1–6). This result was reproduced by quantitative RT-PCR (Fig. 2C). Thus, the Eef1a1 mRNA associates with bona fide overexpressed Sam68. By contrast, the β-tubulin mRNA was absent from myc-Sam68 immunoprecipitates (Fig. 2B, lanes 7–12), supporting the mRNA sequence specificity of binding.

Identification of Eef1a1 as a Translationally Activated mRNA in Depolarized Neurons

The Eef1a1 mRNA contains a 5′ oligopyrimidine tract and belongs to the general group of signal-responsive mRNAs encoding components of the translation apparatus (Petroulakis and Wang, 2002). Moreover, translation of Eef1a1 is stimulated during synaptic change (Tsokas et al., 2005). To determine whether Eef1a1 might belong to the population of translationally activated mRNAs in our system of in-vitro-depolarized neurons, primary cultures of cortical neurons were subjected to control treatment or prolonged depolarization and lysed under nondenaturing conditions, and the postnuclear supernatants were fractionated on sucrose density gradients, as described by Krichevsky and Kosik (2001). Fractions were analyzed for their RNA content by continuous monitoring of UV absorbance during collection. Fractions corresponding to the free mRNPs, 80S monosomes, polyribosomes, and RNA granules (migrating to the bottom of the gradient) were analyzed by RT-PCR with Eef1a1-specific primers. In nonstimulated neurons, the Eef1a1 mRNA was associated to the same extent with free mRNPs and with polysomes. Upon depolarization, Eef1a1 became nearly undetectable in the free mRNP fraction and strongly accumulated in the polysome fraction (Fig. 3A). These data indicate that Eef1a1 mRNA translation is activated by depolarization. Consistently with this result, depolarization of cultured cortical neurons induced a detectable increase in the total level of eEF1A protein, as detected by Western immunoblotting (Fig. 3B). The relative increase remains modest, probably because a high amount of eEF1A preexists at the beginning of the experiment, having had time to accumulate (even at a relatively slow rate) in the neurons (kept for 9 days in vitro) prior to depolarization. However, the increase takes place in only a few hours, in agreement with a much faster rate of biosynthesis, as predicted by the massive recruitment of Eef1a1 mRNA to polysomes.

Depolarization-Inducible Association of Sam68 With Polysomes

We previously reported that Sam68 was associated with polyribosomes in cytoplasmic extracts derived from adult rat cortical tissue (Grange et al., 2004). To confirm that a similar association occurred in cultured cortical neurons,, and to determine whether the interaction could be regulated by depolarization, extracts were prepared and fractionated exactly as in Figure 3A. Fractions

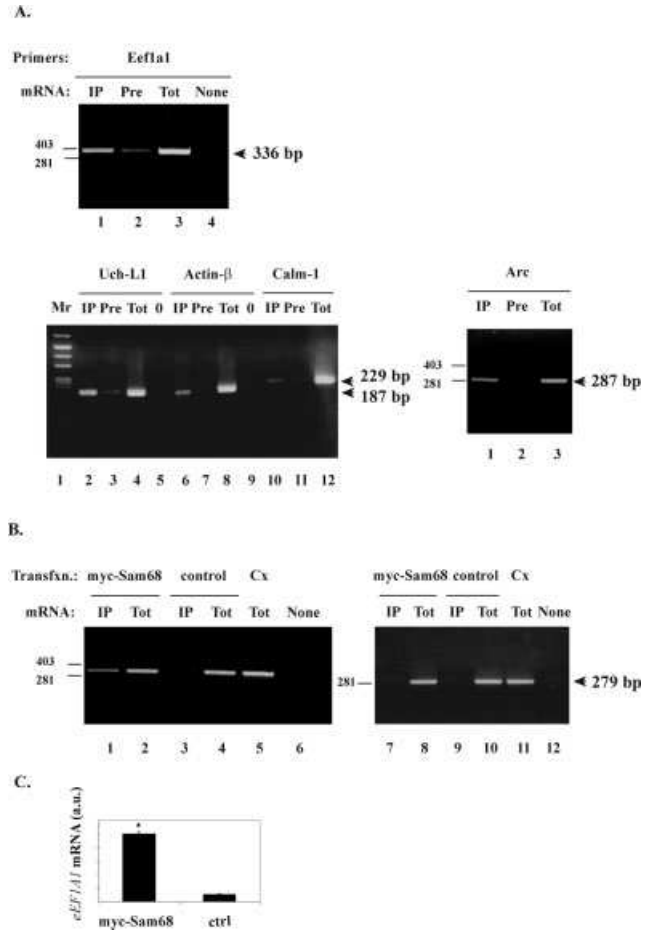


Fig. 2. **A:** Validation of specific microarray hybridization results by RT-PCR. Cortical tissue extract was subjected to immunoprecipitation with anti-Sam68 (''IP'') or preimmune (''Pre'') IgG as shown; total mRNA was purified from the immunoprecipitates and subjected to reverse transcription and amplification by PCR, using the indicated gene-specific primers (Table II). The PCR products were visualized by fluorescent staining with ethidium bromide. The expected sizes of PCR products are indicated (Eef1a1: 336 bp; Uch-L1: 187 bp; β-actin: 178 bp; Calm-1: 229 bp; Arc: 287 bp). Positive controls for the amplification reactions were obtained by performing PCR with total mRNA (''Tot'') directly derived from the input extract. No amplification took place without cDNA (''None'' or ''0''). **B:** Reconstitution of the association between Sam68 and the Eef1a1 mRNA in cultured cells. HEK 293 cells were transfected with a myc-tagged Sam68 expression construct or with control vector as indicated. Cytoplasmic extracts were prepared and immunoprecipitated with anti-myc antibody and subjected to RT-PCR with Eef1a1 (lanes 1, 3) or with β-tubulin (lanes 7, 9) primers. As positive controls for amplification, RT-PCR products were generated with total mRNA from the transfected cells (lanes 2, 4, 8, 10) or from rat cortex (lanes 5, 11). Lanes 6, 12: negative control for PCR. **C:** The amounts of endogenous Eef1a1 mRNA in anti-myc immunoprecipitates from the indicated transfections were determined by quantitative (''real-time'') PCR (n = 3 for each transfection). a.u., arbitrary units. $\star P < 0.05$.

were then analyzed by Western immunoblotting with anti-Sam68 antibody. In extracts from control, quiescent neurons, Sam68 mostly comigrated with free mRNPs; a minor fraction sedimented in the RNA granule fraction (Fig. 3C, top). After depolarization, Sam68 accumulated in fractions containing polysomes and granules, even though the total amount of RNA in those fractions was slightly lower than in the control condition (Fig. 3, bottom). This result is consistent with the depolarization-induced accumulation of Sam68 fluorescence in RNA-enriched dendritic clusters, which we have previously reported (Ben Fredj et al., 2004). Thus, in depolarized neurons, the increase in Eef1a1 translation correlates with the loading of Sam68 onto translated mRNAs.

Effect of Dominant-Negative Sam68 on Neuronal eEF1A Expression

The association of Sam68 with actively translated Eef1a1 mRNA suggests that Sam68 might regulate the synthesis of eEF1A. To investigate this point, we assayed the level of eEF1A immunoreactivity in cultured hippocampal neurons that expressed GFP-tagged derivatives of either wild-type Sam68 or Sam68ΔC, a C-terminally truncated Sam68 mutant. The latter mutant retains a significant affinity for specific RNA sequences but is deprived of tyrosine-rich and proline-rich motifs involved in protein–protein interactions with SH2- and SH3-containing ligands and also of a C-terminal (nonclassical) nuclear localization signal (Fig. 4F). In cultured cell lines, Sam68ΔC is constitutively cytoplasmic and displays transdominant-negative activity toward endogenous Sam68, when coexpressed with retroviral (HIV-1) mRNAs that require Sam68 for efficient utilization (Reddy et al., 1999; Soros et al., 2001). Sam68ΔC is specifically recruited to these viral mRNAs once they have reached the cytoplasm and appears to block their normal interaction with the translation apparatus (Soros et al., 2001). We reasoned that expression of Sam68ΔC in neurons should similarly allow us to probe the contribution of endogenous Sam68 to the translational activity of target neuronal mRNAs, as distinct from its role in nuclear mRNA processing. In transfected neurons, the GFP-Sam68ΔC protein was mostly excluded from the neuronal nucleus and concentrated in clusters within the cell body; it was also detectable in dendritic shafts (Fig. 4A2,B). The relative expression level of endogenous eEF1A in transfected and nontransfected neurons was evaluated by immunofluorescent staining with an anti-eEF1A monoclonal antibody. Among the neurons of a field, those expressing GFP-Sam68ΔC typically had a lower level of eEF1A immunoreactivity than surrounding, nontransfected neurons (Fig. 4A1,C1). This was not the case in neurons that had been transfected with GFP-tagged wild-type Sam68 (Fig. 4D1). Neurons expressing GFP-Sam68ΔC maintained a normal morphology (Fig. 4A1,C3), indicating that the decrease in eEF1A did not arise from some general toxicity of the construct. The effect of GFP-Sam68ΔC expression on endogenous

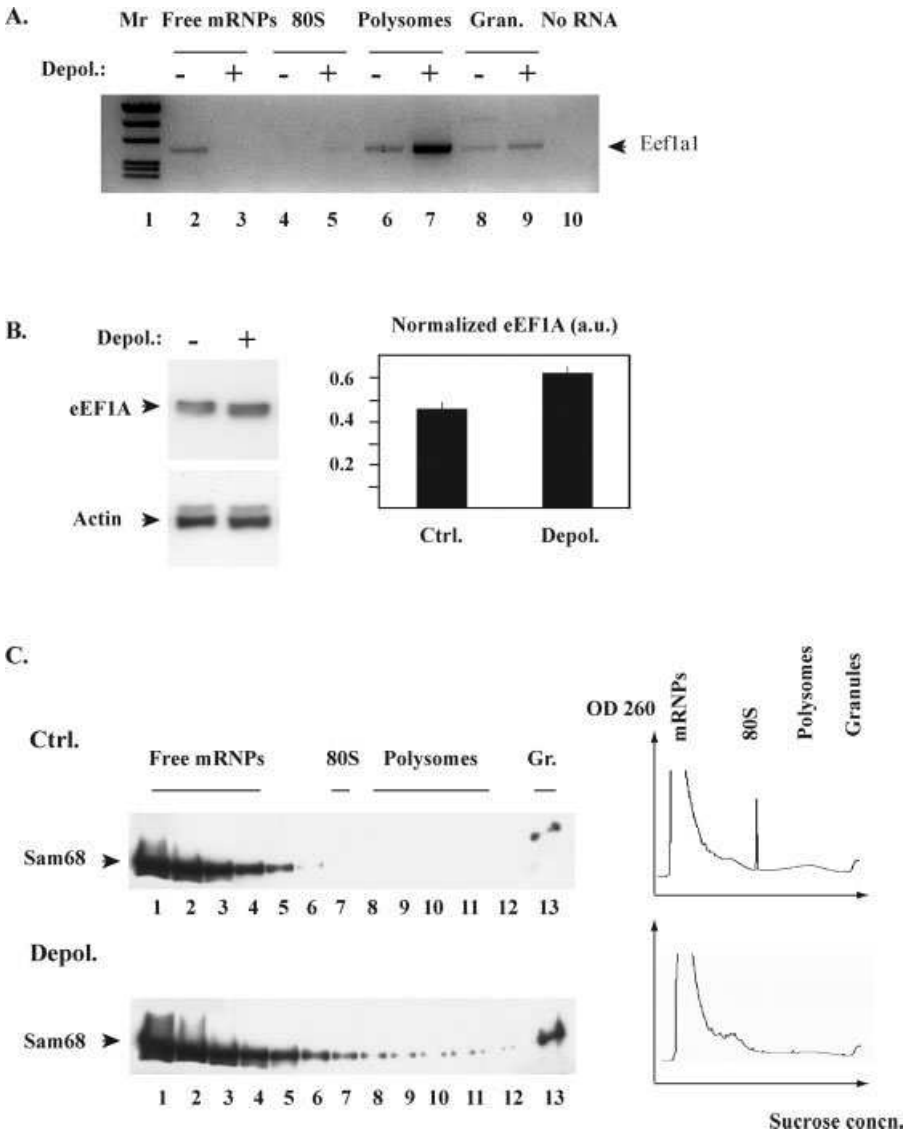


Fig. 3. **A:** Depolarization induces an increase in Eef1a1 mRNA translation. Cultured cortical neurons were incubated for 6 hr in 5 mM or 25 mM KCl, and then cytoplasmic extracts were prepared and equal protein amounts were subjected to fractionation on sucrose density gradients. For each gradient, representative fractions corresponding to translationally inactive mRNPs, 80S monosomes, polysomes, and RNA granules were analyzed by RT-PCR with specific primers to amplify the Eef1a1 mRNA. The PCR products were analyzed side by side on an agarose gel (''–'' and ''+'' lanes: gradient fractions from control and depolarized neurons, respectively) and visualized by fluorescent staining with ethidium bromide. Gray scale was inverted to improve contrast. **B:** Depolarization increases the amount of eEF1A protein. Cortical neurons were treated as in A, then lysed, and equal amounts of total protein were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. Left: the same blot was probed first with anti-eEF1A monoclonal antibody, then with antiactin antibody. Right: the relative amount of eEF1A in each lane was measured by densitometric scanning and normalized to the amount of actin in the same lane to correct for gel loading error. The histogram shows the average (± SD) of normalized eEF1A amount in each condition in duplicate samples. **C:** Depolarization enhances the association of Sam68 with polysomal RNA and RNA granules. Cytoplasmic extracts from control and depolarized neurons were prepared and fractionated as for A. The fractions were analyzed by immunoblotting with anti-Sam68 antibody (left). The distribution of RNA along the gradient was determined by continuous monitoring of UV absorbance at 254 nm during collection of the fractions (right). The various types of ribonucleoproteic assemblies are indicated.

eEF1A immunofluorescence was quantitated by using as internal reference value the average immunofluorescence of nontransfected neurons surrounding the transfected cells (see Materials and Methods). This quantitation procedure indicated that GFP-Sam68ΔC reproducibly lowered the level of eEF1A immunofluorescence, whereas GFP-Sam68 did not (Fig. 4E). As a control, GFP-Sam68ΔC did not affect the abundance of coexpressed

mRFP. Because GFP-Sam68ΔC functions in the cytoplasm and presumably competes with endogenous Sam68 for binding sites in mRNA–protein complexes, this result suggests that endogenous Sam68 positively regulates the translation of eEF1A-encoding mRNAs.

Possible Postsynaptic Anchoring by Sam68

In nonneuronal cells, Sam68 is known to bind to membrane-associated signalling proteins (Lukong and Richard, 2003). In neurons, given its association with dendritic mRNAs that become actively translated in response to local synaptic stimuli (Tsokas et al., 2005), we wondered whether Sam68 might physically interact with synaptic receptors. In synaptic membranes prepared from rat cortex, both the NMDA receptor and the postsynaptic density protein PSD95 could be coimmunoprecipitated with Sam68 (Fig. 5, lanes 1–6). By contrast, AMPA receptors were essentially absent from these immunoprecipitates (lanes 7–9), consistent with the notion that Sam68 was specifically recruited by the NMDA receptor complex. We could also detect Sam68 in NMDA receptor immunoprecipitates (lanes 10, 11). Thus Sam68 might conceivably provide a platform for docking specific neuronal mRNAs and/or for recruiting specific translation factors at subsynaptic sites.

DISCUSSION

The present sudy indicates that brain Sam68 is associated with a wide but selective range of cytoplasmic mRNAs, among which transcripts encoding long-term plasticity-related proteins are prominent. Sam68 might collectively regulate the synthesis of an entire group of such proteins, in an activity-dependent fashion. The set of Sam68-associated mRNAs we found in brain differs from that reported in nonneuronal cell lines or lineages (Itoh et al., 2002; Paronetto et al., 2006; Tremblay and Richard, 2006). Extensive comparison of the different sets is difficult, because the screening methods were different. However, two of the mRNAs, β-actin and dynein, were found in both the study by Itoh et al. (2002) and our screen, providing a reliable positive control. Taken together, the various screens suggest that mRNA recognition by Sam68 is highly dependent on cellular context.

One of most enriched among the Sam68-associated cortical transcripts was the Eef1a1 mRNA. Although Eef1a1 is ubiquitous, the Sam68–Eef1a1 mRNA interac-

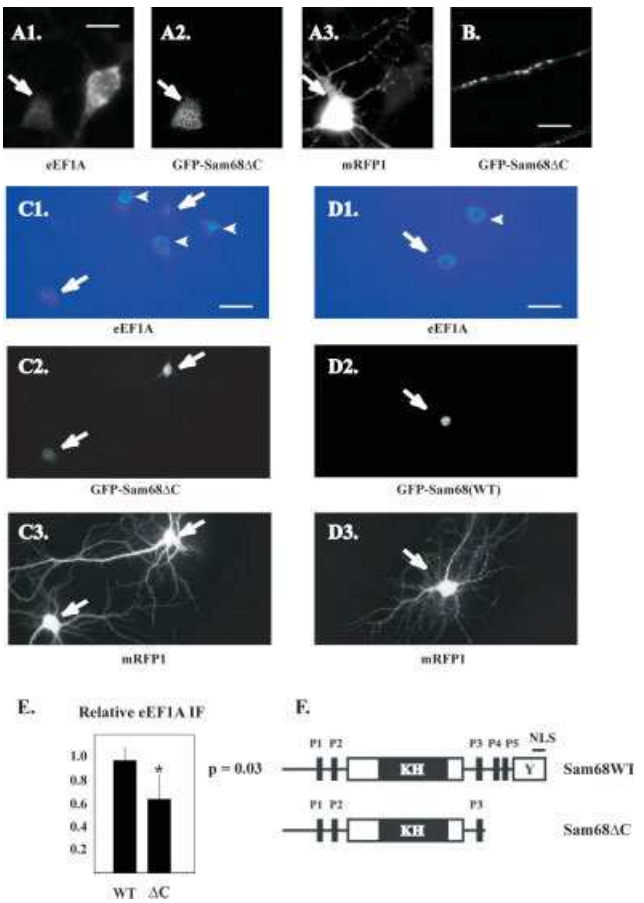


Fig. 4. Effect of dominant-negative Sam68 on eEF1A expression in cultured hippocampal neurons. **A–C:** The GFP-Sam68 (WT) and GFP-Sam68ΔC proteins were expressed in hippocampal neurons, together with monomeric red fluorescent protein (mRFP) as a morphological marker. Five days later (at 14 DIV), the neurons were fixed and stained by immunofluorescence with anti-eEF1A antibody; mRFP, GFP-Sam68, and endogenous eEF1A were simultaneously visualized by triple-color fluorescence microscopy. A1–A3: Closeup view of the three fluorescent markers in a GFP-Sam68ΔC-transfected neuron and a nearby, untransfected neuron (wide-field microscopy). A1: Note the lack of eEF1A immunostaining in the transfected cell (arrow), compared with the neighboring cell. B: Clustered distribution of the GFP-Sam68ΔC protein within the dendrite of a hippocampal neuron (single plane of a confocal z series). C1–C3: Representative field showing GFP-Sam68ΔC-transfected neurons and neighboring untransfected cells at low magnification. C1: Relative intensity of eEF1A immunofluorescence is represented by pseudocolor coding. Perinuclear staining is brighter in untransfected neurons (arrowheads) than in transfected (arrows). C3: Normal neuronal morphology of the transfected cells. **D1–D3:** Same as C1–C3 with GFP-Sam68WT transfected neuron. **E:** eEF1A immunofluorescence was measured (as mean gray level per pixel) in transfected neurons and in surrounding, nontransfected neurons of the same field. The ratio between the fluorescence of transfected neurons and the average fluorescence of surrounding nontransfected cells was then calculated for each transfected neuron. The histogram bars show the average (±SD) of these ratios for neurons transfected with GFP-Sam68ΔC and with GFP-Sam68WT. Neurons expressing GFP-Sam68ΔC had a ratio lower than 1, indicating a decrease in endogenous eEF1A. Neurons expressing GFP-Sam68WT had a ratio close to 1. The difference between GFP-Sam68ΔC and GFP-Sam68WT was significant ($P = 0.03$, two-sided Mann-Whitney U test; n = 3 experiments). **F:** Schematic depiction of the wild-type and C-terminally deleted, dominant-negative Sam68 proteins. The major protein domains are shown as boxes. KH: core RNA-binding module (hnRNP-K homology domain). P1–P5: proline-rich motifs. Y: tyrosine-rich region. NLS: nuclear localization signal. Scale bars = 13 μm in A; 4.7 μm in B; 65 μm in C. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

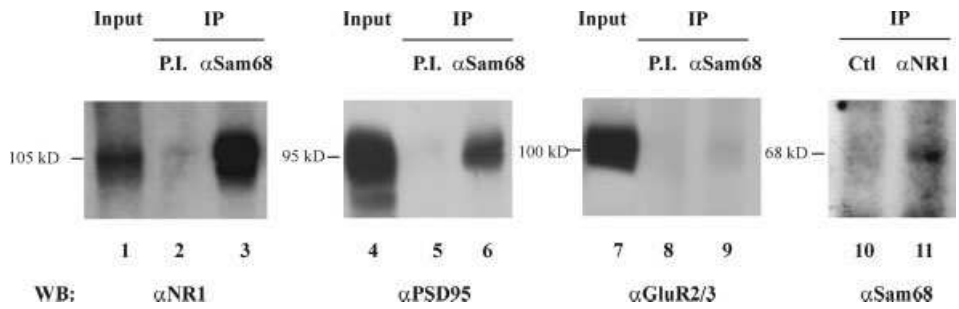


Fig. 5. Binding of Sam68 to the postsynaptic NMDA receptor complex. Purified synaptic membranes were solubilized under nondenaturing conditions and subjected to immunoprecipitation with the indicated antibodies. Lanes 1, 4, 7: aliquot (10%) of input lysate. After detecting PSD-95, the blot of lanes 4–6 was stripped and reprobed to detect GluR2/3 subunits of AMPA receptors, shown in lanes 7–9. Lane 10: control immunoprecipitation with a mouse monoclonal IgG, class-matched to the anti-NR1 antibody.

```
Hs        1453 AUAUUAUCCCUAAUACCUGCCACCCCACUCUUAAUCAGUGGUGGAAGAACGGUCUCAGAA
Rn        1464 AUAUUAUCCCUAACACCUGCCACCCCAGUCUUAAUCAGUGGUGGAAGAACGGUCUCAGAA
               ************* ************* ********************************

Hs             CUGUUUGUUUCAAUUGGCCAUUUAAGUUUAGUAGUAAAAGACUGGUUAAUGAUAACAAUG
Rn             CUGUUUGUCUCAAUUGGCCAUUUAAGUUUAAUAGUAAAAGACUGGUUAAUGAUAACAAUG
               ******** ********************** ******************************

Hs             CAUCGUAAAACCUUCAGAAGGAAAGGAGAAUGUUUUGUGGACCACUUUGGUUUUCUUUUU
Rn             CAUCGUAAAACCUUCAGAAGGAAA---GAAUGUUUUGUGGACCAUUUU---------UUU
               ************************   ***************** ***          ***

Hs             UGCGUGUGGCAGUUUUAAGUUAUUAGUUUUUAAAAUCAGUACUUUUUAAUGGAAACAACU
Rn             UGUGUGUGGCAGUUUUAAGUUAUUAGUUUUCAAAAUCAGUACUUUUUAAUGGAAACAACU
               ** ***************************** ******************************

Hs             UGACCAAAAAUUUGUCACAGAAUUUUGAGACCCAUUAAAAAAGUUAAAUGAGAAA
Rn             UGACCAAAA-UCUGUCACAGAAUUUUGAGACCAUUAAAACAAGUUU---------
               ********* * ********************  * *** *****
```

Fig. 6. The 3′UTR sequences of human EEF1A1 and rat Eef1a1 mRNAs aligned using Clustal W (v. 1.83). The first nucleotide of each sequence is that immediately following the stop codon, and the last nucleotide corresponds to the major polyadenylation site. Stars indicate identical residues. Using the Rnaalifold program of the Vienna RNA package (Ivo L Hofacker, http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/), the predicted folding of the aligned sequences displays a large stem structure with a U-rich terminal loop (overscored).

tion was apparently not detected in the previous studies. This may be due to the sensitivity of the microarray sampling procedure; alternatively, the interaction may be favored by neuron-specific factors. However, it was possible to reconstitute the Sam68-Eef1a1 mRNA interaction in transfected HEK cells by using overexpressed, myc-tagged Sam68. The interaction is phylogenetically conserved, insofar as HEK 293 cells are of human origin; this is consistent with the >90% identity of human and rat Eef1a1 nucleotide sequences, including in the 3′ untranslated region (UTR). Interestingly, based on free energy minimization, the entire 3′UTR of the Eef1a1 mRNA is predicted to fold into a single, long hairpin displaying at its extremity a U-rich terminal loop (Fig. 6). This is reminiscent of the U6 motif-containing stem-loop structure that mediates recognition of the β-actin mRNA by Sam68 in vitro (Itoh et al., 2002). However, our experiments do not rule out the possibility that the Sam68-Eef1a1 mRNA association may be mediated by a third molecule. Further studies will be required to establish whether the 3′UTR structure forms a direct binding site for Sam68 on the Eef1a1 mRNA.

In dissociated cortical neurons, chemically induced depolarization is known to generate bursts of action potentials and to recruit some of the pathways that underlie synaptic plasticity. While causing the translational repression of multiple mRNA species, depolarization activates the translation of a select group of transcripts (Krichevsky and Kosik, 2001). Our data indicate that Eef1a1 belongs to this group. Eef1a1 encodes the ubiquitous isoform of translation elongation factor eEF1A, which transports amino-acyl-tRNA to the A site of the ribosome during protein synthesis. In addition, eEF1A also anchors mRNAs to the actin cytoskeleton and can bundle actin filaments according to a unique spatial arrangement (Liu et al., 2002a). Local provision

of eEF1A may play a role in both biosynthetic and structural aspects of synaptic plasticity and perhaps establish a link between these two facets of long-term synaptic change. In *Aplysia*, synthesis of the eEF1A homologue is instrumental to maintenance of synapse-specific long-term facilitation (Giustetto et al., 2003). In the rodent hippocampus, translation of the Eef1a1 mRNA is regulated by synaptic signals in complex ways, which appear to differ between preparations. In hippocampal slices from young rats, Eef1a1 translation has been shown to be rapidly induced during tetanus-induced long-term potentiation (LTP) of CA3–CA1 synapses, subject to activation of the rapamycin-sensitive mTOR/S6 kinase pathway (Tsokas et al., 2005). This finding is consistent with the fact that the Eef1a1 mRNA contains a 5′ oligopyrimidine tract, which is a signature for mTOR-inducible mRNAs. Interestingly, in adult rat hippocampus in vivo, LTP of dentate granule synapses induced redistribution rather than neosynthesis of eEF1A protein. In contrast, long-term depression elicited by pharmacological stimulation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) was accompanied by a large increase in eEF1A protein, without change in Eef1a1 mRNA level (Huang et al., 2005). Thus, the induction of eEF1A synthesis seems to be exquisitely sensitive to the spatiotemporal and cell-specific details of synaptic signalling, suggesting that multiple effectors regulate the translation of Eef1a1 in neurons. One of these effectors may be the RNA-binding protein FMRP; in vitro and in cell lines, FMRP has been reported to bind and repress the Eef1a1 mRNA (Sung et al., 2003), and it is tempting to speculate that removal of this putative inhibition underlies the effect of mGluRs on Eef1a1 translation (Bear et al., 2004). The present data suggest that Sam68 is also part of the regulatory machinery that controls neuronal Eef1a1 translation, with an action distinct from that of FMRP. Becasue depolarization increased the recruitment of Sam68 to polysomal mRNAs, it is likely that Eef1a1 transcripts bound to Sam68 were engaged in translation. The finding that the dominant-negative GFP-Sam68ΔC, but not GFP-Sam68(WT), inhibited eEF1A protein accumulation suggests that endogenous Sam68 may be required for the translational activation of Eef1a1 mRNA. Because the dominant-negative effect of GFP-Sam68ΔC was already detected in unstimulated neurons, the low amount of Sam68 existing in the cytoplasm prior to depolarization may contribute to generating the proportion of actively translated Eef1a1 mRNA seen under basal conditions. In line with this possibility, Sam68 has been reported to interact with RNA helicase A and with the mRNA export factor Tap (Reddy et al., 2000), two proteins known to promote translation of specific viral and cellular mRNAs (Hartman et al., 2006; Li et al., 2006). Kinases recruited by the C terminus of Sam68 might also be required to phosphorylate and release mRNA-bound translation inhibitory factors, similar to the case of hnRNP-K phosphoylation by Src (Ostareck-Lederer et al., 2002). GFP-Sam68ΔC, which is defective for certain protein–protein interactions, may displace the endogenous Sam68 and associated translation factors out of the target mRNA; indeed, in the case of viral mRNAs, GFP-Sam68ΔC functionally antagonizes RNA helicase A and Tap (Reddy et al., 2000). Upon depolarization, the largely enhanced export of Sam68 to the cytoplasm may cooperate with the action of signalling cascades such as the mTOR pathway for translational stimulation of activity-responsive mRNAs exemplified by Eef1a1. A similar scheme may apply to certain nonneuronal systems; in the case of meiotic male gametes, Paronetto et al. (2006) recently confirmed the occurrence of signal-induced transfer of Sam68 to the cytoplasm and its binding to polysomes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michel Volovitch and Alain Prochiantz for their kind cooperation in the use of microarray analysis; Stéphane Richard and Roger Y. Tsien for the generous gift of the GFP-Sam68ΔC and mRFP1 plasmids, respectively; Isabelle Barlat and Bruno Toqué for the kind gift of myc-Sam68 plasmid; and Michael Kiebler for discussions and reagents.

REFERENCES

Bagni C, Greenough WT. 2005. From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. Nat Rev Neurosci 6:376–387.

Banker G, Asmussen H, Goslin K. 1998. Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: Banker G, Goslin K, editors. Cambridge, MA: MIT Press. 666 p.

Bear MF, Huber KM, Warren ST. 2004. The mGluR theory of fragile X mental retardation. Trends Neurosci 27:370–377.

Ben Fredj N, Grange J, Sadoul R, Richard S, Goldberg Y, Boyer V. 2004. Depolarization-induced translocation of the RNA-binding protein Sam68 to the dendrites of hippocampal neurons. J Cell Sci 117:1079–1090.

Berto G, Camera P, Fusco C, Imarisio S, Ambrogio C, Chiarle R, Silengo L, Di Cunto F. 2007. The Down syndrome critical region protein TTC3 inhibits neuronal differentiation via RhoA and Citron kinase. J Cell Sci 120:1859–1867.

Bramham CR, Wells DG. 2007. Dendritic mRNA: transport, translation and function. Nat Rev Neurosci 8:776–789.

Eom T, Antar L, Singer R, Bassell GJ. 2003. Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. J Neurosci 3:10433–10444.

Gelder R, von Zastrow M, Yool A, Dement W, Barchas J, Eberwine J. 1990. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A 87:1663–1667.

Giustetto M, Hegde AN, Si K, Casadio A, Inokuchi K, Pei W, Kandel ER, Schwartz JH. 2003. Axonal transport of eukaryotic translation elongation factor 1a mRNA couples transcription in the nucleus to long-term facilitation at the synapse. Proc Natl Acad Sci U S A 100:13680–13685.

Glanzer J, Miyashiro KY, Sul J-Y, Barrett L, Belt B, Haydon P, Eberwine J. 2005. RNA splicing capability of live neuronal dendrites. Proc Natl Acad Sci U S A 102:16859–16864.

Goetze B, Grunewald B, Baldassa S, Kiebler M. 2004. Chemically controlled formation of a DNA/calcium phosphate coprecipitate: application for transfection of mature hippocampal neurons. J Neurobiol 60: 517–525.

Gong B, Cao Z, Zheng P, Vitolo OV, Liu S, Staniszewski A, Moolman D, Zhang H, Shelanski M, Arancio O. 2006. Ubiquitin hydrolase Uch-L1 rescues beta-amyloid-induced decreases in synaptic function and contextual memory. Cell 126:775–788.

Grange J, Boyer V, Fabian-Fine R, Fredj NB, Sadoul R, Goldberg Y. 2004. Somatodendritic localization and mRNA association of the splicing regulatory protein Sam68 in the hippocampus and cortex. J Neurosci Res 75:654–666.

Hartman TR, Qian S, Bolinger C, Fernandez S, Schoenberg DR, Boris-Lawrie K. 2006. RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. Nat Struct Mol Biol 13:509–516.

He W, Lu Y, Qahwash I, Hu XY, Chang A, Yan R. 2004. Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation. Nat Med 10:959–965.

Hu XD, Huang Q, Roadcap DW, Shenolikar SS, Xia H. 2006. Actin-associated neurabin-protein phosphatase-1 complex regulates hippocampal plasticity. J Neurochem 98:1841–1851.

Huang F, Chotiner JK, Steward O. 2005. The mRNA for elongation factor 1α is localized in dendrites and translated in response to treatments that induce long-term depression. J Neurosci 25:7199–7209.

Huang Y-S, Jung M-Y, Sarkissian M, Richter JD. 2002. N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and αCaMKII mRNA polyadenylation at synapses. EMBO J 21:2139–2148.

Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dictenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH. 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. Nature 438:512–515.

Itoh M, Haga I, Li Q-H, Fujisawa J-i. 2002. Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. Nucl Acids Res 30: 5452–5464.

Khandjian EW, Huot M-E, Tremblay S, Davidovic L, Mazroui R, Bardoni B. 2004. Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. Proc Natl Acad Sci U S A 101:13357–13362.

Kiebler MA, Bassell GJ. 2006. Neuronal RNA granules: movers and makers. Neuron 51:685–690.

Krichevsky AM, Kosik KS. 2001. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. Neuron 32:683–696.

Kunz JB, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE, Gehring NH. 2006. Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. RNA 12:1015–1022.

Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ. 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon–exon junctions. EMBO J 19:6860–6869.

Li Y, Bor Y-c, Misawa Y, Xue Y, Rekosh D, Hammarskjold M-L. 2006. An intron with a constitutive transport element is retained in a Tap messenger RNA. Nature 443:234–237.

Liu G, Grant WM, Persky D, Latham VM Jr, Singer RH, Condeelis J. 2002a. Interactions of elongation factor 1alpha with F-actin and beta-actin mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions. Mol Biol Cell 13:579–592.

Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr. 2002b. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. Cell 111: 209–218.

Lopez de Silanes I, Zhan M, Lal A, Yang X, Gorospe M. 2004. Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. Proc Natl Acad Sci U S A 101:2987–2992.

Lukong KE, Richard S. 2003. Sam68, the KH domain-containing superSTAR. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 1653:73–86.

Massat I, Souery D, Del-Favero J, Oruc L, Noethen MM, Blackwood D, Thomson M, Muir W, Papadimitriou GN, Dikeos DG, Kaneva R, Serretti A, Lilli R, Smeraldi E, Jakovljevic M, Folnegovic V, Rietschel M, Milanova V, Valente F, Van Broeckhoven C, Mendlewicz J. 2002. Excess of allele1 for alpha3 subunit GABA receptor gene (GABRA3) in bipolar patients: a multicentric association study. Mol Psychiatry 7:201–207.

Matsuda J, Kido M, Tadano-Aritomi K, Ishizuka I, Tominaga K, Toida K, Takeda E, Suzuki K, Kuroda Y. 2004. Mutation in saposin D domain of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in mouse. Hum Mol Genet 13: 2709–2723.

Matter N, Herrlich P, Konig H. 2002. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. Nature 420:691–695.

Mayne M, Cheadle C, Soldan SS, Cermelli C, Yamano Y, Akhyani N, Nagel JE, Taub DD, Becker KG, Jacobson S. 2001. Gene expression profile of herpesvirus-infected T cells obtained using immunomicroarrays: induction of proinflammatory mechanisms. J Virol 75:11641–11650.

McLaren M, Asai K, Cochrane A. 2004. A novel function for Sam68: Enhancement of HIV-1 RNA 3' end processing. RNA 10:1119–1129.

Modem S, Badri KR, Holland TC, Reddy TR. 2005. Sam68 is absolutely required for Rev function and HIV-1 production. Nucleic Acids Res 33:873–879.

Munton RP, Tweedie-Cullen R, Livingstone-Zatchej M, Weinandy F, Waidelich M, Longo D, Gehrig P, Potthast F, Rutishauser D, Gerrits B, Panse C, Schlapbach R, Mansuy IM. 2007. Qualitative and quantitative analyses of protein phosphorylation in naive and stimulated mouse synaptosomal preparations. Mol Cell Proteomics 6:283–293.

Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, Neubauer G, Bomsztyk K, Superti-Furga G, Hentze MW. 2002. c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. Mol Cell Biol 22:4535–4543.

Pacheco CD, Kunkel R, Lieberman AP. 2007. Autophagy in Niemann-Pick C disease is dependent upon Beclin-1 and responsive to lipid trafficking defects. Hum Mol Genet 16:1495–1503.

Paronetto MP, Zalfa F, Botti F, Geremia R, Bagni C, Sette C. 2006. The nuclear RNA-binding protein Sam68 translocates to the cytoplasm and associates with the polysomes in mouse spermatocytes. Mol Biol Cell 17:14–24.

Paronetto MP, Achsel T, Massiello A, Chalfant CE, Sette C. 2007. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. J Cell Biol 176:929–939.

Petroulakis E, Wang E. 2002. Nerve growth factor specifically stimulates translation of eukaryotic elongation factor 1A-1 (eEF1A-1) mRNA by recruitment to polyribosomes in PC12 cells. J Biol Chem 277:18718–18727.

Reddy TR, Xu W, Mau JK, Goodwin CD, Suhasini M, Tang H, Frimpong K, Rose DW, Wong-Staal F. 1999. Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. Nat Med 5:635–642.

Reddy TR, Tang H, Xu W, Wong-Staal F. 2000. Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of human immunodeficiency virus and type D retroviral mRNA. Oncogene 19:3570–3575.

Sakurai M, Sekiguchi M, Zushida K, Yamada K, Nagamine S, Kabuta T, Wada K. 2008. Reduction in memory in passive avoidance learning, exploratory behaviour and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. Eur J Neurosci 27:691–701.

Sanford JR, Gray NK, Beckmann K, Caceres JF. 2004. A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. Genes Dev 18:755–768.

Simsek-Duran F, Linden DJ, Lonart G. 2004. Adapter protein 14–3-3 is required for a presynaptic form of LTP in the cerebellum. Nat Neurosci 7:1296–1298.

Smalla KH, Matthies H, Langnase K, Shabir S, Bockers TM, Wyneken U, Staak S, Krug M, Beesley PW, Gundelfinger ED. 2000. The synaptic glycoprotein neuroplastin is involved in long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. Proc Natl Acad Sci U S A 97:4327–4332.

Soros VB, Carvajal HV, Richard S, Cochrane AW. 2001. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 rev of Sam68 through sequestration of unspliced RNA at perinuclear bundles. J Virol 75:8203–8215.

Sung YJ, Dolzhanskaya N, Nolin SL, Brown T, Currie JR, Denman RB. 2003. The fragile X mental retardation protein FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation in vivo. J Biol Chem 278:15669–15678.

Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH, III, Becker KG, Ko MSH. 2000. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. Proc Natl Acad Sci U S A 97:9127–9132.

Tenenbaum SA, Carson CC, Lager PJ, Keene JD. 2000. Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. Proc Natl Acad Sci U S A 97:14085–14090.

Thomas GM, Huganir RL. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci 5:173–183.

Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello MJ, Cardoso C, Leventer R, Ward HL, Ayala R, Tsai L-H, Dobyns W, Ledbetter D, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A. 2003. 14–3-3[Epsi] is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. Nat Genet 34:274–285.

Tremblay GA, Richard S. 2006. mRNAs associated with the Sam68 RNA binding protein. RNA Biol 3:1–4.

Tsokas P, Grace EA, Chan P, Ma T, Sealfon SC, Iyengar R, Landau EM, Blitzer RD. 2005. Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. J Neurosci 25:5833–5843.

Wickham L, Benjannet S, Marcinkiewicz E, Chretien M, Seidah NG. 2005. Beta-amyloid protein converting enzyme 1 and brain-specific type II membrane protein BRI3: binding partners processed by furin. J Neurochem 92:93–102.

Wiegand HL, Lu S, Cullen BR. 2003. Exon junction complexes mediate the enhancing effect of splicing on mRNA expression. Proc Natl Acad Sci U S A 100:11327–11332.

Xia Z, Storm DR. 2005. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci 6:267–276.

2. Article 2 : Delocalization of the multifunctional RNA splicing factor TLS/FUS in hippocampal neurons : exclusion from the nucleus and accumulation in dendritic granules and spine heads.

Neuroscience Letters. 2005 Mai 13;379(3):152-7.

Agnès Belly, Françoise Moreau-Gachelin, Rémy Sadoul, Yves Goldberg.

Contexte de l'étude

La protéine TLS (Translocated in Liposarcoma, ou FUS, Fused in Liposarcoma) a tout d'abord été identifiée chez des patients atteint de liposarcome (cancer du tissus adipeux), dans lequel le gène de la protéine TLS/FUS est fusionné au gène du facteur de transcription CHOP (Rabbitts et al., 1993). Dans cette fusion, le domaine de TLS liant les ARN est remplacé par un domaine de CHOP liant les ADN et un domaine riche en leucine ; suggérant que la protéine fusion interrompt la transcription (Crozat et al., 1993).

TLS est une protéine ubiquitaire, de 526 acides aminés, portée par le chromosome 16. Elle possède un domaine N-terminal riche en glutamine, glycine, sérine et tyrosine (domaine QGSY), suivi d'un domaine riche en glycine, d'une séquence prédite d'export nucléaire (NES, predict Nuclear Export Signal), d'un domaine de liaison aux ARN (RRM, RNA Recognition Motif), de deux domaines riches en arginine et en glycine (domaine RGG) et enfin d'un domaine en doigt de zinc (Zn finger) permettant la liaison spécifique à des séquences d'ARN riches en GGUG (Figure A.).

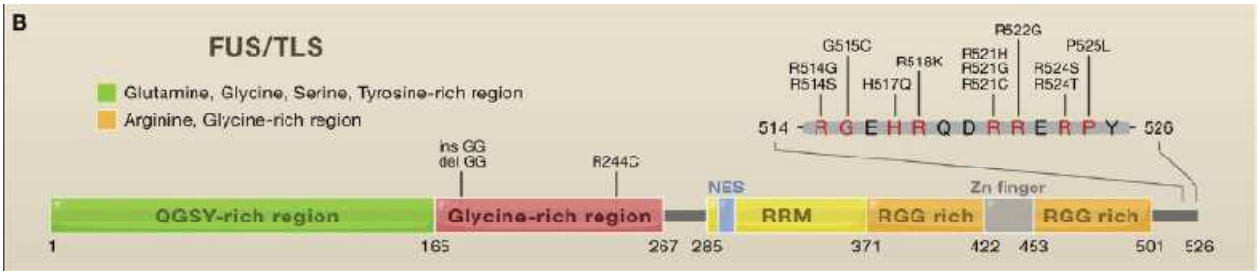


Figure A : Structure de TLS et mutations impliquées dans des ALS. FUS: Fused in Liposarcoma, TLS: Translocated in Liposarcoma, NES: predict Nuclear Export Signal, RRM: RNA Recognition Motif, Zn: zinc. D'après (Lagier-Tourenne and Cleveland, 2009).

Dans des cellules en culture, TLS est majoritairement nucléaire, mais est aussi cytoplasmique ; dans ces deux cas, elle peut lier les ARN. TLS « fait la navette » entre le noyau et le cytoplasme (Zinszner et al., 1997) ; TLS fonctionne comme les protéines chaperons des ARN, les hnRNP (heterogenous nuclear RiboNucleoProtein). Dans le noyau, elle est impliquée dans diverses fonctions incluant la transcription (Uranishi et al., 2001), la maturation des pré-ARNm (Yang et al., 1998), et la réparation de l'ADN (Baechtold et al., 1999; Bertrand et al., 1999; Hicks et al., 2000; Kuroda et al., 2000).
En 2000, TLS a été identifié en association au complexe du récepteur NMDA lors de l'analyse protéomique de ce complexe (Husi et al., 2000). TLS est, dans ce panel de protéines, la seule pouvant lier les ARN, suggérant sa participation dans l'amarrage et/ou la régulation des ARNm au niveau des épines dendritiques. Cependant, cette protéine d'ordinaire nucléaire n'avait jamais été identifiée dans les dendrites ou les épines dendritiques ni dans les clusters de récepteurs NMDA. Nous avons donc exploré cette question.

Résultats

Nous avons défini la localisation subcellulaire de TLS en biochimie et en immunofluorescence. Des centrifugations successives nous ont permis de fractionner des tissus d'hippocampe d'un jeune rat, en fractions nucléaires, membranaires et cytosoliques (Figure 1.A). L'abondance relative de TLS est déterminée par immunodétection sur membrane (Western blot) à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de TLS. Contrairement aux cellules proliférantes, l'absence de signal dans la fraction P1 indique que TLS est absente des noyaux dans l'hippocampe (Figure 1.B. panneau du haut, piste 1). En revanche, la présence de TLS dans la fraction S3 indique que TLS est majoritairement cytosolique (Figure 1.B. piste 6). L'intégrité des différentes fractions a été contrôlée en re-sondant le Western blot avec un anticorps anti-Sam68. En accord avec les résultats de Julien Grange, Sam68 est plus abondante dans la fraction nucléaire (Figure 2. B. panneau du bas, piste 2). Par ailleurs, il est possible de détecter TLS dans la fraction P3 (Figure 1.B.), indiquant que TLS est partiellement associée à la fraction polysomiale. De plus, il est possible de détecter TLS dans la fraction P3 polysomiale avec deux anticorps anti-TLS, l'un dirigé contre la protéine entière (Figure 1.C piste 1) et l'autre contre la partie C-terminale de TLS (Figure 1.C piste 2).

Afin de définir plus précisément la localisation de TLS, nous avons réalisé des détections par immunofluorescence.

La spécificité des anticorps anti-TLS a tout d'abord été testé en immunofluorescence sur un lignée cellulaire (HEK293) transfectées avec une forme étiquetée de TLS, myc-TLS. La protéine étiquetée est détectée doublement, avec un anticorps anti-myc et un anticorps anti-TLS. La protéine myc-TLS se distribue de la même manière que la protéine endogène, dans le noyau (Figure 2.A. et B.).

Dans une coupe coronale d'hippocampe de rat adulte, analysée en microscopie confocale, TLS est largement exclu des noyaux des cellules granulaires du gyrus denté (Figure 2.C. et F.) et des cellules pyramidales de la corne d'Amon 1 (Figure 2. I.), mais marque les dendrites du stratum moleculare et des neurones pyramidaux (Figure 2.C. et I), où elle présente une composante diffuse et une composante somatodendritique granulaire (Figure 2.C. F. et I. flèches). Ces données confirment la distribution biochimique précédente. La spécificité de l'anti-TLS a aussi été testé sur ces coupes d'hippocampe. Les coupes ont été marquées avec l'anticorps anti-TLS préincubé avec la protéine recombinante GST-TLS (Figure 2.P.) ou bien avec la GST seule (Figure 2.O.). Seul l'anticorps incubé avec la GST seule donne un signal, indiquant que l'anti-TLS marque spécifiquement la protéine TLS.

La protéine Sam68 est quant à elle majoritairement nucléaire et périnucléaire (Figure 2.D. G. et J.). Les granules de TLS colocalisent avec la protéine Sam68 (Figure 2.H. K. flèches) et la sous unité NR1 du récepteur NMDA (Figure 2.N. flèches). La protéine Sam68 étant associé aux ARN, ces données suggèrent que les granules de TLS correspondent à des granules d'ARN et sont localisés près de synapses glutamatergiques.

Afin de déterminer la localisation intra-dendritique de TLS, nous avons utilisé des neurones d'hippocampe de rat en culture, matures (4 semaines de vie en culture). La superposition des trois marquages TLS, MAP2, et F-actine confirme la localisation dendritique de TLS (Figure 3.D.). TLS est présente dans les dendrites sous forme diffuse et punctiforme (Figure 3.E.) ; mais est aussi présente en extra-dendritique, au sommet des épines dendritiques (Figure 3. E. F. flèches, H.). Cette localisation a été confirmée par l'expression de la forme étiquetée de TLS. Myc-TLS est absente des noyaux (Figure 3.I. J. et K), mais colocalise avec l'actine filamenteuse (Figure 3.L. M. et N.). Dans les neurones, la protéine étiquetée se localise aussi comme la protéine endogène (Figure 3.O. P. et Q.).

Cette étude indique que TLS est présente dans les dendrites des neurones *in vivo* et en culture, près des synapses suggérant un rôle dans l'amarrage des ARNm au niveau des synapses activées.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Neuroscience Letters 379 (2005) 152–157
Neuroscience Letters
www.elsevier.com/locate/neulet

Delocalization of the multifunctional RNA splicing factor TLS/FUS in hippocampal neurones: exclusion from the nucleus and accumulation in dendritic granules and spine heads

Agnès Belly[a], Françoise Moreau-Gachelin[b], Rémy Sadoul[a], Yves Goldberg[a,c,*]

[a] *Laboratoire Neurodégénérescence et Plasticité, Université Joseph Fourier and INSERM EMI 0108, Pavillon de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire, F-38043 Grenoble cedex 9, France*
[b] *Laboratoire de Transduction du Signal et Oncogenèse, Institut Curie and Inserm U528, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France*
[c] *Département de Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA Grenoble, F-38054 Grenoble cedex 9, France*

Received 22 October 2004; received in revised form 8 December 2004; accepted 22 December 2004

Abstract

Long-term synaptic change in the cortex and the hippocampus is believed to require the highly localized delivery and translation of mRNAs in the dendritic shafts and spines. The molecular interactions that underlie local signalling between synapses and mRNAs are still largely undefined. After purification from total brain extracts, the NMDA receptor is known to be associated with numerous proteins, including the multifunctional RNA-binding factor TLS (also called FUS). In non-neural tissue, TLS is a vital nuclear protein with roles in DNA repair, homologous recombination, transcriptional regulation and pre-mRNA processing. We have examined the distribution of TLS in hippocampal neurones, both in the adult brain and in mature primary cultures, using subcellular fractionation and immunofluorescence techniques. TLS immunoreactivity is largely excluded from the neuronal nucleus and is found in the cytosol and in somatodendritic particles. In some of these particles, TLS colocalizes with Sam68, a nuclear RNA-binding protein that we previously showed is incorporated into dendritic RNA granules. Some of the TLS clusters also colocalize with NMDA receptor clusters. Finally, TLS clusters are occasionally seen within spine heads. The apparent removal of TLS from the nucleus might result in specific patterns of mRNA transcription or splicing in hippocampal neurones. TLS may also contribute to steering, anchoring or regulating mRNAs at synaptic sites.
© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Dendritic mRNAs; Neuronal mRNA traffic; RNA-binding protein; Neurone-specific splicing

The development and plasticity of synapses depend in part on protein synthesis taking place in the dendrites [16]. Polyribosomes are often docked at the basis of dendritic spines, and transferred into spine heads following long-term potentiation. It is largely unknown how such a synapse-specific regulation of mRNAs is achieved.

In cultured neurones, dendritic mRNAs such as *CaMKIIα* and *Arc* are packaged in clusters, termed "RNA granules", that move along the dendrites and sometimes locate close to synapses [15]. A growing number of RNA-binding proteins have been found to colocalize with RNA granules in situ, or to copurify with biochemically isolated granule preparations. A few of these proteins, including ZBP1 and FMRP, were shown to enter (and exit) spine heads [1]. Some of the granule proteins have also been identified in highly purified postsynaptic density preparations, consistent with synaptic localization of ribonucleoproteic complexes [13]. The molecular interactions responsible for retaining such complexes in the spine are undefined; they may involve anchoring of RNA-associated proteins to postsynaptic density proteins.

A few years ago, in a large-scale analysis of proteins that copurified with NMDA receptor from mouse brain extracts, the RNA-binding protein TLS (also called FUS) was found to exist in the receptor complex [9]. TLS (translocated in liposarcoma) has so far been known for its manifold func-

* Corresponding author. Tel.: +33 476 7688 81; fax: +33 476 7658 22.
E-mail address: yves.goldberg@ujf-grenoble.fr (Y. Goldberg).

0304-3940/$ – see front matter © 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neulet.2004.12.071

tions in nuclear processes, including DNA transcription, pre-mRNA processing, homologous recombination, and DNA repair. The biological importance of the protein is underscored by the rapid postnatal death of TLS-deficient mice [8] and by the primary role of TLS or TLS-derived gene fusions in the evolution of specific tumours [14]. TLS interacts with general and promoter-specific transcription factors and with elements of the splicing machinery [6,10]. In proliferating cells, a minor fraction of TLS molecules are associated with cytoplasmic mRNAs [17].

The identification of TLS as a (direct or indirect) partner of the NMDA receptor raises the possibility that this protein might participate in the docking and/or regulation of mRNAs at excitatory synaptic sites. However, it has not yet been established whether the ordinarily nuclear TLS can be detectably localized at synaptic or dendritic sites, and whether the protein colocalizes with NMDA receptor clusters in defined regions of the brain. This question is addressed here.

The anti-TLS rabbit antiserum has been described [6]; the IgG (raised against residues 1–165) was affinity-purified [7]. The anti-C-TLS antiserum recognised residues 392–526 [6]. Monoclonal antibodies against Sam68 were used as in [5]. The anti-myc antibody (clone 9E10) was obtained from Santa Cruz, Inc. Monoclonal and polyclonal antibodies raised against MAP2 were purchased from Sigma. The myc-TLS plasmid (pCS3-mt-TLS) [6] allows expression of full-length TLS fused with a hexamer of the myc epitope at the N terminus.

All procedures using animals complied with European Community Council Directive 86/609. Hippocampal tissue was homogeneized as in [5] except that buffer A included 1 mM $MgCl_2$. The homogenate was filtered through a 100 μm-mesh nylon filter (Millipore) and fractionated as described by Feng et al. [4]. Equal protein amounts of the fractions were analyzed by immunoblotting (200 ng primary antibody/ml) and chemiluminescence (Super-Signal Pico, Pierce).

Vibratome sections (30 μm thick) of PFA-fixed adult rat hippocampus were stained as previously described [5] with 2 μg/ml primary antibodies. Staining was revealed with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG and Alexa 594-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes).

Hippocampal neuronal cultures were prepared from E19 rat embryos [2] and plated at a density of $0.5–1 \times 10^4$ per cm^2 on glass coverslips coated with poly-L-lysine, in Neurobasal medium containing B27 supplement (Invitrogen). Neurones were transfected (after 2 weeks) with 0.75 μg of pCS3-mt-TLS plasmid per coverslip, using Lipofectamine 2000 reagent (Life technologies). After 3–4 weeks, neurones were fixed in 4% PFA-sucrose; permeabilized with 0.1% Triton X-100; and stained with 2 μg/ml primary antibodies as described [2]. Alexa 350-conjugated anti-mouse IgG was used for triple labelling.

Images were acquired with a Zeiss LSM 510 laser scanning confocal microscope or with a Zeiss Axiovert 200 microscope, using a 100× (1.4 NA) objective and a CCD camera (Roper Scientific). Image files were processed with Metamorph (Universal Imaging) and Photoshop (Adobe) to subtract background fluorescence and to enhance contrast.

HEK-293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen). The cells were transfected in 6-cm dishes with 5 μg myc-TLS plasmid using Fugene reagent (Roche Molecular). Forty-eight hours later cells were fixed and stained as for neurones.

Adult hippocampal tissue was fractionated into nuclear, membrane and cytosolic fractions, and the relative abundance of the TLS protein was determined by Western immunoblotting of the various fractions, using a well-characterized anti-TLS antibody [6] raised against the N-terminal region of the protein. Unlike the case in proliferating cell types, TLS was nearly absent from the nuclei (Fig. 1B, upper panel, lane 2). The 75 kDa band expected for TLS (arrow) was enriched in the soluble fraction (lane 6). Some of the 75 kDa protein could also be recovered together with microsomal membranes and polysomes in the P3 pellet (lane 5).

As a control for the integrity of the various fractions, the blot was reprobed with an antibody raised against Sam68, an RNA-binding protein of a different type. Consistent with known results [5], Sam68 was most abundant in the nuclear fraction (lower panel). Thus, the absence of nuclear TLS did not arise from mere breakdown of the nuclei. This result suggests that in hippocampal tissue, most of the TLS protein resides in the cytoplasmic compartment, with a minor but definite fraction associated with the polysomal fraction.

To confirm the identity of the 75 kDa TLS band and its presence in the P3 fraction, identical samples of hippocampal P3 pellet were analyzed in parallel lanes of an SDS gel, transferred onto PVDF, and separately probed with either anti-TLS IgG (Fig. 1C, lane 1), or a different antibody raised against the C-terminal moiety of TLS (anti-C-TLS; lane 2). The anti-C-TLS antibody detected a 75 kDa band which exactly comigrated with that detected by the previously used anti-TLS antibody (arrow).

In addition, an immunoreactive band of 100 kDa was reproducibly detected, and enriched in the P2 and P3 fractions (arrowhead). This band did not react with the anti-C-TLS antibody. The identity of this band is not known at present.

To define the subcellular localization of the TLS protein in more detail, immunofluorescent detection was performed. The specificity of our anti-TLS antibody in immunofluorescence assays was first verified in cultured HEK293 cells that had been transfected with a myc-TLS construct. The myc-tagged protein was detected by dual staining with anti-myc monoclonal antibody and anti-TLS antibody. In cells expressing the construct, the anti-TLS antibody generated intense nuclear staining that exactly overlapped with the distribution of the myc-tagged protein (Fig. 2A and B). In addition, in cells that had failed to take up the myc-TLS plasmid, the anti-TLS antibody revealed an identical but much fainter pattern of nuclear staining, corresponding to the usual distribution of the endogenous TLS protein in proliferating cells (Fig. 2B, arrow). Thus, the anti-TLS antibody used in this study is ca-

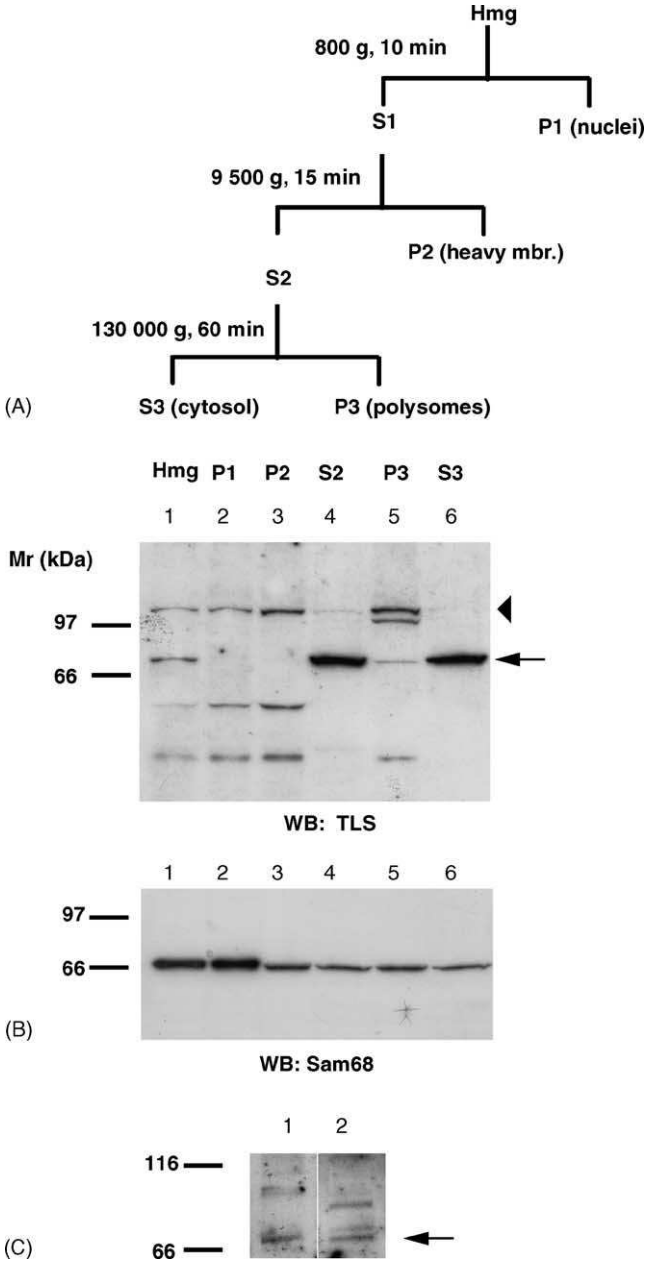


Fig. 1. TLS is a predominantly cytoplasmic protein in hippocampal tissue. (A) Fractionation scheme (see [4]). Total hippocampal homogenate (Hmg) was fractionated by successive centrifugation steps to yield the indicated pellets (P) and supernatants (S). Major components of each subcellular fraction are indicated. Note that the heavy membranes (P2) include intact synaptoneurosomes and mitochondria; the polysomal pellet also contains light (internal) membranes. (B) Equal protein amounts (30 μg) of each subcellular fraction were loaded onto an SDS gel and analyzed by immunoblotting with affinity-purified antibody against the TLS N terminus (top) or Sam68 (bottom). Arrow: TLS protein. Arrowhead: 100 kDa protein of unknown identity. (C) Equal amounts (30 μg) of a P3 pellet were loaded onto parallel lanes of an SDS gel, and analyzed by immunoblotting with the same anti-TLS antibody as above (lane 1) or with an antibody raised against the TLS C terminus (lane 2). Arrow: TLS protein.

pable of specifically staining the bona fide TLS protein. No staining was obtained with preimmune IgG (not shown).

The distribution of TLS staining in sections of adult hippocampus was then examined by confocal microscopy and compared to that of two reference proteins, i.e. the predominantly nuclear RNA-binding protein Sam68, and the NR1 subunit of the NMDA receptor. TLS staining was detected in the cell bodies and throughout the dendritic layers (stratum moleculare, stratum radiatum), but was largely excluded from the neuronal nuclei (Fig. 2C). In contrast, the pattern of Sam68 staining was predominantly nuclear and perinuclear, with a low level of dendritic fluorescence, in agreement with our previous results (Fig. 2D). Higher magnification views indicated that the TLS immunofluorescence displayed both a granular component and a diffuse component. This pattern agrees well with the distribution found by biochemical analysis. Individual TLS clusters could be visualized in the perinuclear region of dentate granule neurones (Fig. 2F) and in the perikaryon and dendritic trunk of CA1 pyramidal neurones (Fig. 2I). Despite the overall clearly distinct distribution of the two proteins, some of the TLS clusters overlapped with somatodendritic Sam68 granules (arrows in Figs. 2F–H, I–K). Because Sam68 granules have been shown to associate with RNA [3], this suggests that these TLS/Sam68 clusters correspond to RNA granules. Dual immunolabelling also indicated that some of the TLS clusters colocalized with NR1 clusters (Fig. 2L–N, arrows), suggesting that TLS may be located close to glutamatergic synapses.

To examine more closely the intra-dendritic localization of TLS, we used mature (4-week-old) cultures of hippocampal neurones. The dendritic accumulation of TLS was confirmed in triply stained neurones such as that of Fig. 3A–D, in which TLS was labelled together with MAP2 (as a marker for dendritic trunks) and phalloidin (to highlight the F-actin-rich dendritic spines). Higher magnification view of the dendrites again showed that TLS condensed in granules in the midst of diffuse staining (Fig. 3E). Of note, TLS granules were repeatedly found at the tip of dendritic spines (arrows in Fig. 3E and F), clearly outside of the dendritic trunk. These results were again confirmed by confocal microscopy. TLS was largely absent from the nucleus (Fig. 3, I–K). Instead, TLS clusters were found in the cell body and along the entire length of the dendrites (Fig. 3, L–N). The occurrence of authentic TLS in dendritic clusters was verified by expressing myc-tagged TLS in hippocampal neurones. Myc-TLS clustered into dendritic puncta similar to those seen with endogenous TLS (Fig. 3, O–Q).

The recent finding that TLS copurifies with the NMDA receptor complex [9] raises the intriguing possibility that both proteins may interact at the synapse. To our surprise, TLS immunoreactivity was largely excluded from the nuclei of hippocampal neurones, in adult hippocampus in situ as well as in mature neuronal cultures. This suggests massive nuclear export of the protein. Alternatively, it is possible that TLS undergoes localized degradation in the nucleus. Indeed, compared to its abundance in other tissues, TLS is relatively

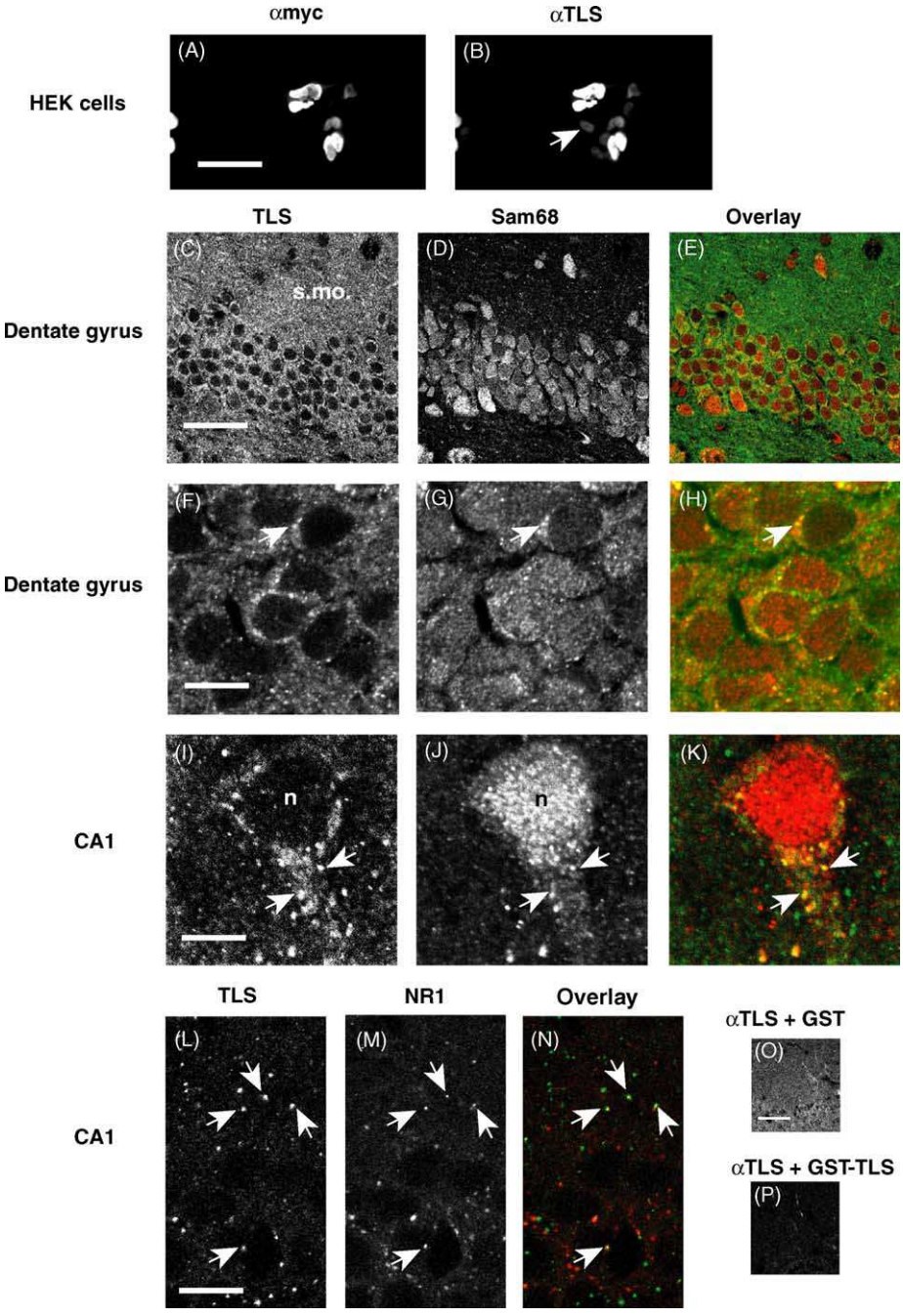


Fig. 2. TLS localization in the hippocampus. (A and B) Specificity of the TLS antibody. HEK-293 cells transiently expressing myc-tagged TLS were doubly stained with anti-myc monoclonal antibody (A) and anti-TLS antibody (B). Labelling was visualized by wide-field fluorescence microscopy. Scale bar: 40 μm. Arrow: nuclear staining of endogenous TLS in a non-transfected cell. (C–N) Coronal sections of adult hippocampus were doubly stained with anti-TLS antibody (C, F, I and L; green in E, H, K and N) and either anti-Sam68 monoclonal antibody (D, G and J; red in E, H and K) or anti-NR1 monoclonal antibody (M; red in N). Labelling was visualized by laser scanning confocal microscopy; shown are single confocal planes extracted from the middle of z series. (C–E) Granule cells and neuropil of the dorsal dentate gyrus. s.mo., stratum moleculare. Scale bar: 40 μm. (F–H) Granule cell layer of the dorsal dentate gyrus. Arrows: perikaryal TLS puncta that colocalize with Sam68 puncta. Scale bar: 10 μm. (I–K) Pyramidal neurone in the CA1 layer. Arrows: TLS puncta that colocalize with Sam68 puncta in proximal dendrite. n: nucleus. Scale bar: 6.65 μm. (L–N) CA1 neurones. In order specifically to evaluate the overlap of fluorescent puncta, images (acquired as in C–K) were thresholded so that the diffuse component of TLS fluorescence does not appear. Arrows: TLS puncta that coincide with NR1 puncta. Scale bar: 10 μm. (O and P) Sections were immunostained after preincubation of the anti-TLS antibody with either unfused GST or GST-TLS fusion protein, and visualized by confocal microscopy under identical conditions. Scale bar: 40 μm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

scarce in the brain [12]. Whatever its mechanism, the depletion of nuclear TLS may conceivably play a role in neurone-specific transcription or splicing events. In cultured cell lines, increasing the intranuclear concentration of TLS has been shown either to inhibit or to potentiate the activity of specific transcription factors, and to bias exon selection in transcripts encoded by a transfected minigene [6]. Whether the lack of nuclear TLS may affect the sensitivity of neurones

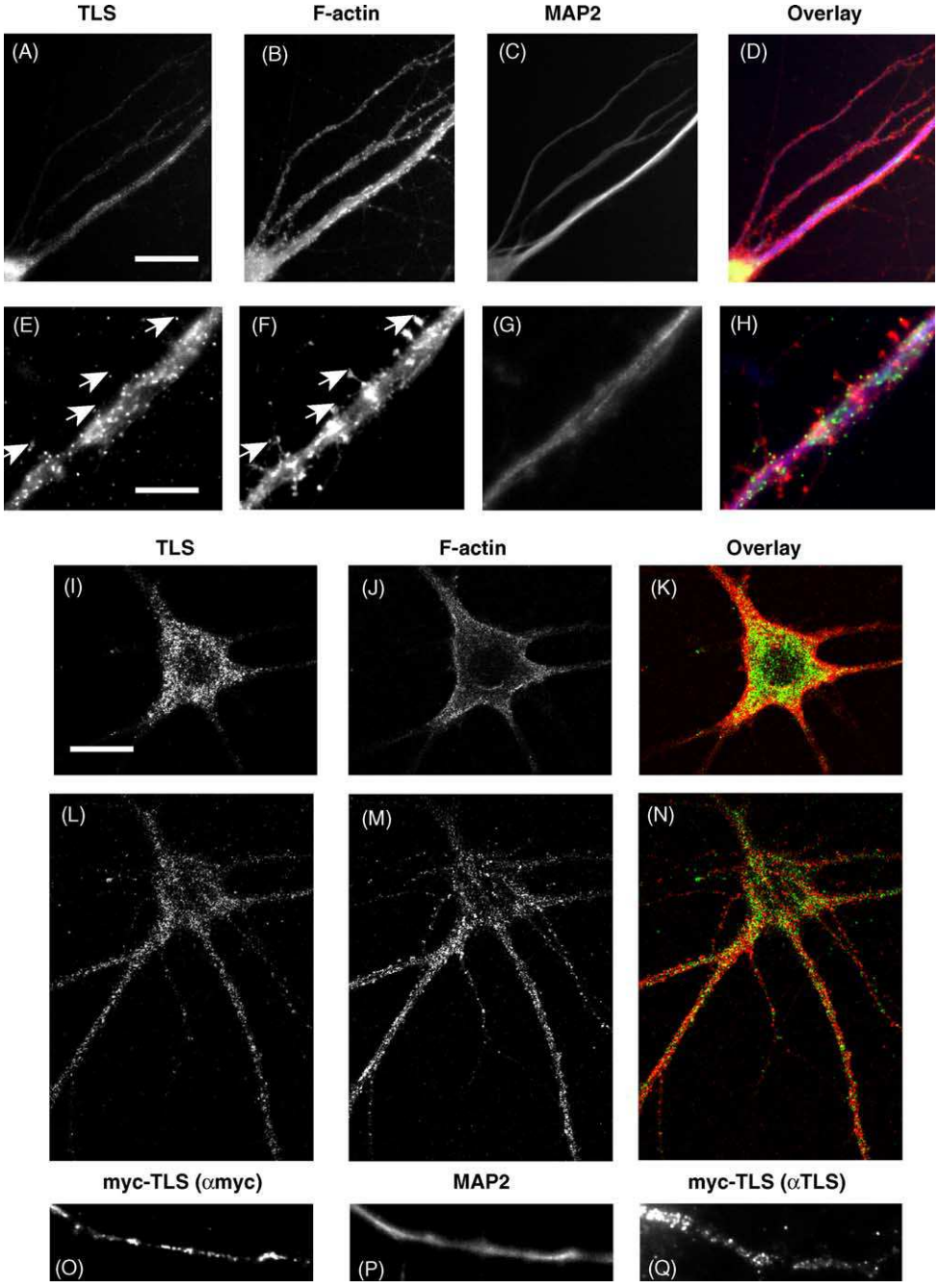


Fig. 3. TLS exists in dendritic granules, some of which are localized within spines. (A–H) Fetal hippocampal neurones were allowed to mature in culture for 4 weeks, and then triply stained with anti-TLS antibody (A and E; green in D and H), rhodamin-conjugated phalloidin (B and F; red in D and H), and anti-MAP2 monoclonal antibody (C and G; blue in D and H). (A–D) Wide-field view of an isolated neurone, (E–H) details of a dendrite. Arrows: TLS clusters (E) located outside of the dendritic trunk, overlapping with dendritic spine heads (F). Scale bar: (A–D) 20 μm, (E–H) 10 μm. (I–N) cultured neurone, doubly stained with anti-TLS antibody (I and L, green in K and N) and rhodamin-conjugated phalloidin (J and M, red in K and N), and visualized by confocal microscopy. Single optical sections are shown to illustrate the distribution of labelling through the nucleus and soma (I–K) and the dendrites (L–N). Scale bar: 20 μm. (O–Q) myc-tagged TLS forms dendritic clusters in hippocampal neurones. Neurones were transfected at 14 DIV with the myc-TLS plasmid, and fixed one week later. Transfected neurones were doubly stained with anti-myc antibody (O) and with polyclonal anti-MAP2 antibody (P), or stained with anti-TLS antibody (Q). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

to DNA breaks, e.g. by ionizing radiation [8], is an open question.

Biochemical analysis indicated that in the cytoplasm, TLS was partitioned into a cytosolic pool and a particulate pool, sedimenting with the polysomal fraction. Diffuse and granular pools of TLS were also observed by immunofluorescence in the somatodendritic domain. The dendritic puncta often contained Sam68, an RNA-binding protein which, outside of the nucleus, becomes incorporated in RNA-containing dendritic granules [3,5]. These observations suggest that some of the observed TLS clusters are in fact RNA granules, involved in dendritic mRNA transport or translation. It is possible that part of the punctuate immunofluorescence in fact arose from reaction of the antibody with the 100 kDa protein seen in the polysomal fraction. Whether this band represents a modified, granule-specific form of TLS, or an antigenically related protein remains to be determined. However, the presence of bona fide TLS in dendritic granules is supported by several lines of evidence. A small but significant fraction of the 75 kDa TLS protein was found in the polysomal pellet; this was confirmed by using a second antibody, raised against a different region of the TLS protein. Furthermore, when transiently expressed in hippocampal neurones, myc-tagged TLS also clustered into dendritic puncta. Finally, a recent proteomic study identified TLS as one of the multiple RNA-binding proteins found in biochemically purified RNA transport granules [11]. Our data provide a morphological correlate to this biochemical result. The microscopically defined granules correspond to very large supramolecular complexes, in which mRNAs, ribosomes, motor proteins, and multiple RNA-binding proteins are associated [11]. TLS might possibly become recruited from the cytosolic TLS pool during the cytoplasmic maturation of these complexes.

In adult hippocampus, a subset of TLS puncta also colocalized with NMDA receptor clusters; furthermore, in cultured neurones, TLS puncta could be seen within spine heads. Thus, the biochemical association of TLS to NMDA receptors likely occurs in the spines. Our data suggest that TLS is in an ideal position to regulate mRNA docking or translation at excitatory postsynaptic sites, as a function of the local activity history. It will be important to determine the extent and functional effect of TLS association with mRNA in the dendrites and in the spines.

Acknowledgements

We thank Alexei Grichine and the Institut Albert Bonniot for access to the confocal microscope and for advice in imaging. Work funded by the INSERM and by ACI Télémédecine (image analysis).

References

[1] L.N. Antar, R. Afroz, J.B. Dictenberg, R.C. Carroll, G.J. Bassell, Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile X mental retardation protein and Fmr1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses, J. Neurosci. 24 (2004) 2648–2655.
[2] G. Banker, H. Asmussen, K. Goslin, Rat Hippocampal Neurons in Low-Density Culture, second ed., MIT Press, 1998, 666 pp.
[3] N. Ben Fredj, J. Grange, R. Sadoul, S. Richard, Y. Goldberg, V. Boyer, Depolarization-induced translocation of the RNA-binding protein Sam68 to the dendrites of hippocampal neurons, J. Cell Sci. 117 (2004) 1079–1090.
[4] Y. Feng, C.-A. Gutekunst, D.E. Eberhart, H. Yi, S.T. Warren, S.M. Hersch, Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes, J. Neurosci. 17 (1997) 1539–1547.
[5] J. Grange, V. Boyer, R. Fabian-Fine, N.B. Fredj, R. Sadoul, Y. Goldberg, Somatodendritic localization and mRNA association of the splicing regulatory protein Sam68 in the hippocampus and cortex, J. Neurosci. Res. 75 (2004) 654–666.
[6] M. Hallier, A. Lerga, S. Barnache, A. Tavitian, F. Moreau-Gachelin, The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS, J. Biol. Chem. 273 (1998) 4838–4842.
[7] E. Harlow, D. Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, 495 pp.
[8] G.G. Hicks, N. Singh, A. Nashabi, S. Mai, G. Bozek, L. Klewes, D. Arapovic, E.K. White, M.J. Koury, E.M. Oltz, L. Van Kaer, H.E. Ruley, Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death, Nat. Genet. 24 (2000) 175–179.
[9] H. Husi, M.A. Ward, J.S. Choudhary, W.P. Blackstock, S.G. Grant, Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes, Nat. Neurosci. 3 (2000) 661–669.
[10] S. Kameoka, P. Duque, M.M. Konarska, p54nrb associates with the 5′ splice site within large transcription/splicing complexes, EMBO J. 23 (2004) 1782–1791.
[11] Y. Kanai, N. Dohmae, N. Hirokawa, Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule, Neuron 43 (2004) 513–525.
[12] T. Melot, L. Dauphinot, N. Sevenet, F. Radvanyi, O. Delattre, Characterization of a new brain-specific isoform of the EWS oncoprotein, Eur. J. Biochem. 268 (2001) 3483–3489.
[13] J. Peng, M.J. Kim, D. Cheng, D.M. Duong, S.P. Gygi, M. Sheng, Semi-quantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry, J. Biol. Chem. (2004) M400103200.
[14] D. Perrotti, S. Bonatti, R. Trotta, R. Martinez, T. Skorski, P. Salomoni, E. Grassilli, R.V. Iozzo, D.R. Cooper, B. Calabretta, TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis, EMBO J. 17 (1998) 4442–4455.
[15] M.S. Rook, M. Lu, K.S. Kosik, CaMKIIalpha 3′ untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage, J. Neurosci. 20 (2000) 6385–6393.
[16] O. Steward, E.M. Schuman, Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons, Neuron 40 (2003) 347–359.
[17] H. Zinszner, J. Sok, D. Immanuel, Y. Yin, D. Ron, TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling, J. Cell Sci. 110 (1997) 1741–1750.

3. Article 3 : Impaired dendritic spine maturation induced by dominant negative activity of CHMP2B mutants linked to Fronto-temporal dementia

Agnès Belly, Gilles Bodon, Béatrice Blot, Alexandre Bouron, Rémy Sadoul, Yves Goldberg.

Contexte de l'étude

Les complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complexe Required for Transport) participent au tri des protéines au niveau des endosomes. L'acheminement correct des protéines vers la voie de recyclage ou vers la voie de dégradation est primordial pour le bon fonctionnement neuronal. En 2005, Skibinski est ses collaborateurs ont identifié une mutation dans le gène de la protéine CHMP2B (ESCRT-III), chez une famille de patients atteints de démence frontotemporale (Skibinski et al., 2005). Pour la toute première fois une protéine du complexe ESCRT-III est impliquée directement dans maladie neurodégénérative. La mutation ponctuelle dans le gène de CHMP2B conduit à un épissage aberrant de l'ARN de CHMP2B et à la production de deux protéines, l'une tronquée en partie C-terminale : $CHMP2B^{intron5}$, et l'autre, $CHMP2B^{\Delta 10}$ dont la partie C-terminale est aberrante (cf. figure 15. Introduction, paragraphe 2.4.1). Ces deux mutants ont perdu la capacité d'interagir avec l'ATPase VPS4, qui désassemble les polymères d'ESCRT-III. Le mutant $CHMP2B^{intron5}$ est à l'image des mutants activés *in vitro*, capables de former des hétéropolymères à la surface des membranes. Ces mutants perturbent le fonctionnement des endosomes lorsqu'ils sont exprimés dans des lignées cellulaires ; or, un dysfonctionnement des endosomes a été identifié dans de nombreuses maladies neurodégénératives. De plus, le complexe ESCRT-III semble avoir un rôle générique consistant à étirer et scinder des tubes de membrane lipidique en agissant de l'intérieur. Cette activité pourrait être importante pour la formation ou le maintien de structures spécifiques telles que les épines dendritiques.

Notre hypothèse de travail est que la perturbation des ESCRT a pour premier effet de perturber les synapses, via le dérèglement du trafic endosomial de récepteurs synaptiques, ou plus directement en agissant sur la membrane neuronale.

Résultats

3.1. Constructions des mutants de CHMP2B étiquetés

L'ADNc de CHMP2B de type sauvage a été obtenu par PCR à partir d'ADNc de cellules HEK (Human Embryonnary Kidney). $CHMP2B^{intron5}$ est tronquée en partie C-terminale, il lui manque les 35 acides aminés terminaux de $CHMP2B^{wt}$ et une valine a été ajoutée en position terminale. Ce mutant a été construit par PCR à partir de l'ADNc de $CHMP2B^{wt}$. $CHMP2B^{\Delta 10}$ possède quant à lui une partie C-terminale aberrante. Cette partie C-terminale a été construite par PCR, par la technique de mégaprimer, puis fusionnée avec $CHMP2B^{intron5}$. Les étiquettes HA et Myc ont été ajoutés par les amorces ayant servi à l'amplification des ADNc. Les constructions obtenues sont présentées dans la figure 1.

3.2. Expression de $CHMP2B^{wt}$ et $CHMP2B^{intron5}$ dans la lignée cellulaire BHK

Afin de déterminer le profil d'expression de $CHMP2B^{wt}$ et du mutant $CHMP2B^{intron5}$, nous avons transfecté des cellules BHK avec ces deux constructions. $CHMP2B^{wt}$ a une distribution cytosolique, se concentrant parfois au niveau d'adhérences focales. $CHMP2B^{intron5}$ forme quant à lui des structures positives pour les marqueurs des endosomes de recyclage (transferrine), des endosomes précoces (EEA1) et des endosomes tardifs (LAMP1) (figure B.I., flèches). Ces données indiquent que le mutant $CHMP2B^{intron5}$ provoque dans les BHK la formation d'endosomes aberrants.

Les complexes ESCRT-III, dont CHMP2B fait partie, sont impliqués dans le tri des protéines transmembranaires ubiquitinylées vers la voie de dégradation. Afin de déterminer si le tri des protéines ubiquitinylées est perturbé par la formation des endosomes aberrants formés par $CHMP2B^{intron5}$; nous avons réalisé un marquage avec anticorps anti-ubiquitine de cellules BHK exprimant ce mutant. Les amas de $CHMP2B^{intron5}$ sont positifs pour l'ubiquitine (figure B. I., panneaux du bas, flèches). Afin de déterminer si ceci s'explique par l'ubiquitination de $CHMP2^{intron5}$ elle-même, ou bien s'il s'agit effectivement d'agrégation de protéines endogènes ubiquitinylées, nous avons transfecté des cellules BHK avec un contrôle (le pcDNA vide), la forme de type sauvage de CHMP2B (HA-$CHMP2B^{wt}$), et le mutant HA-$CHMP2B^{intron5}$, puis nous avons immunoprécipité les différentes formes de CHMP2B à l'aide d'un anticorps anti-HA, et sondé les western blot avec un anticorps anti-ubiquitine.

L'immunoprécipitation a été vérifiée avec l'anticorps anti-HA ; HA-CHMP2B^{wt} et HA-CHMP2B^{intron5} ont bien été immunoprécipitées (figure B. II. gauche). L'autoradiographie du western blot de droite ne révèle pas de signal ubiquitine pour CHMP2B^{wt} et CHMP2B^{intron5}, malgré le fait que l'on puisse détecter de l'ubiquitine dans les lysats (figure B. II. droite). CHMP2B^{wt} et CHMP2B^{intron5} ne sont donc pas ubiquitinylées, et les amas positifs pour l'ubiquitine dans les cellules BHK, correspondent donc à des agrégats de protéines ubiquitinylées. Des protéines ubiquitinylées s'accumulent donc dans les endosomes aberrants formés par CHMP2B^{intron5}, suggérant que ces endosomes ne peuvent plus délivrer les protéines aux lysosomes.
CHMP2B^{intron5}, provoque donc la formation d'endosomes aberrants non fonctionnels.

3.3. Expression endogène de CHMP2B dans des cerveaux de souris

Afin de déterminer la localisation endogène de CHMP2B, nous avons réalisé, à l'aide de Karin Pernet-Gallay (Equipe 1 GIN), un double marquage immunoélectronique de CHMP2B dans la région CA1 d'hippocampe de cerveau de souris. L'utilisation de deux anticorps anti-CHMP2B, nous permet d'avoir plus confiance dans le marquage obtenu. Notre anticorps est un anticorps polyclonal, que nous avons fait fabriquer par l'entreprise Covalab, à partir de CHMP2B recombinante entière. L'anticorps polyclonal fabriqué par l'entreprise AbCam, est dirigé contre un peptide reproduisant les 14 derniers acides aminés de la protéine. Nous avons réalisé successivement deux immunomarquages, afin de détecter notre anti-CHMP2B par une protéine A couplée à des billes d'or de 10 nm, et de détecter l'anti-CHMP2B de AbCam par une protéine A couplée à des billes d'or de 15 nm.
La présence d'une bille d'or dans la tête d'une épine dendritique (figure C. i. flèche), avec l'anticorps d'AbCam, et celle d'une bille d'or à proximité de la membrane du cou d'une épine dendritique (figure C. ii. flèche), avec notre anticorps ; indiquent que CHMP2B est exprimé dans les épines dendritiques. Les mitochondries sont aussi positives pour les deux anticorps (figure C. iii ; cf Discussion).
Cependant le marquage est discret, CHMP2B est probablement localisé de manière transitoire dans les épines dendritiques.

3.4. Expression de CHMP2B et de ses mutants dans des neurones d'hippocampe de rat en culture

L'équipe de Gao a montré que le mutant CHMP2B^{intron5} causait la rétraction des neurites et la mort de neurones corticaux de rat en culture (Lee et al., 2007). Cependant, le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$ n'induit pas de rétraction des neurites ; et ni CHMP2B$^{\Delta 10}$, ni l'extinction de CHMP2B endogène par l'utilisation de siRNA n'ont d'effet sur la viabilité neuronale (Lee et al., 2007). Or dans des cellules tests CHMP2B$^{\Delta 10}$ forme des vésicules aberrantes et bloque l'autophagie de façon similaire à CHMP2B^{intron5} (Filimonenko et al., 2007); la dérégulation d'ESCRT-III n'entraîne donc pas nécessairement une mort cellulaire rapide. Afin d'étudier les effets de CHMP2B sur les épines dendritiques indépendamment de modifications non spécifiques dues à la mort neuronale, nous avons utilisé en parallèle de CHMP2B^{intron5} le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$.

3.4.1. Effet de CHMP2B et de ses mutants sur la mort neuronale

Nous avons vérifié que dans nos conditions, les neurones pouvaient survivre après une assez longue expression des différents mutants, sans présenter de signe de dégénérescence. Nous avons co-transfecté des neurones d'hippocampe de rat avec les différentes constructions de CHMP2B combinées à un plasmide codant la protéine cytosolique rouge, mCherry (monomeric Cherry). Les plasmides CHMP2B ont été transfectés en quantité relativement faible par rapport à un protocole typique (0,5 µg au lieu de 2,5-3 µg) ; toutefois nous ne pouvons pas comparer exactement avec les conditions de Lee et al., du fait que ces auteurs ne précisent pas la quantité d'ADN qu'ils emploient. La protéine mCherry nous permet d'une part de repérer les neurones transfectés mais aussi de faire apparaître la morphologie des neurones ; en effet la protéine est cytosolique et envahit tout le neurone. Des neurones sont prélevés 5 jours et 11 jours après la transfection. La viabilité des neurones est évaluée sur la base de leur morphologie, les neurones sont vivants lorsque leurs neurites sont intacts, et bien lisses, sans renflements. Nous avons préféré cette approche, à une coloration du noyau. En effet, dans le cas présent, Lee et ses collaborateurs ont montré que la mort des neurones induite par le mutant CHMP2B^{intron5} ne faisait pas intervenir les caspases. Les neurones ne présentent pas de condensation de leur chromatine ; ainsi le Hoeschst qui s'intercale dans

l'ADN et révèle des zones de condensation, est inutile. L'iodure de propidium (PI) quant à lui, s'utilise avant la fixation des neurones ; il pénètre dans les cellules dont la membrane est fragilisée, et s'intercale dans l'ADN. Les cellules vivantes sont PI négatives et les cellules mortes PI positives. Aussi, après la fixation à la PFA, il n'est pas rare de perdre le noyau des neurones, en particulier des neurones morts. Ainsi, les neurones morts apparaissent PI négatifs. Cette technique génère donc des faux positifs. En revanche, lorsqu'un neurone meurt, ses neurites présentent des renflements sur leur longueur, remplis de protéine fluorescente rouge, sous le microscope ils ont alors l'aspect de « colliers de perles » ; et lorsqu'ils sont morts, il ne reste plus que « les perles », plus que le squelette du neurone ; on a l'impression « d'explosions de feux d'artifices ». Ainsi, l'évaluation de la viabilité des neurones sur le critère morphologique nous semble tout à fait correcte.

Après 5 jours d'expression, 75 à 80 % des neurones transfectés avec le plasmide vide, $CHMP2B^{wt}$ ou $CHMP2B^{\Delta 10}$, présentent une belle morphologie (figure S2). De plus, 85 % des neurones transfectés sont synaptiquement actifs dans les mesures d'électrophysiologie (figure 6). De manière intéressante, 55 % des neurones exprimant $CHMP2B^{intron5}$ sont vivants 5 jours après la transfection. Ces pourcentages ne changent pas significativement après 11 jours d'expression des mutants. Ainsi dans les conditions que j'ai établies, les neurones peuvent survivre longtemps après la transfection des plasmides codant les mutants.

L'équipe de Gao a montré que la mort des neurones induite par $CHMP2B^{intron5}$ était corrélée avec une accumulation des autophagosomes (Lee et al., 2007; Lee and Gao, 2009), impliquant le processus autophagique dans cette mort neuronale. Nous avons donc évalué, dans nos conditions, la formation d'autophagosomes par la transfection de LC3-GFP. Suite au déclenchement de l'autophagie, les autophagosomes se forment et recrutent LC3 au niveau de leur membrane. LC3-GFP a une répartition diffuse dans la cellule ; lorsqu'elle est recrutée au niveau des autophagosomes la composante diffuse disparaît au profit d'agrégats au niveau des autophagosomes.

L'expression de $CHMP2B^{intron5}$ induit parfois une agrégation de LC3-GFP dans le soma (figure S3, b4 flèche) ; cependant, il subsiste dans ces neurones une portion soluble de LC3-GFP non négligeable (figure S3, b4 tête de flèche). Dans la plupart des cas, $CHMP2B^{intron5}$ n'induit pas d'agrégation de LC3-GFP (figure S3, b2). $CHMP2B^{wt}$ et $CHMP2B^{\Delta 10}$ n'induisent pas d'agrégation de LC3-GFP (Figure S2, a2, c2).

Ces données confirment l'absence de toxicité de $CHMP2B^{wt}$ et $CHMP2B^{\Delta 10}$; et indiquent aussi que exprimé à un taux relativement bas, $CHMP2B^{intron5}$ ne cause pas de mort rapide.

3.4.2. Profil d'expression de CHMP2B et de ses mutants dans des neurones d'hippocampe de rat en culture

Des neurones d'hippocampe de rat ont été transfectés au 10ème jour de culture avec les différents mutants, puis fixés 5 jours après la transfection. Les neurones ont été marqués avec des anticorps dirigés contre les étiquettes HA ou Myc. Les piles d'images ont été acquises au microscope confocal et les projections des intensités maximales des piles d'images sont présentées.

$CHMP2B^{wt}$ a une distribution homogène dans le cytoplasme des neurones, incluant l'axone, les dendrites et les épines dendritiques (figure S1. haut et flèches ; figure 2. a1, d1). En revanche, les mutants $CHMP2B^{intron5}$ et $CHMP2B^{\Delta 10}$, forment des grains de taille variable dans le soma et les dendrites proximales (figure S1. Milieu et bas ; figure 2. b1, e1, c1, f1).

Afin de déterminer si les grains formés par les mutants sont des structures endosomiales, nous avons marqués doublement les neurones par un anti-HA ou anti-Myc et par des anticorps dirigés contre des marqueurs des endosomes précoces, EEA1 (figure 2. a2, b2, c2) ou des endosomes tardifs, LAMP1 (figure 2. d2, e2, f2). Aucune colocalisation n'a pu être observée avec ces marqueurs. Dans nos conditions de transfection, les agrégats formés par les mutants de CHMP2B ne sont pas associés aux endosomes.

L'expression des mutants de CHMP2B ne semble pas, dans les neurones, provoquer la formation d'endosomes aberrants.

3.5. Effets des mutants de CHMP2B sur la morphogenèse des épines dendritiques

Les neurones d'hippocampe ont été co-transfectés avec les plasmides codant les variants de CHMP2B et la mCherry. Les neurones sont fixés 5 jours après la transfection et examinés au microscope confocal. Des piles d'images de dendrites ont été acquises au microscope confocal pour chaque neurone. Des vues représentatives des neurones exprimant les différentes constructions, sont présentées dans la figure 3.A. Le logiciel NeuronStudio a

été utilisé pour reconstruire en trois dimensions l'arborisation dendritique et les épines dendrites à partir de ces piles d'images (Rodriguez et al., 2006). Le logiciel compte, mesure, et classe les épines dendritiques de manière automatique (Rodriguez et al., 2008). La figure 3.B illustre le type de reconstruction 3D obtenue à partir d'une pile d'images (figure 3.B. gauche) ; le segment dendritique d'un neurone exprimant CHMP2B^{wt} présenté dans la figure3A. b, b1, a été utilisé comme exemple. À droite dans la figure 3B. des points de couleurs ont été superposé aux épines dendritiques en fonction de leur type ; jaune pour les épines fines (t), bleu pour les épines de types stubby (s) et rouge pour les épines de type mushroom (m).

Nous avons mesuré la distribution des volumes des épines d'un neurone contrôle (figure S4). La forme de la distribution est en accord avec celle reportée par (Yasumatsu et al., 2008) dans des tanches d'hippocampe. 652 épines ont été mesurées, les volumes sont compris entre 0,020 et 2,22 μm^3. Le pic de distribution est compris entre 0,050 et 0,075 μm^3 ; c'est à dire dans le même intervalle que le volume moyen mesuré par l'équipe de Boyer, lors de l'analyse en microscopie électronique, des épines dendritiques de neurones d'hippocampe en culture depuis 14 jours (Boyer et al., 1998).

Ces données mises ensemble, indiquent que le logiciel NeuronStudio détecte correctement les épines dans nos cultures.

Le mutant CHMP2B^{intron5} induit une augmentation de 64 %, par rapport au contrôle, de la densité linéaire des épines dendritiques (figure 4.A., B.). Le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$ tend lui aussi à augmenter la densité, par rapport au contrôle ; mais cette augmentation n'est pas significative. La transfection des différentes constructions n'affecte pas la longueur moyenne des épines (figure 4.C., D.). En revanche le diamètre moyen des têtes des épines est affecté. Les mutants CHMP2B^{intron5} et CHMP2B$^{\Delta 10}$ provoquent une diminution du diamètre moyen des têtes des épines, respectivement de 40 % et 32 % par rapport au contrôle (figure 4.E.). Ces changements reflètent un décalage des fréquences cumulées des diamètres des têtes des épines (figure 4.F.) et de la distribution normalisée des diamètres des têtes des épines (figure 4.H.).

La forme des épines dendritiques étant importante pour leur physiologie, nous avons examiné les effets des mutants sur la morphologie des différentes catégories d'épines. La proportion d'épines de type mushroom diminue de 50 % dans les neurones exprimant les mutants CHMP2B^{intron5} et CHMP2B$^{\Delta 10}$, au profit d'une augmentation de la proportion d'épines fines (figure 5.A.). La proportion d'épines de type stubby est aussi réduite dans les neurones

exprimant le mutant CHMP2B^{intron5}. Une telle baisse de la taille et de la proportion des épines larges, peut être le reflet soit de la diminution de la densité absolue des épines larges, soit de la dilution des épines larges parmi les épines fines ; soit les deux. Concernant le mutant CHMP2B^{intron5}, il tend à diminuer la densité des épines mushroom mais de manière non significative (figure 5.B.) ; et il ne modifie pas la densité des épines stubby (figure 5.C.). En revanche, il provoque une forte augmentation de la densité absolue des épines fines (figure 5.D). Les épines fines sont deux fois plus nombreuses. D'une densité de 0,62 épines par micromètres de dendrites dans les conditions contrôles, elles atteignent la densité de 1,3 par micromètre dans les neurones exprimant le mutant CHMP2B^{intron5}. Ainsi, la diminution de la proportion des épines mushroom, par le mutant CHMP2B^{intron5}, est due à l'augmentation du nombre d'épines fines. Le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$ quant à lui provoque une diminution significative de la densité d'épines mushroom (figure 5.B., les épines mushroom sont deux fois moins nombreuses par rapport au contrôle) ; et une diminution légère de la densité d'épines stubby (figure 5.C.). CHMP2B$^{\Delta 10}$ tend à augmenter la densité d'épines fines, mais cette augmentation n'est pas significative (figure 5.D.). Dans le cas du mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$, la diminution de la proportion d'épines mushroom, est due à une diminution du nombre d'épines mushroom.

Les mutants CHMP2B^{intron5} et CHMP2B$^{\Delta 10}$, ont donc chacun des effets spécifiques sur le développement des épines dendritiques, dont la conséquence commune est une diminution de la proportion des épines de type mushroom.

3.6. Effet de CHMP2B^{intron5} sur l'expression de surface de la sous-unité GluR2

Afin d'évaluer si les modifications morphologiques induites par le mutant CHMP2B^{intron5} pouvaient être corrélées à des changements protéiques au niveau des synapses, nous avons mesuré la quantité de récepteurs AMPA présents à la surface des neurones exprimant ce mutant. Nous avons donc réalisé un marquage de surface de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA, cette dernière étant présente dans tous les récepteurs AMPA et joue un rôle clé dans le trafic des récepteurs. Les neurones sont cotransfectés à 15 jours de vie *in vitro* avec les différents plasmides (contrôle, CHMP2B^{wt} et le mutant CHMP2B^{intron5}) et le plasmide codant la protéine cytosolique rouge, la mRFP (monomeric Red Fluorescent Protein) ; puis préparés pour l'immunofluorescence le lendemain. Les neurones ont été incubés vivants avec un anticorps anti-GluR2 monoclonal ; puis lavés, fixés et directement

incubé avec de la BSA (Bovine Serum Albumin) et du GPI (Goat PreImmun) pour saturer les sites antigéniques avant l'incubation avec l'anticorps secondaire. De cette manière, on évite le bruit de fond dû à la PFA, qui peut percer les membranes. Des piles d'images sont acquises au microscope confocal, pour chaque fluorescence, rouge (mRFP) et verte (GluR2). La figure D.I. illustre les projections des intensités maximales des images des piles, de la fluorescence de GluR2 et de la mRFP. Le neurone exprimant le mutant CHMP2B^{intron5} présente une nette diminution de la fluorescence GluR2 en comparaison aux dendrites alentour (figure D.I., flèches). Nous avons quantifié cette fluorescence à l'aide du logiciel Métamorph. Le plan focal, parmi la pile d'images mRFP, contenant le maximum d'intensité en z est choisi. Après seuillage, une région est automatiquement dessinée autour du neurone et transférée dans le plan équivalent de la fluorescence verte. L'intensité de fluorescence par pixel est mesurée dans cette région et rapportée sur le graphique (figure D.II). La fluorescence de GluR2 diminue dans les neurones exprimant le mutant CHMP2B^{intron5} par rapport aux neurones contrôles.

Les résultats préliminaires indiquent qu'en comparaison de CHMP2B^{wt}, le mutant CHMP2B^{intron5} provoque une diminution significative de l'expression en surface de GluR2 ($p=0,02$, test t). Nous n'avons pas encore pu collecter suffisamment de données sur des contrôles (plasmide vide) pour obtenir une ANOVA significative ; cependant la tendance montre la même densité de GluR2 qu'avec CHMP2B^{wt}. Ce travail devra être poursuivi.

3.7. Conséquences physiologiques de l'expression des mutants de CHMP2B

Afin d'évaluer si les modifications morphologiques induites par les mutants pouvaient être corrélées à des changements fonctionnels au niveau des synapses, nous avons à l'aide d'Alexandre BOURON (CEA, Grenoble), réalisé des expériences de patch clamp sur des neurones transfectés avec soit le plasmide vide comme contrôle soit CHMP2B^{wt} soit CHMP2B$^{\Delta 10}$. Nous avons utilisé le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$ plutôt que le mutant CHMP2B^{intron5} pour nous affranchir des effets dus à la toxicité de CHMP2B^{intron5}. Les neurones ont été cotransfectés avec la GFP, pour permettre leur localisation. L'expression de CHMP2B^{wt} et CHMP2B$^{\Delta 10}$ induit une augmentation de la capacitance des cellules (figure 6.B.). La raison pour laquelle la capacitance est élevée n'est pas claire (cf Discussion). Nous avons mesuré la fréquence et l'amplitude des minis courants excitateurs postsynaptiques (mEPSCs) afin d'évaluer les effets possible des constructions sur la force synaptique. Les signatures

électriques représentatives de chaque condition sont présentées dans la figure 6A. La fréquence moyenne des mEPSC des neurones exprimant les différentes constructions, ne diffère pas significativement (figure 6.C.). Afin d'évaluer les effets des constructions sur l'amplitude des courants, nous avons choisi, par groupe de neurones et de manière arbitraire, un nombre équivalent de mEPSC. L'amplitude des courants des neurones exprimant CHMP2B$^{\Delta 10}$ est légèrement plus faible (7,5 %) par rapport aux neurones contrôles (figure 6.D.). L'histogramme des amplitudes cumulées indique que CHMP2B$^{\Delta 10}$ provoque une diminution des événements de large amplitude (figure 6.E.). Nous avons classé les courants en événements de petite amplitude : S < 5 pA, moyenne amplitude : 5 ≤ M ≤ 20 pA, et de grande amplitude : L > 20 pA. La proportion des grands événements diminue significativement de 19 % dans les conditions contrôles à 13 % dans les conditions où les neurones expriment le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$, et à l'inverse la proportion des petits augmentent de 6,8 % à 10 % (figure 6.F.).
Ces données suggèrent que l'expression du mutant provoque la réduction de la proportion de synapses fortes et augmente la proportion de synapses faibles.

3.8. Rôle de CHMP2B endogène dans la morphogenèse des épines dendritiques

L'analyse en biochimie de lysats de culture de neurones, montre que CHMP2B est présent dès le 8ème jour de vie *in vitro* et son expression augmente dans des cultures plus âgées (15 et 21 jours *in vitro*), c'est-à-dire durant la spinogenèse et la synaptogenèse (figure S5.) Par ailleurs, l'anticorps fabriqué par AbCam étant dirigé contre les 9 derniers acides aminés de CHMP2B, il ne reconnait pas les mutants CHMP2B^{intron5} et CHMP2B$^{\Delta 10}$. L'utilisation de cet anticorps nous permet d'étudier la localisation de CHMP2B endogène dans des neurones exprimant les mutants. CHMP2B endogène est en partie piégé dans les grains de CHMP2B^{intron5}, mais pas dans ceux de CHMP2B$^{\Delta 10}$ (figure S6.) ; suggérant que le mutant CHMP2B^{intron5} peut perturber la fonction de CHMP2B endogène.
Ces données amènent à se demander si CHMP2B endogène peut jouer un rôle dans la spinogenèse.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons éteint l'expression de CHMP2B à l'aide du système d'interférence de l'ARN, en transfectant les neurones avec des shRNA (small hair-pin RNA) (figure 7.A.). Le plasmide pSuper portant les CHMP2B-shRNA, porte aussi le gène

codant la protéine mCherry, ce qui nous permet d'une part de repérer les neurones qui expriment les CHMP2B-shRNA et d'autre part de procéder à la reconstruction des dendrites et des épines dendritiques comme nous l'avons fait pour les mutants. L'extinction de CHMP2B endogène est évaluée par immunofluorescence avec un anti-CHMP2B.

En accord avec les données de Lee et ses collaborateurs, les CHMP2B-shRNA n'affectent pas la viabilité neuronale (Lee et al., 2007). L'extinction de CHMP2B endogène induit une augmentation de la densité moyenne des épines (figure 8.A. et B.). La spécificité de cet effet est confirmée par la co-expression avec les CHMP2B-shRNA, d'un ADNc CHMP2B, muté de manière ponctuelle qui code un ARNm résistant aux sh : CHMP2B*. La densité des épines est restaurée par la co-expression de CHMP2B* (figure 8.A. et B.).

La longueur moyenne des épines n'est pas affectée par l'expression des CHMP2B-shRNA (figure 8.C. et D.). En revanche, le diamètre moyen des épines est significativement réduit par l'expression des CHMP2B-shRNA, mais restauré par la co-expression de CHMP2B* (figure 8.E. et F.). De la même manière que pour les mutants de CHMP2B, la distribution des diamètres des têtes des épines présente une perte des épines larges ; perte restaurée par la co-expression de CHMP2B* (figure 8.G.). La classification des épines par type révèle que la proportion des épines de types mushroom diminue de moitié, de 17 % dans les contrôles elle s'élève seulement à 9 % dans les neurones dans lesquels CHMP2B a été éteint ; et la proportion d'épines fines augmente significativement (figure 8. H.). Ces effets sont équivalents à ceux observés dans les neurones exprimant les mutants. Grâce à la co-expression de CHMP2B*, les proportions d'épines de types mushroom et fines peuvent être restaurées ; il n'y a pas de différence significative avec le contrôle (figure 8.H.). La restauration de chaque effet des CHMP2B-shRNA par la forme résistante de CHMP2B, étaye la spécificité des ces effets.

La densité absolue des épines de types mushroom est diminuée de moitié, indiquant que la diminution de la proportion d'épines mushroom est due à la diminution de leur nombre ; et la densité absolue des épines fines est augmentée, indiquant que l'augmentation de la proportion des épines fines est due à une augmentation de leur nombre (données non montrées).

Ces résultats indiquent que la quantité de CHMP2B est un facteur limitant pour la formation d'épines avec des têtes larges ; et que les mutants de CHMP2B agissent comme des dominants négatifs en égard de la fonction de CHMP2B dans la spinogenèse.

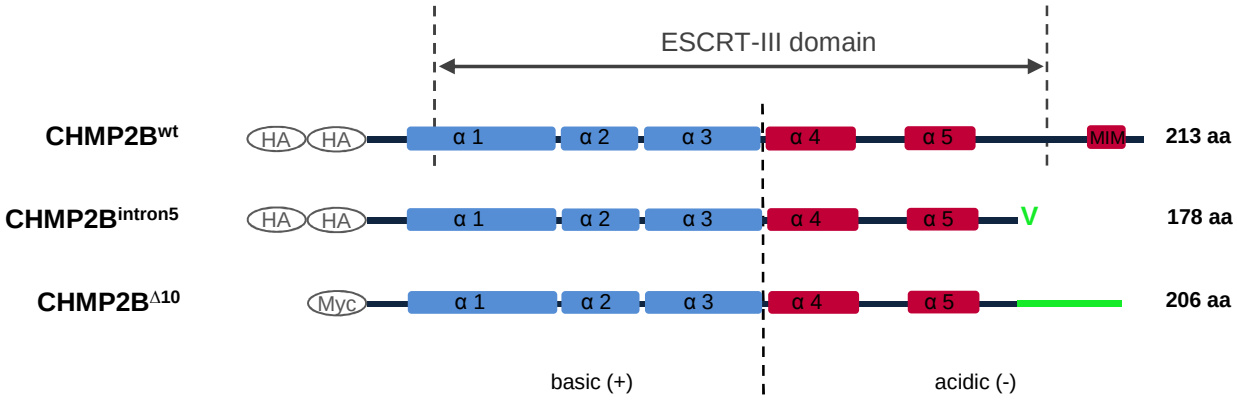


Figure 1 : Primary structure of CHMP2B constructs used in this study .The ESCRT-III domain is the conserved sequence domain common to all members of the Charged Multivesicular body Proteins (CHMP 1-7) superfamily. Positively (blue) and negatively (red) charged alpha helices (1 to 5) are located along the sequence according to the 3D structure of CHMP3 (Muziol, 2006). MIM: MIT (Microtubule Interacting and Transport domain) Interacting Module, required for binding to the SKD1/Vps4 ATPase responsible for dissociation of CHMP polymers. V: a single valine residue replaces the normal C terminus in CHMP2Bintron5. The green line in CHMP10 indicates the aberrant C terminus carried by this mutant. Ellipses indicate tags fused to the N terminus.

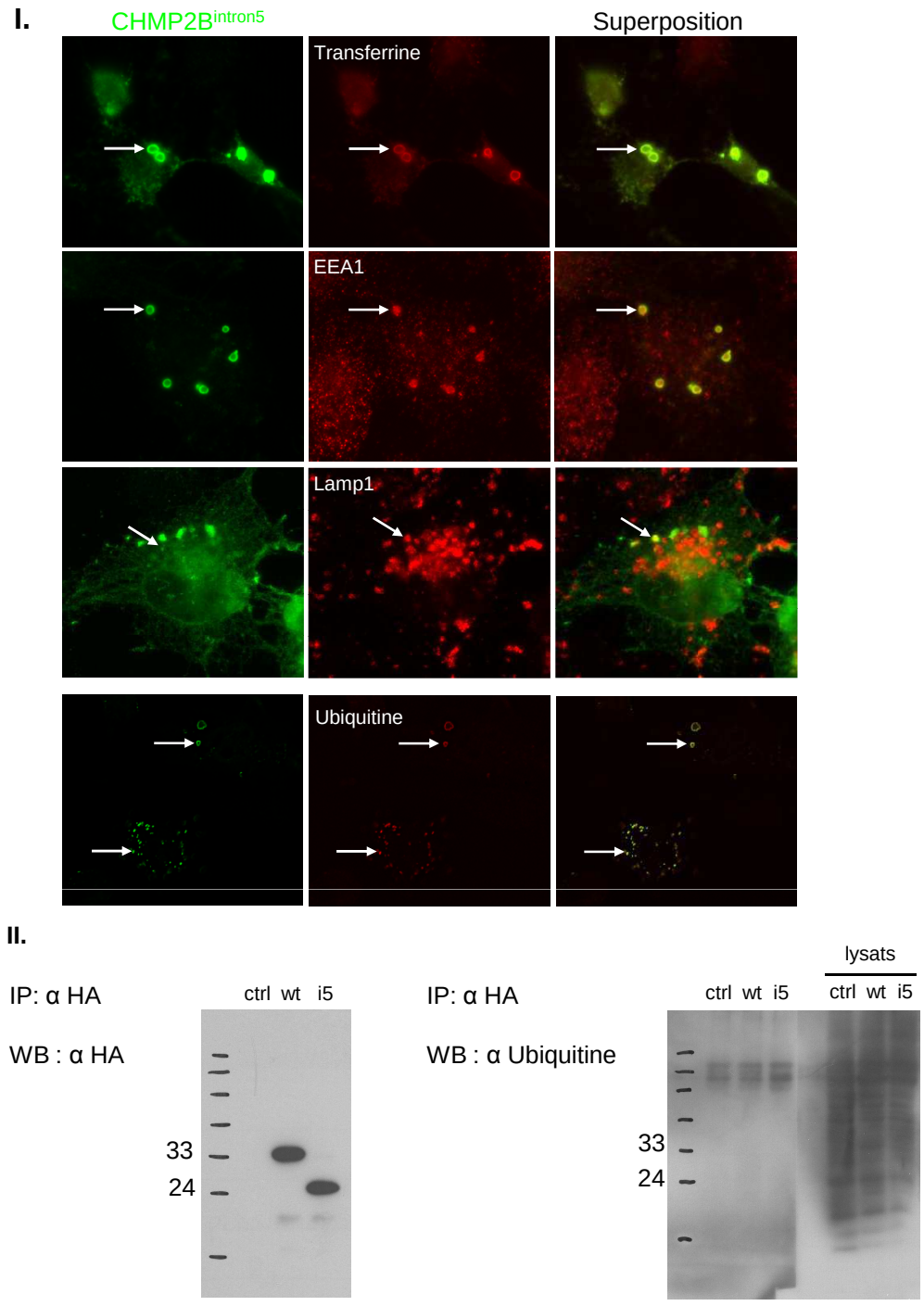


Figure **B** : **Formation d'endosomes aberrants par CHMP2B^{intron5} dans des BHK.**

I. Immunomarquage de CHMP2^{intron5} avec un anti-HA, panneaux de gauche. Les cellules ont été incubées avec de la transferrine couplée à l'Alexa-594 (endosomes de recyclage) ou marquées avec un anti-EEA1 (endosomes précoces), un anti-LAMP1 (endosomes tardifs), et un anti-ubiquitine. Les flèches indiquent les colocalisations. **II**. Immunoprécipitation de CHMP2B^{wt} et CHMP2B^{intron5} à partir de cellules BHK, par l'anticorps anti-HA, vérifiée par l'anticorps anti-HA (gauche). Les immunoprécipitats et les lysats sont sondés avec l'anticorps anti-ubiquitine (droite).

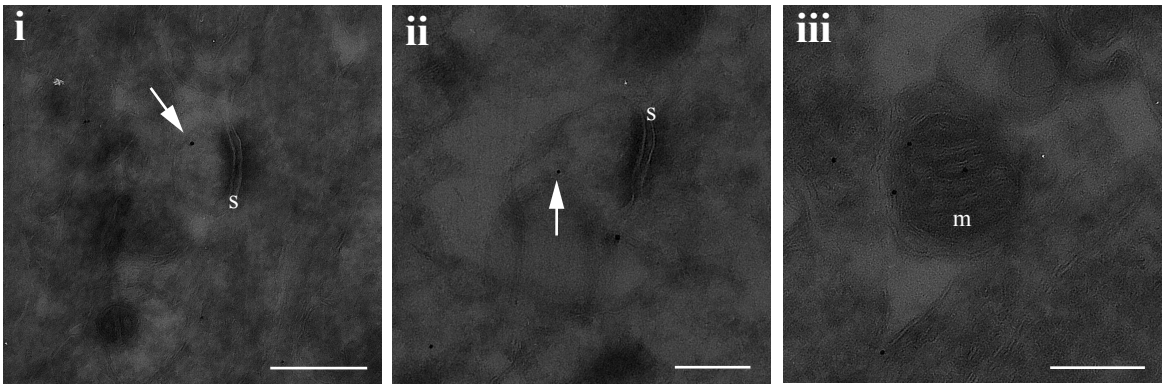


Figure C : Double marquage immunoélectronique anti-CHMP2B de la région CA1 de l'hippocampe de cerveau de souris.

Particules d'or de 15 nm : anti-CHMP2B AbCam, de 10 nm : notre anti-CHMP2B. i et ii : épines dendritiques (s : synapse), iii : mitochondrie (m). Echelle : 250 nm.

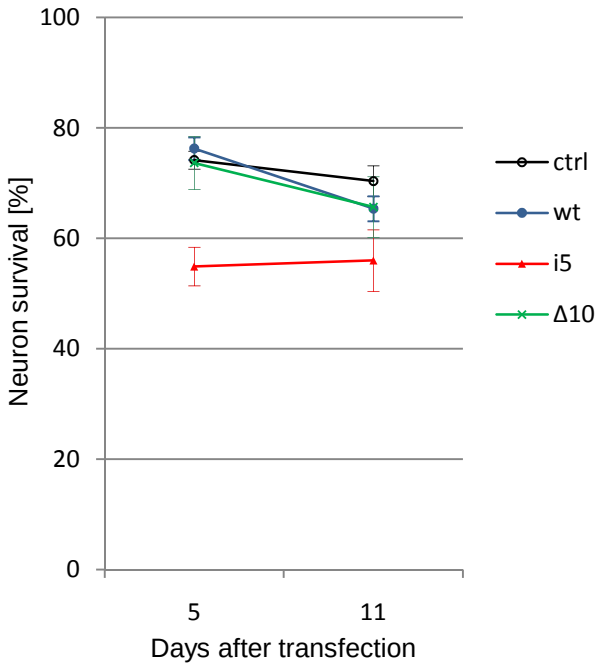


Figure S2 : Survival of hippocampal neurons after transfection of CHMP2B mutants.

Neurons were co-transfected at 10 DIV with the indicated plasmids, together with mCherry. For each plasmid, coverslips from the same transfected dish were fixed and examined by fluorescence microscopy at 15 and 21 DIV (a mean of 85 neurons were analysed by condition). Transfected neurons were visualised by mCherry fluorescence, and scored as healthy or dying/dead based on the absence or presence of morphological signs of degeneration (neuritic varicosities or retractions, “exploded” corpses). The percentage of surviving cells among transfected neurons was calculated at each time point. Error bar : S.E.M.

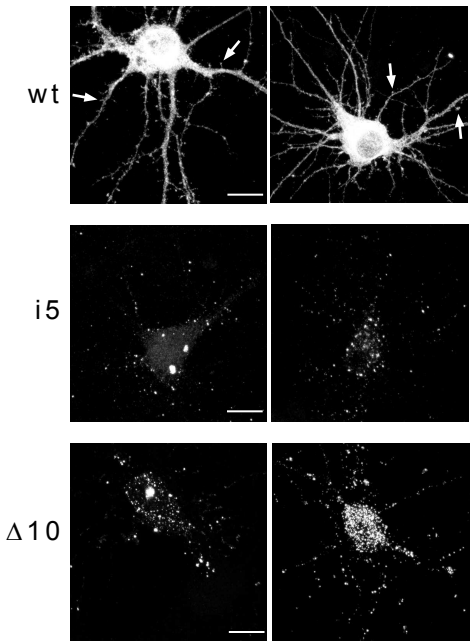


Figure S1: Subcellular localization of tagged CHMP2B proteins.
Neurons were transfected with the indicated plasmids, and processed for immunofluorecence staining with anti-tag antibody. Maximal intensity projections of confocal image stacks are shown. Two representative cells are shown for each plasmid. Top: $CHMP2B^{wt}$ diffuses throughout the entire neuron, including the heads of dendritic spines (arrows). Middle: $CHMP2B^{intron5}$ forms multiple small clusters in the soma and dendrites, and occasional larger aggregates. Bottom: $CHMP2B^{\Delta 10}$ has a clustered distribution similar to that of $CHMP2B^{intron5}$. Scale bar : 10 µm.

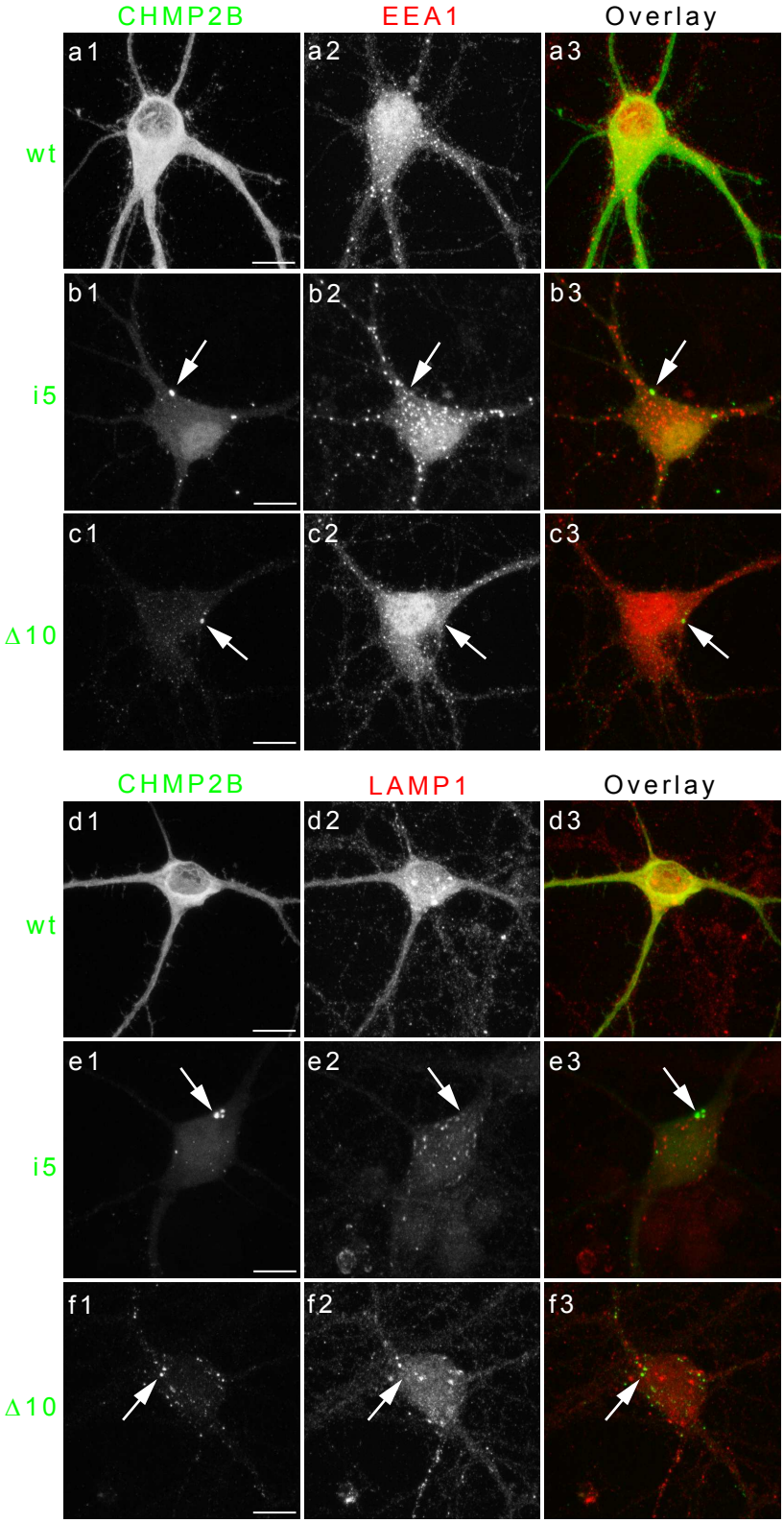


Figure 2 : Subcellular distribution of exogenously expressed CHMP2B proteins in hippocampal neurons, and comparison with endosomal markers. The neurons were doubly stained with monoclonal anti-tag antibody (a1-f1) together with polyclonal antibody against the respective marker (a2-f2), as indicated. Immunofluorescence was recorded by dual-channel confocal microscopy. Maximal intensity projections of confocal image stacks are shown. Arrows indicate CHMP2B puncta. Note that they do not coincide with EEA1 (a2-c2) or LAMP1 (d2-f2) puncta. Scale bar : 10 µm.

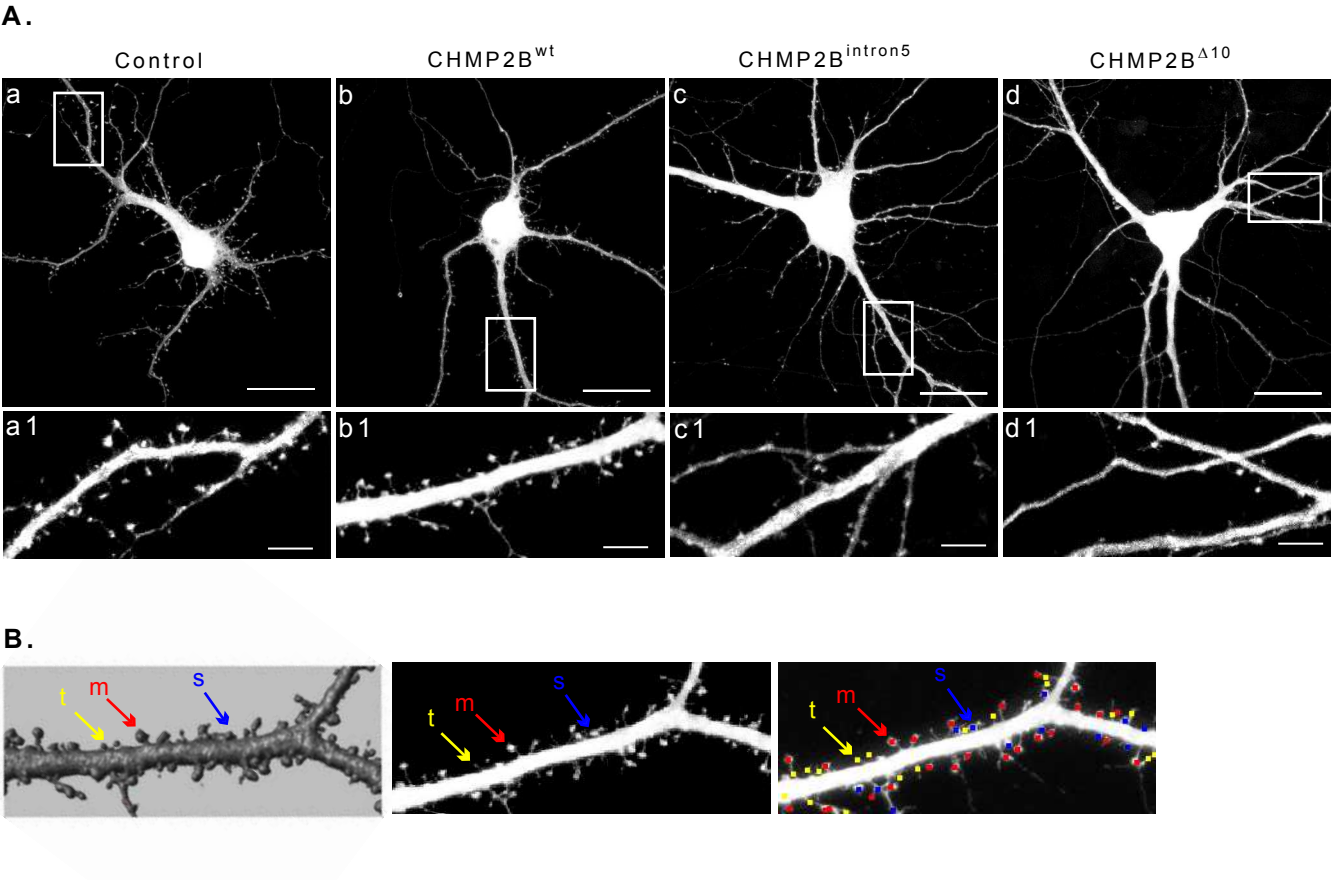


Figure 3 : Detection and classification of dendritic spines in transfected hippocampal neurons. A: neurons were co-transfected with the indicated constructs, together with mCherry, fixed 5 days later, and images of mCherry fluorescence were acquired by confocal microscopy. The figure shows maximal intensity projections of confocal image stacks. Control: empty pcDNA3 vector. The boxed regions in a-d (scale bar : 10µm) were scanned at higher magnification in a1-d1 (scale bar : 5µm). B: stacks of optical slices acquired in A served to generate 3D models of the dendrite, using the surface-defining Ray Burst algorithm implemented in NeuronStudio (Rodriguez, 2006). The dimensions of the modeled structures were automatically measured as described by (Rodriguez, 2006), and used to identify and classify spines. Left: surface rendering of a segment from the dendrite shown in b1. Middle: maximal intensity projection of optical sections from the same segment. Right: automated spine detection and classification. Appropriately coloured dots are superimposed onto the spines. Yellow (t): thin spines; red(m): mushroom spines; blue (s): stubby spines.

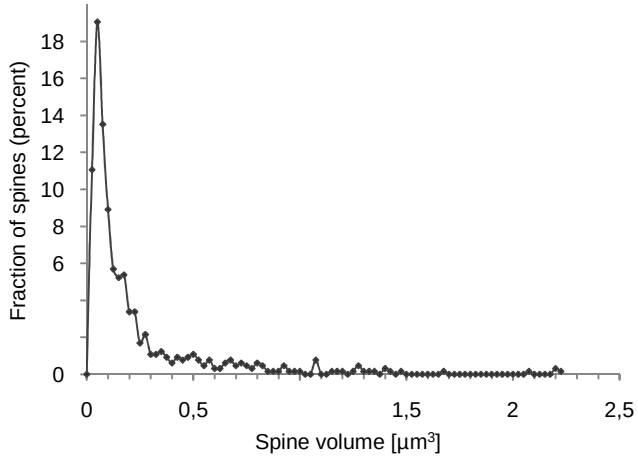


Figure S4 : Distribution of spine volumes in a typical control neuron transfected with mCherry (n=652 spines).

Serial optical sections were acquired and used as input for NeuronStudio to reconstruct a 3-dimensional model of dendritic segments and attached spines. Spine volumes were estimated from the number of voxels retained for each modeled spine.

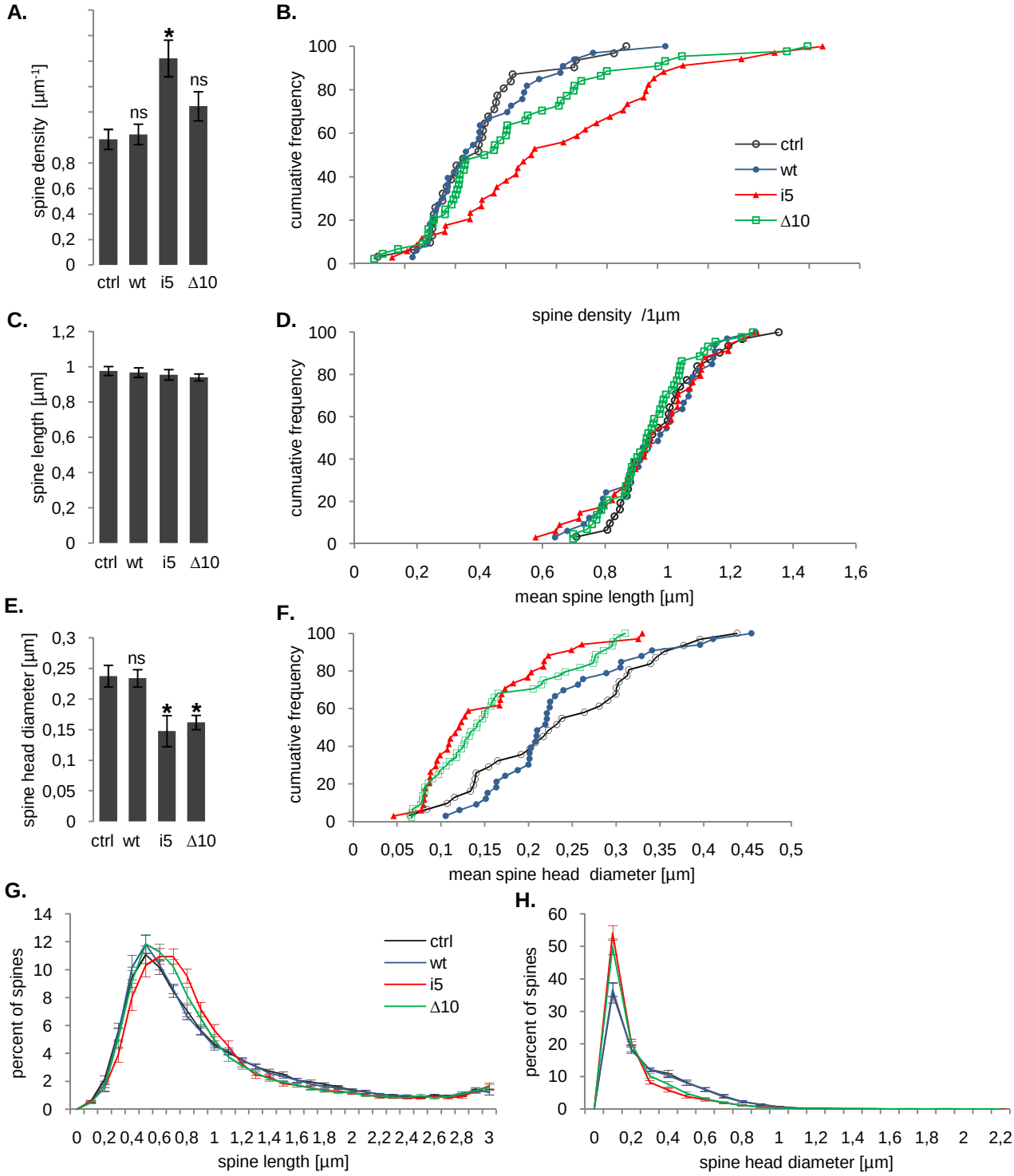


Figure 4 : Effects of FTD-linked CHMP2B mutants on the density and dimensions of spines.

All parameters were measured on the same sets of spines. Ctrl: control plasmid (n=31 neurons); wt: wild-type CHMP2B (n=33 neurons); i5: CHMP2B^{intron5} (n=34 neurons); Δ10: CHMP2B^{Δ10} (n=44 neurons). Measurements were obtained from 700-1500 µm dendrite and 600-1200 spines per neuron (interquartile range).

A: Mean spine counts per µm dendrite (+/ S.E.M.) in neurons co-transfected with mCherry and the indicated plasmids. CHMP2B^{intron5} increases the total density of spines (ANOVA: F3,138 = 6.24, p = 0.0005; *post hoc comparison to control: p = 0.0005, Bonferroni's corrected t test). The increase caused by CHMP2B^{Δ10} remains non-significant (ns) with p=0.09. **B**: Cumulative frequency histogram of spine densities per neuron, corresponding to the dataset in A.

C: Mean length of spines per neuron, averaged over the respective neuron groups. No significant difference was observed. **D**: Cumulative frequency histogram of mean spine length per neuron, corresponding to dataset in C.

E: Mean diameter of spine heads per neuron, averaged over the respective neuron group. Both mutants cause a shrinkage of spine heads (ANOVA: F3,138 = 6.24, p=0.000001; *p=0.0005 for both mutants). **F**: Cumulative frequency histogram of mean spine head diameters per neuron, corresponding to the dataset in E.

G: Normalized distribution of spine lengths per neuron. Spine length histograms obtained for each neuron (0.1 µm-wide bins) were normalized to 100 total counts. The distribution shows the mean normalized values of each bin, for the respective neuron group. Error bars: S.E.M. for each bin. **H**: normalized distribution of spine head diameters per neuron. Spine diameter histograms obtained from each neuron were normalized and averaged as in F. Note the coincidence of the control and wild-type distributions, and that of the two mutant distributions.

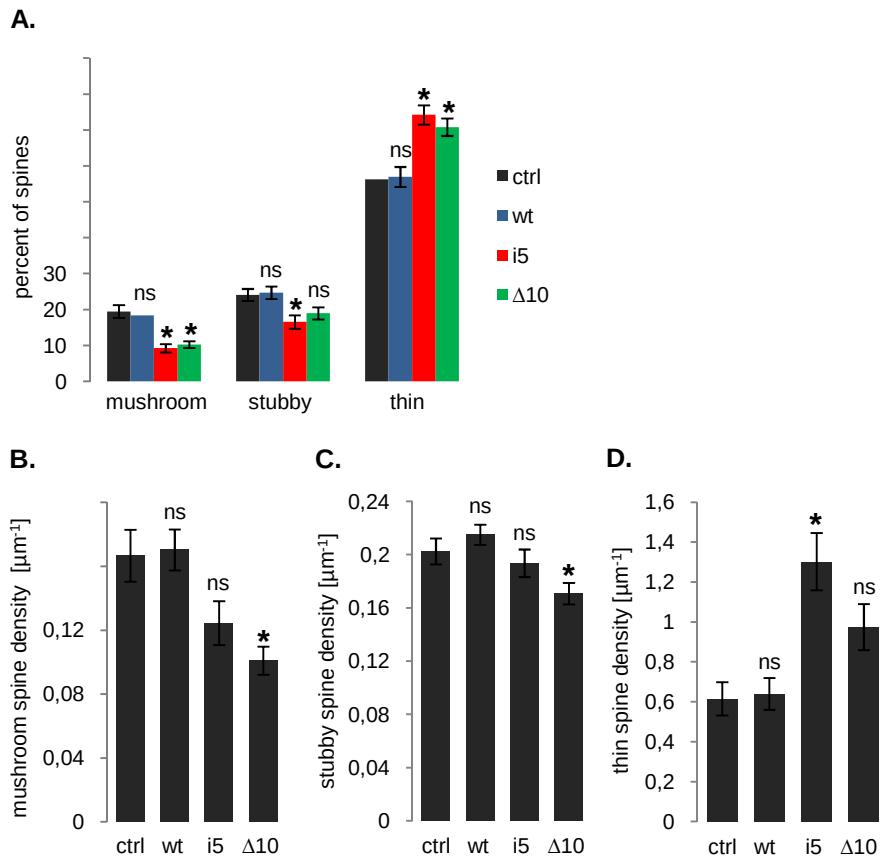
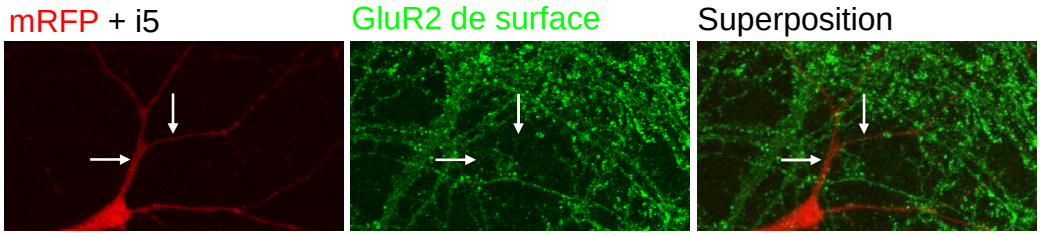


Figure 5 : Effects of FTD-linked CHMP2B mutants on the morphological type of spines.

A: Mean percentages per neuron (+/- S.E.M.) of mushroom-like, stubby and thin morphologies among spines identified in the neurons of Fig. 4. Both mutants potently reduce the mushroom spine fraction (ANOVA, $F_{3,135} = 14.96$, $p<0.000001$; *$p<0.000001$ for both mutants vs. control). CHMP2B^{intron5} also reduces the fraction of stubby spines (ANOVA, $F_{3,135} = 4.30$, $p=0.01$; *$p=0.005$ vs. control; $p=0.09$ for CHMP2B$^{\Delta 10}$). Conversely, both mutants increase the thin spine fraction (ANOVA, $F_{3,135} = 10.11$, $p=0.000005$; *$p=0.0001$ for both mutants vs. control).

B-D: Mean spine counts (+/- S.E.M.) per µm of dendrite for the three spine types. **B**: CHMP2B$^{\Delta 10}$ strongly lowers the density of mushroom spines (ANOVA: $F_{3,138}=7.48$, $p=0.0001$; *$p<0.001$ vs. control); the decreasing effect of CHMP2B^{intron5} remained below significance ($p=0.05$ vs. control, Bonferroni-corrected alpha = 0.017). **C**: CHMP2B$^{\Delta 10}$ moderately lowers the density of stubby spines (ANOVA: $F_{3,138}=4.76$, $p=0.0001$; *$p=0.014$ vs. control); CHMP2B^{intron5} has no effect ($p=0.5$). **D**: CHMP2B^{intron5} potently increases the density of thin spines (ANOVA: $F_{3,138}=7.84$, $p=0.00007$; *$p=0.0003$ vs. control); the effect of CHMP2B$^{\Delta 10}$ is not significant ($p=0.1$).

I.



II.

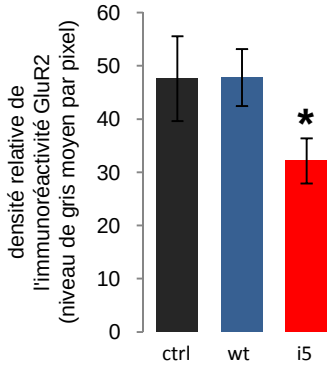


Figure D : Expression de surface de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA dans des neurones d'hippocampe de rat en culture.

I. Immunomarquage de GluR2 avec un anticorps anti-GluR2, dans des neurones co-exprimant la protéine cytosolique monomérique rouge (mRFP) et le mutant CHMP2B^{intron5} depuis 24h. Projection des maxima d'une pile d'images acquise au microscope confocal. **II**. Quantification de l'immunofluoresence de GluR2 dans des neurones exprimant un contrôle (le pcDNA vide, n = 4), la forme CHMP2B de type sauvage (wt, n = 13) et le mutant CHMP2B^{intron5} (n = 10), test t par rapport à CHMP2B^{wt} , p = 0,02.

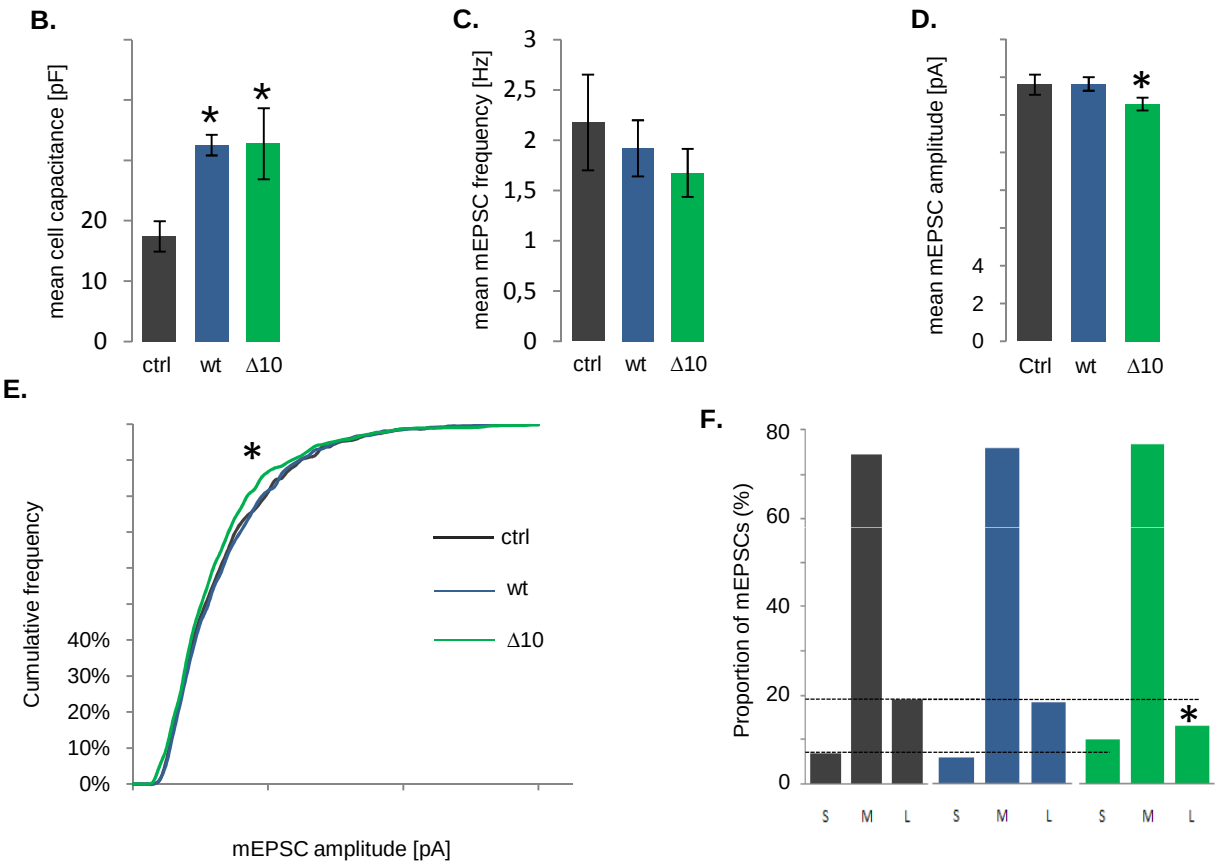


Figure 6: Electrophysiological effects of wild-type and mutant CHMP2B.

A: Representative sample traces from patch-clamp recordings of mEPSCs in neurons co-transfected with GFP and control plasmid (left), CHMP2Bwt (middle), and CHMP2B $^{\Delta 10}$ (right). **B**: Mean membrane capacitance (+/- S.E.M.) measured in neurons transfected with control plasmid (n=5), CHMP2B^{wt} (n=6), and CHMP2B$^{\Delta 10}$ (n=7). Expression of both CHMP2B^{wt} and CHMP2B $^{\Delta 10}$ significantly increased capacitance; however, the variance of capacitance measurements in CHMP2B $^{\Delta 10}$ transfected cells was much larger than in the other two conditions, precluding the use of ANOVA in this case (Kruskal-Wallis: H=7.78, p=0.02; *post hoc Mann-Whitney U test with Bonferroni's correction: p<0.0001 for CHMP2B^{wt} vs. control, p=0.01 for CHMP2B $^{\Delta 10}$ vs. control). **C-E**: Miniature excitatory currents were recorded from transfected neurons under voltage clamp in the whole-cell configuration, in the presence of tetrodotoxin and D-APV to isolate AMPA receptor-mediated spontaneous synaptic currents (control: n=4 cells; CHMP2B^{wt} : n=6 cells; CHMP2B$^{\Delta 10}$: n=6 cells). Single sample traces containing equal numbers of mEPSCs were randomly chosen for each neuron. **C**: The mean frequency of mEPSCs per neuron was calculated from inter-event intervals. No significant difference was observed (ANOVA: F2,13=0.47, p=0.6). **D**: Mean amplitude of mEPSCs pooled from equivalently transfected neurons (control: n=516 events; CHMP2B^{wt}: n=768 events; CHMP2B$^{\Delta 10}$: n=768 events). The overall variation of mean amplitude as a function of transfected plasmid was significant (ANOVA: F2,2049 = 3.04, p=0.048); the specific difference between the means of CHMP2B$^{\Delta 10}$ and control was barely below threshold (*p=0.026 with Bonferroni-corrected alpha=0.025). **E**: Cumulative frequency histogram of mEPSC amplitudes; same dataset as in D. * indicates significant reduction in the top quintile in the case of CHMP2B $^{\Delta 10}$ (see text and panel F). **F:** Histogram of mEPSC amplitudes showing the specific reduction in the proportion of large currents and the increase in small currents. S, i < 5 pA; M, 5 ≤ i ≤ 20 pA; L, i > 20 pA. The two dashed lines refer to the respective proportions of large and small currents in the control neurons. The distributions differed as a function of transfected plasmid (χ^2 = 18.64, p=0.001). *p<0.05 for CHMP2B $^{\Delta 10}$ vs. control (Marascuilo's post hoc χ^2 test).

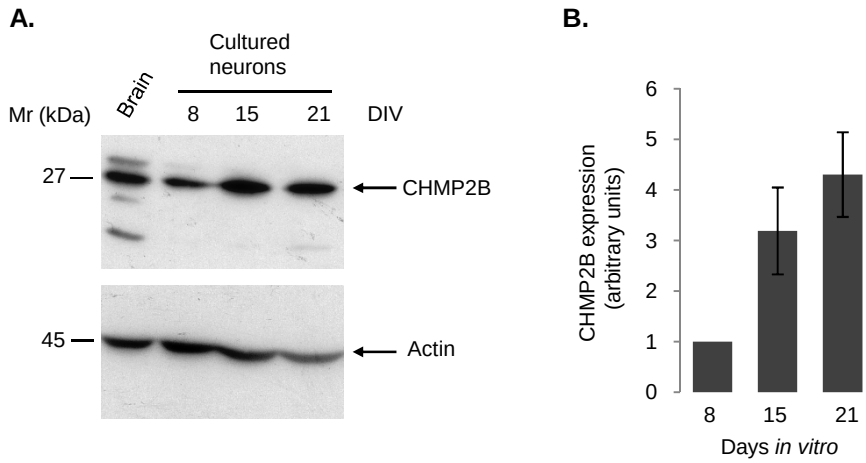


Figure S5: Endogenous CHMP2B increases during neuronal maturation in culture.

Sister cultures of hippocampal neurons maintained in plastic dishes were lysed at the indicated timepoints. The lysates were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western immunoblotting with anti-CHMP2B antibody. The blots were reprobed with anti-actin antibody to normalize for loading error. **A**: Luminograph of a representative blot. Leftmost lane: rat brain lysate, showing the pattern of CHMP2B in vivo. **B**: The luminographs were scanned and the optical density of the CHMP2B band was measured in grey levels for each lane. Band intensities were normalized by dividing each value by the intensity of the actin band in the same lane. Care was taken to obtain immunodetection in the linear range. The graph shows mean normalized intensities at 3 timepoints (n=3 cultures). Error bar: S.E.M.

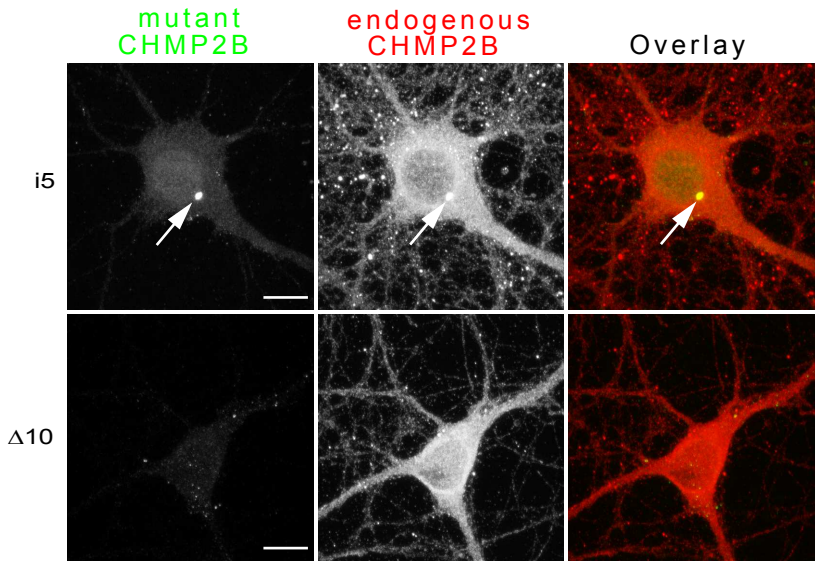


Figure S6 : Recruitment of endogenous CHMP2B by CHMP2B^{intron5} clusters.

Neurons were transfected with the indicated plasmids in the same conditions as above, and processed for double immunofluorescent staining with anti-tag monoclonal antibody and anti-CHMP2B antibody. (The polyclonal anti-CHMP2B antibody reacts with the C terminus of the protein, which is lacking in the mutants). Maximal intensity projections of confocal image stacks are shown. Arrow : a lonely dot of clustered CHMP2B^{intron5} co-localizes with an unusual punctuate accumulation of endogenous CHMP2B. Such co-localization cases were not seen with CHMP2B$^{\Delta 10}$. Scale bar : 10 µm.

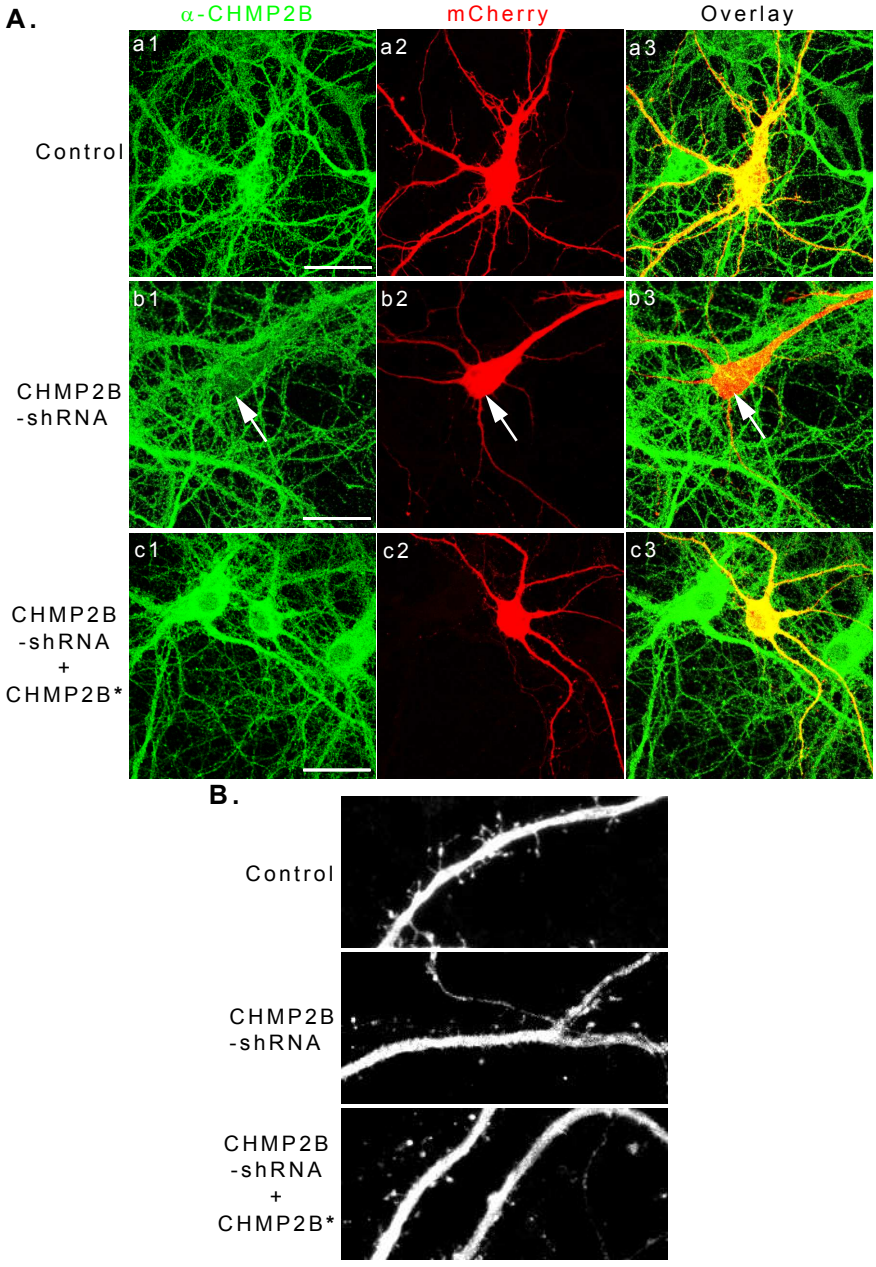


Figure 7 : Analysis of spines in neurons depleted from endogenous CHMP2B.

A: Neurons were transfected at 10 DIV with the plasmids indicated on the left, fixed at 15 DIV, and stained with anti-CHMP2B antibody and Alexa488-labelled secondary antibody. Confocal images were acquired in both the Alexa488 and mCherry channels. Maximal intensity projections of confocal image stacks are shown. Control: empty pSUPER-mCherry vector. CHMP2B*: native CHMP2B cDNA with silent mutations at the siRNA target site. Note the drop in immunofluorescence in the shRNA-expressing neuron (arrow), compared to surrounding cells; and the decreased green vs. red ratio (orange hue), compared to control or rescued cells. Scale bar: 10 µm. **B**: Maximal intensity projections of image stacks, showing representative dendritic segments visualized by mCherry fluorescence in neurons transfected with the indicated plasmids.

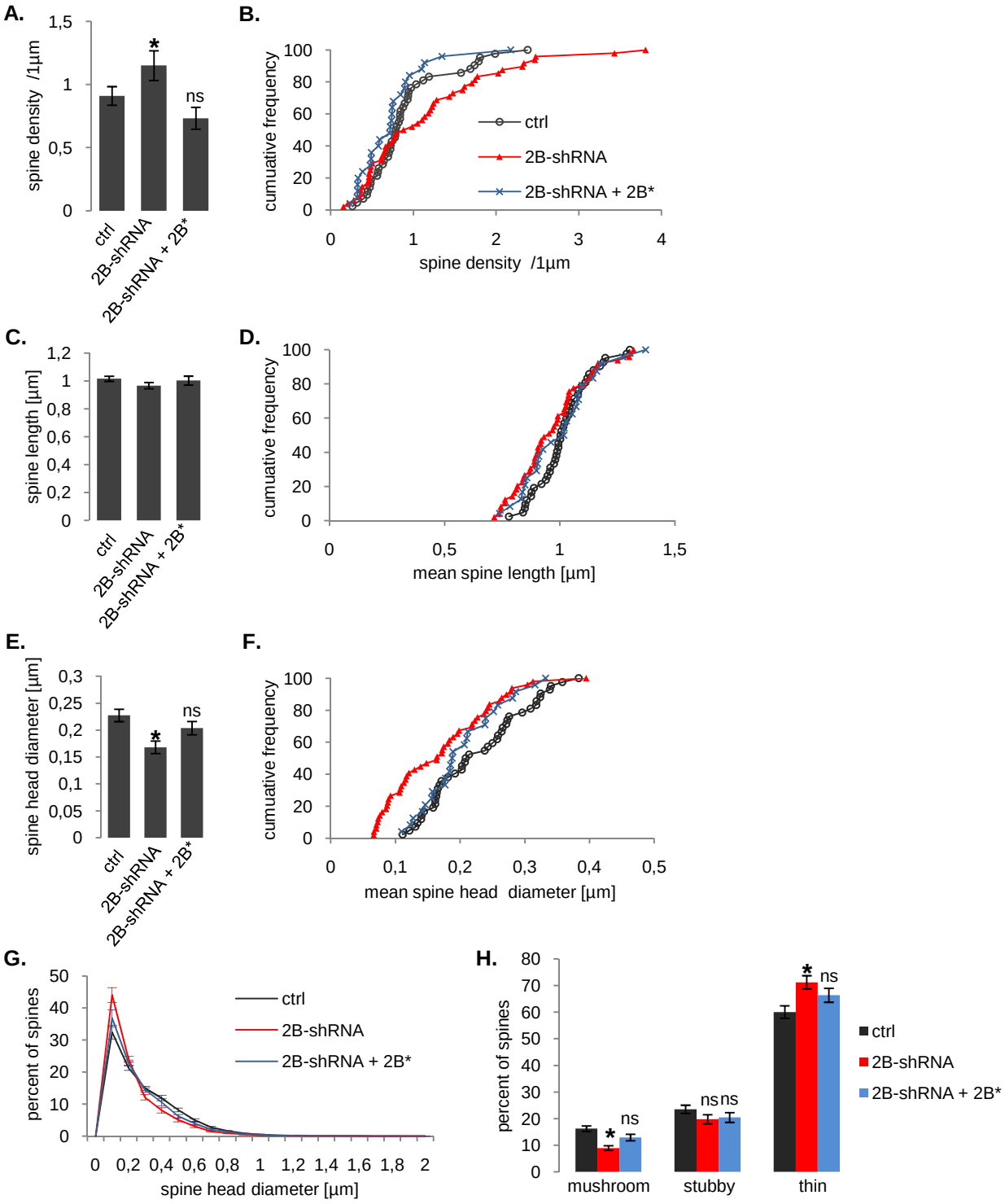


Figure 8: Effects of CHMP2B depletion on the density and morphology of dendritic spines.
All parameters were measured as in Figs. 3 and 4. Ctrl: n=42 cells; shRNA: n=48 cells; shRNA together with rescuing CHMP2B: n=25 cells. **A**: The mean density of spines varied as a function of CHMP2B depletion (ANOVA: F 2,112 = 3.80, p = 0.025) although pairwise differences with control remained below significance (*p=0.021 vs. rescued cells). **B**: cumulative frequency histogram of spine densities per neuron (normalized in percent), same data as in A.
C: CHMP2B depletion had no effect on the mean spine length per neuron. **D**: Cumulative frequency histogram of spine lengths.
E: Mean spine head diameter per neuron. The CHMP2B shRNA induces a highly significant decrease (ANOVA: F 2,112 = 7.23, p=0.001; *p<0.001 vs. control) which is rescued by re-expression of CHMP2B (ns, p=0.19 vs. control). **F**: Cumulative frequency histogram of spine head diameters.
G: Normalized distribution of spine head diameters. Note the superposition of “control” and “rescued” curves, and the recovery of larger spines in the “rescued” profile. **H**: proportions of basic spine types. The CHMP2 shRNA potently decreases the mushroom spine fraction (ANOVA: F 2,104=16.45, p<0.000001; *p<0.001 vs. control) and the effect is suppressed in the rescued cells (ns, p=0.028 vs. control, alpha = 0.017).

Neurobiology of disease

Impaired dendritic spine maturation induced by dominant negative activity of CHMP2B mutants linked to Fronto-temporal dementia

Running title: FTD-linked CHMP2B mutants affect dendritic spines

Agnès Belly[1,2], Gilles Bodon[1,2], Béatrice Blot[1,2], Alexandre Bouron[3], Rémy Sadoul[1,2], Yves Goldberg[1,2,3]

(1) INSERM, Research Centre U836, Grenoble Institute of Neurosciences, F-38042 Grenoble, France; (2) Université Joseph Fourier, Grenoble Institute of Neurosciences, F-38042 Grenoble, France; (3) CEA Grenoble, iRTSV, F-38054 Grenoble, France

Address correspondence to:
Yves Goldberg, Grenoble Institute of Neurosciences, Equipe 2
Temporary address : MRC Centre for Synaptic Plasticity, Dept. of Anatomy, School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD, UK
E-mail : yves.goldberg@ujf-grenoble.fr
Phone: +44 117 331 1901

Alternative phone : +44 1225 789 345

8 figures, supplemental material : 6 figures, text : 35 pages

Abstract : 250 words ; introduction : 499 words ; discussion : 1496 words

Keywords: ESCRT, FTLD, neurodegeneration, synapse, spine head, NeuronStudio

Acknowledgments: A. B. was supported by the Fondation France Alzheimer. G. B. was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Work funded by INSERM, Université Joseph Fourier and Fondation France Alzheimer.

Abstract

Fronto-temporal dementia (FTD) is a common neurodegenerative disease in which monogenic autosomal inheritance plays an important role. In the rare variant FTD-3, the disease is linked to dominant mutations in CHMP2B, a subunit of the highly conserved ESCRT-III complex. ESCRT-III is responsible for deformation and cleavage of cellular membranes during endosomal trafficking and other processes. In transfected cortical neurons, one of the FTD-linked CHMP2B mutants perturbs endosomal function and autophagy, and induces rapid cell death. However, it is not clear whether these properties account for the specificity and duration of FTD pathogenesis. The possibility that deregulated CHMP2B activity may specifically affect neuronal functions has not been examined. Here, using confocal microscopy and reconstruction of dendrite morphology, we investigate the possible impact of mutant CHMP2B expression and endogenous CHMP2B depletion on dendritic spines. In cultured hippocampal neurons, the FTD-linked mutants CHMP2B^{intron5} and CHMP2B$^{\Delta 10}$ caused a striking decrease in the proportion of large spines with mushroom morphology. CHMP2B^{intron5} increased the absolute density of thin spines, while CHMP2B$^{\Delta 10}$ lowered that of large spines. In keeping with these results, CHMP2B$^{\Delta 10}$ induced a drop in the proportion of large currents among spontaneous EPSCs. Mutant proteins formed apparently non-endosomal clusters and their effects were not associated with cell death. Depletion of endogenous CHMP2B by RNAi resulted in morphological changes which were very similar to those induced by mutant CHMP2B, and which could be largely suppressed by co-expression of rescuing protein. Thus, mutant CHMP2B displays dominant negative activity toward a novel function of CHMP2B in spine morphogenesis.

Introduction

Fronto-temporal dementias (FTDs) are the second most prevalent type of neurodegenerative dementias after Alzheimer's disease. A significant proportion of FTDs are inherited, with pathologically distinct forms of the disease being linked to different genes (Pickering-Brown, 2007; van der Zee et al., 2008a). In the rare variant FTD-3, the disease was shown to co-segregate with dominant mutations in CHMP2B (Charged Multivesicular body Protein 2B), a subunit of ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III) (Skibinski et al., 2005; van der Zee et al., 2008b). Understanding how defects in this highly conserved protein specifically lead to cortical degeneration may shed light on fundamental mechanisms of normal and pathological neurobiology.

ESCRT -0 to III are a set of ubiquitous cytoplasmic protein complexes that sequentially drive the traffic of down-regulated, ubiquitinated membrane proteins to the lumen of late endosomes and, hence, lysosomes (Hurley and Emr, 2006; Slagsvold et al., 2006). ESCRTs are also necessary for release of viruses at the plasma membrane (von Schwedler et al., 2003), and cytokinesis at the end of mitosis (Carlton and Martin-Serrano, 2007). In all these processes, the transient assembly of ESCRT-III filaments on membranes is thought to deform the latter into narrow tubes evaginating from the cytoplasm, until tubes are cleaved (Muziol et al., 2006; Hanson et al., 2008; Lata et al., 2008; Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009). All ESCRT-III subunits contain a conserved oligomerisation domain, auto-inhibited by a regulatory C-terminal region which can also recruit targeting or disassembly factors (Muziol et al., 2006; Stuchell-Brereton et al., 2007; Bajorek et al., 2009). In Danish FTD-3, a single point mutation occurs at the splice acceptor site of CHMP2B exon 6 and generates two distinct aberrant transcripts, CHMP2B^{intron5} and CHMP2B$^{\Delta 10}$, both of which encode mutants with a defective C terminus (Skibinski et al., 2005) (see Fig. 1). In transfected cells, both mutants form insoluble polymers, often coating endosomes (Skibinski et al., 2005). In cultured cortical neurons, CHMP2B^{intron5}, but not CHMP2B$^{\Delta 10}$, caused retraction of dendritic arbors and subsequent cell death; CHMP2B^{intron5} also induced a build-up of autophagosomes and aggregates of ubiquitinated material (Lee et al., 2007). Based on these results, FTD-3 has been proposed to arise from neuron death, following the blockade of autophagy by CHMP2B^{intron5} interfering with normal ESCRT-III activity (Filimonenko et al., 2007; Lee et al., 2007; Lee and Gao, 2009). As CHMP2B$^{\Delta 10}$ too is able to perturb autophagy in HeLa cells (Filimonenko et al., 2007), its lack of neuronal toxicity may be due to different stability and

dosage (Lee et al., 2007). However, the tissue specificity and decade-long course of FTD-3 pathogenesis suggests that mutant CHMP2B proteins may initially perturb neuron-specific processes. In particular, given its role in endosomal traffic and plasma membrane deformation, ESCRT-III assembly may control aspects of synaptic biology. Here, we examine the possible impact of CHMP2B mutants and CHMP2B deficiency on the development of dendritic spines. We show that the density and morphology of spines are potently modified in very similar fashion by CHMP2B^{intron5}, CHMP2B$^{\Delta 10}$ and depletion of endogenous CHMP2B.

Materials and Methods

Plasmids and antibodies. The mCherry plasmid was a kind gift from P. Dournaud (INSERM, Paris). The LC3-GFP plasmid was a kind gift from T. Yoshimori (National Institute of Genetics, Mishima, Japan). The GFP plasmid was pEGFP-C1 (Clontech). The wild-type human CHMP2B cDNA was cloned from HeLa cells by RT-PCR, fused to an N-terminal dimeric HA tag, (primer pair :
5'CTCTCGAGGCCACCATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTACCCATACG
ACGTCCCAGACTACGCTGCGTCCCTCTTCAAGAAGAA 3' and
5'TACTCGAGCTGCAGTCACTAATCTACTCCTAAAGCCTTGAGT 3').

The CHMP2B^{intron5} mutant cDNA was amplified from the same cDNA preparation, using an alternate rearward primer (5' TACTCGAGTCACACCTTTCCAGAAATTTCAAT 3'). The two cDNAs were subcloned in pcDNA3.1 between the XhoI sites. To obtain the CHMP2B$^{\Delta 10}$ cDNA, the C-terminal part was first synthesized in vitro using megaprimers (5' ATGCCCAGGATATTGTGAATCAAGTTCTTGATGAAATTGGAATTGAAATTTCTGG
AAAGGTGTTGCACCAACTTCTAGAAGCTTACC 3' and 5'
TAATCTTGAATTGCCATTTAGACGCTTCATCTGTGATGTAGACGTTGTAGTAAAGG
TAAATGGTAAGCTTCTAGAAGTTGGTGCAAC 3') and then fused with the CHMP2B^{intron5} cDNA. The cDNAs was subcloned in pcDNA3.1 between the EcoRV and et NotI sites. The pSuper-mCherry plasmid was constructed by removing GFP from pSuper-Neo-GFP (Oligoengine) and replacing it with mCherry. The shRNA targeted the rat CHMP2B sequence at positions 578-596 (5' GACACTACAAACAATGCAG 3') according to (Lee et al., 2007), and the encoding oligonucleotide was cloned between the Hind III and Bgl II sites of pSuper-mCherry. The RNAi resistant CHMP2B cDNA was generated by introducing four silent mutations in the target sequence (yielding 5' GACGTTACAGACGATGCAA 3') by

means of the Quick-Change mutagenesis kit (Stratagene). All plasmids were verified by sequencing (Cogenics, Meylan, France) and initially tested in transfected BHK cells by immunoblotting and immunofluorescence with anti-tag antibody. The following polyclonal antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK): anti-CHMP2B (ab33174), anti-EEA1 (ab2900), anti-LAMP1 (ab24170). Anti-HA tag antibody was from Cell Signaling Technology (Beverly, Massachussets); anti-myc tag antibody from Santa Cruz (California); and anti-actin antibody from Chemicon.

Neuron culture and transfection. Primary cultures of hippocampal neurons were prepared according to a modification of the procedure described in (Banker and Goslin, 1998). Handling and sacrifice of animals were in conformity with European law (EEC Directive n°86 / 609) and the internal regulations of INSERM. Hippocampi were dissected out from E19 rat embryos and collected in HBSS containing 5 mM glucose and 10 µg/ml penicillin and streptomycin (dissection medium). The medium was replaced 0.05% trypsin- 0.5 mM EDTA (Invitrogen) and hippocampi were digested for 15 min at 37°C. After removing the trypsin, hippocampi were washed in dissection medium, and incubated in the same medium containing trypsin inhibitor (2mg/ml, Sigma) and DNAseI (0.05%, Sigma) for 3 minutes at 37 °C. Hippocampi were washed in dissection medium, taken up in 1 ml of medium and gently triturated by passing through a blue Gilson tip. Cells were counted and seeded at a density of 12000 per cm^2 onto acid-washed glass coverslips (13 mm diameter, Marienfeld, Germany) that had been precoated with 50 µg/ml poly-D-lysine (Sigma) and placed in 35 mm culture dishes (Nunc) in plating medium (DMEM medium (Invitrogen) containing 10% heat-inactivated horse serum (Invitrogen)). The cultures were left to attach at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% and air 5% CO_2. After 2 h, the plating medium was replaced with serum-free Neurobasal containing 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 µg/ml penicillin and streptomycin, and 2% B27 supplement (Invitrogen) (culture medium). After 4 days, cytosine arabinoside (Sigma, 5 µM final concen.) was added to suppress glial cell proliferation. Cultures were fed once a week by adding half a volume of fresh medium. For transfection, all plasmids were purified using the Endotoxin-free purification kit (Quiagen, Hilden, Germany). The conditioned culture medium was removed and saved and coverslips were placed in 2 ml Minimal Essential Medium (Invitrogen) containing 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 15 mM Hepes, and NaOH adjusted to pH 7.35. 0.5 µg CHMP2B plasmid (or control vector) was mixed with 2.5 µg mCherry, GFP, or LC3-GFP plasmid, diluted into 250 µl transfection medium, and combined with 1.5 µl of PlusReageant and then

4 µl Lipofectamine LTX (Invitrogen). The mixture was incubated for 25 min at room temperature, then added to the dishes, which were left to incubate at 37°C for 1h. The transfection solution was removed and the conditioned medium was returned to the dishes. 20-60 neurons per coverslip were usually transfected.

Fixation and immunostaining. The coverslips were rinsed in PBS and incubated for 8 min in PBS containing freshly prepared 4% p-formaldehyde and 4% sucrose at room temperature (RT). After 3-4 washes in PBS, the cells were permeabilised by incubating in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 10 min at RT. The coverslips were washed, incubated for 1h in PBS containing 2% Goat preimmune serum (GPI, Sigma) and 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma) and incubated for 1h in PBS containing 2% GPI, 1% BSA and 0.5-1 µg/ml antibody (or antibody mixture) at RT. Coverslips were washed in PBS (3x5min), and incubated with fluorescent secondary antibodies, labeled with Alexa488 or Alexa594 (Molecular Probes), in PBS containing 2% GPI and 1% BSA and 0.2 µg/ml antibody for 1h at RT. Coverslips were washed in PBS (3x5 min), then in water (3x5 min), gently dried, and mounted on slides in Mowiol medium (Calbiochem 475904). The specificity of immunofluorescence was routinely verified by staining control cultures that had been transfected with empty pcDNA vector (for anti-tag antibodies) or by omitting the primary antibody in control incubations. The specificity of CHMP2B antibody was further confirmed by RNAi-mediated extinction of immunofluorescence.

Microscopy. Images of fluorescent neurons were acquired with a Leica SP-E laser scanning confocal microscope equipped with a 100x Leica Neofluar objective with NA=1.3. Laser power was adjusted to maximize the dynamic range of each sample. For dual-colour samples, the adjustable spectral window of fluorescence collection was set for each channel with a singly coloured control sample, so that cross-contamination between channels was avoided. Stacks of 0.2 µm-spaced optical sections were acquired (averaging over 4 scans per pixel, 512 x 512 pixels) with the required electronic magnification. For spine analysis, any neuron showing signs of neuritic swellings or retraction was excluded. Dendritic segments located at approximately equivalent distances from the soma were selected, and each of those was scanned at 1.5x electronic zoom.

Image analysis. Image files were processed with Metamorph (Molecular Imaging). All figures show maximal intensity projections. For analysis of spines, serial image files corresponding to z-stacks of 20-30 optical sections per dendritic segment were directly processed with NeuronStudio, a software package dedicated to spine detection and analysis (Rodriguez et al.,

2006; Rodriguez et al., 2008) (http://www.mssm.edu/cnic/tools.html). Voxel size was 0.143 x 0.143 x 0.200 μm. The fluorescence threshold for inclusion in objects was dynamically set for each local sampling of the dendrite surface by the Isodata segmentation algorithm implemented in NeuronStudio. The seed location for automatic dendrite tracing was typically set near the base of a major proximal dendrite. At bifurcation points, the attach ratio was 1.5 and neurites shorter than 5 μm were not retained. After modeling of the dendrite surface, protrusions with a minimum volume of 5 voxels (0.020 μm^3), length comprised between 0.2 μm and 3 μm, and a maximal width of 3 μm were retained as spines. Following defaults settings of the program and the empirical classification rule defined by (Rodriguez et al., 2008), spines with minimum head diameter of 0.35 μm and minimum head vs. neck ratio of 1.1 were classified as mushroom spines. Non-mushroom spines with minimum volume of 10 voxels (0.040 μm^3) were classified as stubby spines. All other spines were considered thin. The typical percentages of the three spine types which we obtained were close to those found by (Rodriguez et al., 2008). Measurements obtained by NeuronStudio were transferred to a spreadsheet (Excel or Gnumeric) for analysis.

Cell death assay. Neurons were transfected with 0.5 μg CHMP2B plasmid and 2.5 μg mCherry as above. After fixation and mounting onto slides, neurons were observed under an epifluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200M) with a 63x objective (NA=1.25) and a rhodamine filter, and scored as dead or alive according to morphological criteria (see text). The actual presence of co-transfected CHMP2B was verified by using the GFP filter.

Electrophysiology. Spontaneous tetrodotoxin-resistant miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded by means of the whole-cell configuration of the patch clamp method (Hamill et al 1981). The recording medium contained (in mM): 136 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl2, 1 MgCl2, 10 HEPES, 10 glucose, 0.0005 TTX, 0.025 D-APV, pH 7.4 (NaOH). Patch pipettes were made with the DMZ Universal Pipette puller (Zeitz Instruments, Germany) from thick wall borosilicate glass capillaries (1.5 mm o.d. x 0.86 mm i.d) (Clark Electromedical Instruments, Phymep, France). Filled with a medium consisting of (in mM): 130 Cs-gluconate, 5 EGTA, 1 MgCl2, HEPES, 4 Na2-ATP, pH 7.2 (CsOH), they had a resistance of 3 to 4 MΩ. Glass cover slips were put on the stage of an upright Olympus microscope (BX51WI, Olympus, France) equipped with a water immersion objective lens (x20, N.A. 0.95, Olympus, France). GFP-expressing cells were voltage clamped at a holding potential of -70 mV and the mEPSCs were recorded and then analyzed off-line by means of the pClamp software (Molecular Devices, Dipsi, France). Synaptic currents, filtered at 1 kHz,

were sampled at 10 kHz on an Axoclamp 200B amplifier (Molecular Devices, Dipsi, France). The experiments were conducted at room temperature (20-22°C).

Western immunoblotting. Neurons were plated in plating medium at a density of 24, 000 cells per cm^2 onto 35 mm plastic dishes (Nunc) that had been pre-coated with 50 µg/ml poly-D-lysine. After 2h, the plating medium was replaced with culture medium and maintained as described for coverslips. Sister dishes were withdrawn at the indicated time points and cells were lysed in lysis buffer containing 1% Triton-X100, 0.2 % SDS, 10 mM NaF, 10 mM β-glycerophosphate (pH=7.5) and protease inhibitor mixture (Complete, Roche Molecular). Protein concentration was measured by the Coomassie Blue assay, 1:5 volume of 5 x concentrated Laemmli buffer was added to each lysate, and lysates were frozen at -20°C. All lysates from a given culture were loaded on one 10% SDS-polyacrylamide gel (10 µg per lane) and analysed by electrophoresis and immunoblotting with anti-CHMP2B antibody and anti-actin antibody. Bands were revealed by incubation with HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson Labs), chemiluminescence (Pierce Femto reagent) and autoluminography on film. Luminographs were scanned (300 dpi, 8-bit scale) and the resulting image files were analysed with Metamorph. Grey levels measured for CHMP2B bands were normalized to the corresponding actin bands.

Statistical analysis. The statistical significance of differences between means was generally determined by one-way ANOVA, as indicated in the text. Post-hoc t tests for significance of pairwise differences with control were performed by the Bonferroni method. When criteria for robust ANOVA were not satisfied (too large differences between sample variances or sample sizes), we used the Kruskal-Wallis analysis of mean rank variance, and post-hoc Mann-Whitney U tests of pairwise differences with Bonferroni's correction for multiple comparisons. The significance of differences between frequency distributions was assessed with the χ^2 test. A post-hoc test of pairwise differences used the Marascuilo procedure (NIST Handbook of statistics, http://www.itl.nist.gov/div898/handbook//). Calculations were performed with Gnumeric (http://projects.gnome.org/gnumeric/) or with Bill Miller's OpenStat (http://statpages.org/miller/openstat/). All error bars show S.E.M.

Results

Non-lethal expression of mutant CHMP2B in hippocampal neurons.

Transfection of cultured cortical neurons with CHMP2B^{intron5} has been shown to cause the retraction of neurites and a dramatic increase in the rate of neuronal death, such that less than 10% of transfected neurons survive at 3 days post-transfection (Lee et al., 2007). However, CHMP2B$^{\Delta 10}$ did not cause any significant neurite retraction or cell death (Lee et al., 2007), suggesting that the generation of abnormal ESCRT-III polymers can occur without overt toxicity. To study the effects of dysregulated CHMP2B proteins on dendritic spines independently of nonspecific changes due to cell death, we used CHMP2B$^{\Delta 10}$ in parallel with CHMP2B^{intron5}. Cultured hippocampal neurons were transfected at 10 DIV with empty vector or plasmids encoding N-terminally tagged CHMP2B^{wt}, CHMP2B^{intron5}, or CHMP2B$^{\Delta 10}$ (Fig.1A). Comparatively low amounts of CHMP2B plasmids were used to minimize expression levels and hence toxicity. The pattern of CHMP2B expression obtained 5-6 days after transfection under these conditions was determined by immunofluorescence with anti-tag antibody (Fig. S1). Consistent with published results (Lee et al., 2007), wild-type CHMP2B was homogeneously distributed throughout the entire neuronal cytoplasm, including axons, dendrites and dendritic spines (Fig.S1; Fig. 2, a1, d1). By contrast, both CHMP2B^{intron5} and CHMP2B$^{\Delta 10}$ formed varying numbers of small bright puncta, found in the soma and proximal dendrites, against a faint background of diffuse protein (Fig.S1; Fig. 2, b1, e1, c1, f1). Larger aggregates were occasionally observed in the soma (Fig.S1; Fig. 2, e1). Immunostaining showed approximately equal expression of the two mutants 5 days after transfection (Fig. S1).

Published reports indicate that in transfected cells, mutant CHMP2B proteins often accumulate at the surface of large aberrant endosomes, but can also form smaller, non-endosomal bodies; these appear to be especially prevalent in the case of CHMP2B$^{\Delta 10}$ (Skibinski et al., 2005). To determine whether CHMP2B puncta observed here might be related to endosomes, transfected neurons were doubly stained with anti-tag antibody, and antibodies raised against the early endosomal marker EEA-1 (Fig.2, a2-f2) or the late endosomal / lysosomal protein LAMP-1 (Fig.2, a3-f3), respectively. No colocalisation was observed with these markers. These data suggest that the CHMP2B aggregates which form under our transfection conditions are generally not associated with endosomes.

To analyse the effects of CHMP2B proteins on neuronal morphology, hippocampal neurons were co-transfected at 10 DIV with CHMP2B constructs as above, together with a plasmid

encoding the soluble fluorescent protein mCherry. The cells were fixed at 15 DIV, processed for immunofluorescent staining with anti-tag antibody, and examined by dual-channel confocal microscopy. Immunofluorescence was used routinely to confirm that co-expression of CHMP2B was effective, and the fluorescence of mCherry allowed us to visualise the details of cell morphology. We verified that under our conditions, hippocampal neurons could sustain week-long expression of CHMP2B without showing signs of degeneration. Among transfected neurons that were present at the time of fixation, about 75-80 % of those co-transfected with empty vector, $CHMP2B^{wt}$, or $CHMP2B^{\Delta 10}$ had a healthy appearance, as judged from the overall integrity of their neurites and the absence of neuritic swellings. In keeping with this assessment, in electrophysiological recordings about 85% of similarly transfected neurons were found to be synaptically active (see below, Fig.6). Interestingly, viable appearance was also displayed by 55% of neurons transfected with $CHMP2B^{intron5}$ (Fig. S2 and see Fig.3 below). Healthy cells could be readily distinguished from varicose, dying neurons or from the highly fluorescent remnants of transfected neurons that had undergone lysis. These percentages were not significantly changed in cells fixed at 11 days post-transfection (21 DIV), indicating that neurons could remain viable for a long time after transfection (Fig. S2). Since cell death induced by $CHMP2B^{intron5}$ has been correlated with enhanced accumulation of autophagosomes (Lee et al., 2007; Lee and Gao, 2009), we also monitored the effect of CHMP2B constructs on autophagosome formation, using co-transfected LC3-GFP as an autophagosome marker. Under our conditions, in some neurons expression of $CHMP2B^{intron5}$ did result in increased clustering of LC3-GFP; but in many other cases $CHMP2B^{intron5}$ was expressed without causing clear aggregation of LC3-GFP (Fig.S3). Neither $CHMP2B^{wt}$ nor $CHMP2B^{\Delta 10}$ induced LC3-GFP aggregates. These data confirm the lack of toxicity of $CHMP2B^{wt}$ and $CHMP2B^{\Delta 10}$; they further indicate that in hippocampal neurons, when expressed at a relatively low level, even the intrinsically toxic $CHMP2B^{intron5}$ can exist without causing rapid cell death.

CHMP2B mutants affect dendritic spine density and morphology.

Hippocampal neurons were co-transfected as above with CHMP2B constructs and mCherry, fixed 5 days later, and mCherry fluorescence was used to acquire confocal images of dendritic segments. Neurons showing signs of degeneration (neuritic swellings) were carefully excluded from the analysis. Fig. 3A (a-d) shows representative views of neurons transfected with the CHMP2B constructs. Stacks of serial optical sections were produced for each neuron and the NeuronStudio software package (Rodriguez et al., 2006; Rodriguez et al.,

2008) was then used to generate three-dimensional reconstructions of dendritic arbors and spines, and to count, measure and classify spines, as described by Rodriguez et al. (2008) (see Materials and Methods). Fig.3B shows a reconstructed dendritic segment obtained from a typical control neuron, and the results of automated identification of spine types. The distribution of spine volumes estimated from the reconstruction of such a typical neuron was strongly skewed toward thin spines but included a long tail of large spines (n= 652 spines, range: 0.020 – 2.22 μm^3, median: 0.090 μm^3, mean: 0.210 μm^3). The shape of the distribution and the peak value (between 0.050 and 0.075 μm^3) were similar to the steady-state distribution reported in a recent study of spine volume dynamics in live hippocampal slices (Yasumatsu et al., 2008) (Fig. S4). Furthermore, this peak was in the same range as published values (0.058+/-0.034 μm^3) previously obtained by electron microscopy for the spines of hippocampal neurons in dissociated culture at 14 DIV (Boyer et al., 1998). The distribution of spine lengths was also quite similar to previously published values (Fig. 4G). These data indicate that analysis by NeuronStudio correctly detected the spine population in our cultured neurons.

The linear density of spines (pooling all spine types) detected by this technique was determined for each neuron (Fig.4A, B). Over-expression of tagged, wild-type CHMP2B did not change the average density compared to control neurons transfected with empty vector. By contrast, expression of $CHMP2B^{intron5}$ raised the average density of spines by 64% compared to control (Fig. 4A, col.3). Neurons expressing the $CHMP2B^{\Delta 10}$ mutant also had a tendency to increase the density of their protrusions (average density 24% higher), but this trend did not reach significance (col. 4).

To investigate the possible effect of CHMP2B mutants on spine dimensions, we determined the mean length of spines and the mean diameter of spine heads for each neuron. Transfection of CHMP2B constructs had no effect on mean spine length (Fig.4C,D). By contrast, mutant proteins strongly affected the diameter of spines. Expression of $CHMP2B^{intron5}$ induced a 40% reduction in average spine diameter while $CHMP2B^{\Delta 10}$ reduced average diameter by 32% (Fig. 4E,F). These changes in average spine dimensions reflect a shift in the distribution of head diameters in neurons that express disease-linked CHMP2B mutants. Fig.4G,H shows the normalised distributions of spine lengths and spine head diameters in neurons transfected with each of the four plasmids. Both mutants had a clear, comparable effect on the distribution of spine diameters (Fig. 4H). In control neurons, thin spines (diameter <0.2μm) predominated on top of a distinct population of larger spines, represented as a shoulder and tail in the

distribution (interquartile range (IQR), 5.98 μm). This subset of larger spines was still present in neurons transfected with CHMP2B^{wt} (IQR, 6.00 μm), but strongly reduced following transfection with either CHMP2B^{intron5} (IQR, 2.89 μm) or CHMP2B$^{\Delta 10}$ (IQR, 3.12 μm). As spines with similar head width may differ in their neck, with important consequences for their physiology (Noguchi et al., 2005), it was important to determine how CHMP2B mutants affected the basic morphological categories of spines. Fig. 5 A, B shows that neurons expressing either mutant had an abnormally low fraction of mushroom spines, identified by their head vs. neck width ratio. The fraction of spines with mushroom morphology was decreased by ~50% with both CHMP2B^{intron5} and CHMP2B$^{\Delta 10}$, as they were replaced by an enlarged proportion of thin spines (Fig 5A). Stubby spines were also reduced, but to a smaller extent, by expression of CHMP2B^{intron5}. The average diameter of spines that were included in the mushroom spine subset (0.56 μm) did not significantly change in cells transfected with the mutants, confirming the consistency of morphotype identification.

Such a drop in the average size and in the proportions of large spine types might arise from an absolute decrease in the density of large spines, or from their being diluted in an excess of thin spines, or both. The two mutants differed in this regard. The absolute density of mushroom spines was indeed reduced in CHMP2B$^{\Delta 10}$-expressing neurons, from 0.15 to 0.10 μm^{-1} (Fig.5B). Somewhat surprisingly, the reduction in absolute mushroom spine density was more moderate in CHMP2B^{intron5}-expressing neurons, from 0.15 to 0.13 μm^{-1}, and did not reach significance; in this case, in many neurons the decrease in the proportion of mushroom spines was mostly accounted for by the strong increase in thin spine density (Fig. 5D). The density of thin spines was more than doubled in the presence of CHMP2B^{intron5}, from 0.62 to 1.30 μm^{-1}, whereas CHMP2B$^{\Delta 10}$ only had a weak, non-significant effect on this parameter. Thus, although the two mutants tended to have similar effects, quantitative differences existed that might possibly reveal mechanistic differences; nevertheless the major outcome was the same, as both mutants potently diminished the mushroom spine fraction.

Taken together, these data indicate that expression of a mutant ESCRT-III subunit linked to a human neurodegenerative disease can strongly affect the density and morphology of dendritic spines, and disrupt the normal pattern of spine development.

A CHMP2B mutant affects miniature excitatory synaptic currents.

To determine whether the effects of mutant CHMP2B on spine morphology correlated with functional changes at synapses, we performed patch-clamp recordings from cultured hippocampal neurons that had been co-transfected with GFP and empty vector, wild-type

CHMP2B, or CHMP2B$^{\Delta 10}$. (This mutant was chosen due to its action on mushroom spine density, and also to exclude any effect associated with the toxicity of CHMP2B^{intron5}). Transfected cells were pinpointed by GFP fluorescence. Neurons expressing CHMP2B^{wt} or CHMP2B$^{\Delta 10}$ displayed a two-fold increase in capacitance compared to control; while the effect was significant for both CHMP2B^{wt} and CHMP2B$^{\Delta 10}$, neurons expressing CHMP2B$^{\Delta 10}$ displayed a large variability in this respect (Fig.6B). The reason for this elevated capacitance is currently unclear (see Discussion). We monitored the frequency and amplitude of miniature excitatory post-synaptic currents (mEPSCs) as an indicator of possible effects of plasmids on synaptic strength. In total, 16 out of 18 transfected neurons were synaptically active; the two inactive neurons were discarded from analysis. Sample traces representative of each transfection condition are shown in Fig. 6A. The mean frequency of mEPSCs did not significantly differ between neurons of the three transfection groups, suggesting that the transfected plasmids did not affect the number of functional synapses (Fig.6C). To determine whether the plasmids caused changes in amplitude, equivalent, randomly chosen runs of mEPSCs obtained from each neuron were pooled according to the transfected plasmids. The mean amplitude was slightly lower (7.5%) in mEPSCs of cells transfected with CHMP2B$^{\Delta 10}$ than in those of control- or CHMP2B^{wt}-transfected neurons (Fig. 6D). However, cumulative amplitude histograms indicated that CHMP2B$^{\Delta 10}$ caused a reduction in the frequency of large amplitude events, belonging to the top quintile (Fig. 6E). The proportions of mEPSCs with amplitude larger than 20 pA (i.e. approximately twice the median amplitude) were specifically reduced from 19% in control or in neurons over-expressing wild-type CHMP2B, to 13% in neurons expressing CHMP2B$^{\Delta 10}$; conversely, in these latter cells the proportion of small amplitude events (<5pA) raised from 6.8% to 10% (Fig. 6F). The specific difference in the frequency of large currents was significant between control and CHMP2B$^{\Delta 10}$ but not between control and CHMP2B^{wt}. These data suggest that expression of mutant CHMP2B may cause a reduction in the proportion of the more potent synapses, and an increase in the proportion of weak synapses.

Endogenous CHMP2B is required for maturation of dendritic spines.

Since both CHMP2B$^{\Delta 10}$ and CHMP2B^{intron5} are dysregulated, dominantly acting versions of CHMP2B, their effect on spines raises the possibility that the normal protein may play some role in spine morphogenesis. By Western immunoblotting analysis using an anti-CHMP2B antibody, endogenous CHMP2B was clearly detectable in extracts from cultured neurons at 8 DIV, and increased in older cultures, in which synaptogenesis and spine maturation are known

to take place (Fig. S5). Immunofluorescent staining of the neurons with the anti-CHMP2B antibody showed the protein to be widely distributed throughout soma, axons and dendrites, similar to data obtained with the tagged wild-type protein (Fig. 7A). Expression of $CHMP2B^{intron5}$ sometimes induced strong clustering of the endogenous protein, supporting the possibility that the mutant protein might perturb the function of its wild-type counterpart (Fig.S6). To determine the possible contribution of CHMP2B to spine morphology, we transfected cultured hippocampal neurons at 10 DIV with a plasmid vector driving transcription of an shRNA previously shown efficiently to extinguish CHMP2B expression (Lee et al., 2007). Transfected neurons could be tracked and outlined by mCherry, co-expressed from the same plasmid. The loss of endogenous CHMP2B in transfected neurons was ascertained by immunofluorescence with anti-CHMP2B antibody (Fig. 7A, middle panel). In agreement with results published by Gao and colleagues (Lee et al., 2007), the CHMP2B shRNA did not affect neuronal viability. To confirm the target specificity of any effect, control experiments were performed in which CHMP2B shRNA was co-expressed with an RNAi-resistant CHMP2B mRNA (called CHMP2B*) (Fig. 7A, lower panel). Confocal imaging of mCherry and spine analysis were performed as in the case of mutant CHMP2B (Fig. 7B, Fig. 8).

Depletion of endogenous CHMP2B increased the average density of spines, and the increase was fully reverted upon rescue by CHMP2B* (Fig.8A,B). CHMP2B depletion did not significantly affect the length of spines (Fig. 8B). In contrast, a highly significant reduction in mean spine diameter per neuron was observed in shRNA-transfected cells compared to controls; this was rescued to a near-normal value upon co-expression of CHMP2B* (Fig. 8E,F). Similar to the case of neurons transfected with mutant CHMP2B, the size distribution of spine heads showed a loss of the large spine subset; this loss was largely reverted by rescue with RNAi-resistant CHMP2B (Fig.8G). Spine classification revealed a two-fold drop in the average proportion of mushroom spines, from 17% in control neurons to 9% in shRNA-transfected cells. This effect is equivalent to that observed upon expression of mutant CHMP2B. Correlatively, the average linear density of mushroom spines decreased from 0.13 μm^{-1} in control neurons to 0.06 μm^{-1} in shRNA-transfected neurons ($p<0.0001$), as seen in the case of $CHMP2B^{\Delta 10}$. Upon co-expression of CHMP2B*, the average proportion of mushroom spines could be rescued to 13%, at which level the difference with control neurons was no longer significant (Fig. 7H). The reinstatement of spine morphology by RNAi-resistant CHMP2B* strongly supports the specificity of CHMP2B shRNA effects. Taken together,

these results indicate that the dose of CHMP2B is a limiting factor for generating dendritic spines with large heads. Furthermore, the data suggest that human disease-linked CHMP2B mutants act as dominant negatives with respect to CHMP2B function in spine morphogenesis.

Discussion

The peculiar susceptibility of cortical tissue to deleterious consequences of CHMP2B mutations suggests that neuronal functions are specifically affected by the mutant proteins. Here we found that in cultured hippocampal neurons, two FTD-linked CHMP2B mutants strongly perturbed the normal pattern of dendritic spine development. Both mutants caused a striking decrease in the proportion of large spines with mushroom morphology. This outcome was not associated with cell death, since it was observed in non-degenerating neurons, with both the much-studied CHMP2B^{intron5} mutant, and the non-toxic CHMP2B$^{\Delta 10}$ mutant. In keeping with these results, CHMP2B$^{\Delta 10}$ induced a drop in the frequency of large mEPSCs. Consistent with the view that CHMP2B mutants act as dominant negatives, depletion of endogenous CHMP2B by RNAi resulted in changes which were very similar to those induced by mutant CHMP2B, and which could be largely suppressed by co-expression of rescuing protein. Together, these data show that normal spine morphogenesis requires CHMP2B, and that abnormal stoichiometry or pathological dysregulation of the protein can deeply affect the structure and function of spines.

The average spine density measured in control neurons was somewhat higher than values previously reported in confocal microscopy studies of cultured hippocampal neurons (at 15 DIV, 1 spine/µm against e.g. 0.59 spine/µm in Boyer et al. (1998) (Papa et al., 1995; Boyer et al., 1998). This apparent discrepancy may owe to culture conditions and to modelling by NeuronStudio, which allows detection of numerous small dendritic protrusions that might easily go unnoticed when manually analysing projection images (Wearne et al., 2005; Rodriguez et al., 2008), and that are nevertheless spines rather than membrane bulges or filopodia, based on their estimated volume ($V > 0.02\ \mu m^3$) and length ($0.2\ \mu m < L < 3\ \mu m$).

CHMP2B^{intron5} and CHMP2B$^{\Delta 10}$ had quantitatively distinct effects on spine growth. CHMP2B^{intron5} did not strongly diminish the absolute density of mushroom spines, but it promoted a striking absolute increase in thin spines. Exactly the reverse was observed with CHMP2B$^{\Delta 10}$. Because neurons were transfected at 10 DIV, i.e. well before the bulk of well-developed mushroom spines have appeared, we do not know whether CHMP2B$^{\Delta 10}$ actually

caused a reversal in the morphology of mushroom spines, or only prevented their development. In our hands, transfection of fully mature cultures with CHMP2B plasmids has so far been too inefficient to obtain statistically meaningful numbers of transfected cells. Resolution of this issue will require further experiments. There is little doubt that despite the commonality of C-terminal deregulation, functional differences exist between CHMP2B mutants (Lee et al., 2007). The overall trend is however similar for both mutants. Taken together, their net effect is to favour the emergence and / or stability of thin, immature spines, while at the same time blocking the maturation of mushroom spines.

Looking for a functional correlate of the $CHMP2B^{\Delta 10}$ effect, we found that this mutant only slightly affected the mean amplitude of mEPSCs, reducing them by 7.5%; but it induced a significant drop (32%) in the proportion of large mEPSCs, from 19% to 13%. In view of the general correlation between spine size and synaptic potency (Matsuzaki et al., 2001), the change in synaptic properties is consonant with the reduction (from 19 % to 10%) in the proportion of mushroom spines induced by $CHMP2B^{\Delta 10}$. This result raises the intriguing possibility that pathogenic CHMP2B mutants might weaken strong synapses and thereby perturb the functional connectivity of neurons. Besides, $CHMP2B^{wt}$ over-expression resulted in a significant increase in membrane capacitance, i.e. presumably in membrane area. Preliminary data suggest that expression of $CHMP2B^{wt}$ but not $CHMP2B^{\Delta 10}$ augments the degree of dendritic branching, a plausible source of cell surface (A. B. and Y. G., unpublished observations). Along the same line, dendritic arborisation has been shown to depend on the dose the ESCRT-III protomer mSnf7/CHMP4B (Sweeney et al., 2006; Lee et al., 2007). In the case of $CHMP2B^{\Delta 10}$, the occasionally occurring raise in spine density (see Fig. 4B) might perhaps explain the elevated mean and variance of the capacitance. More experiments are needed to analyse the impact of CHMP2B deregulation on cell size.

In various cell types including cortical neurons, transiently expressed CHMP2B mutants are known to concentrate into thick coats around abnormally enlarged endosomes, and to cause the appearance of multiple autophagosomes, as revealed by LC3-GFP labelling. It should be noted however, that a fraction of $CHMP2B^{intron5}$ and $CHMP2B^{\Delta 10}$ aggregates consistently fail to co-localise with endosomal markers (Skibinski et al., 2005). In our experiments, presumably similar non-endosomal aggregates largely predominated, perhaps due to the relatively low level of CHMP2B expression. In keeping with the reported correlation between endosomal dysfunction, autophagosome accumulation, and cell death (Lee et al., 2007; Lee and Gao, 2009), there were no signs of the latter two processes occurring in the set of neurons

which we analysed. Our attempts to identify further components of the mutant CHMP2B clusters have so far been unsuccessful, except for the finding that CHMP2B^{intron5} granules sometimes recruit endogenous CHMP2B. Similar trapping of endogenous mSnf7/CHMP4B by CHMP2B^{intron5} aggregates formed in cortical neurons has been previously reported (Lee et al., 2007). The granules may be composed of abnormally large or stable CHMP2B polymers. The occurrence of non-endosomal CHMP2B clusters is consistent with the fact that in vitro, activated ESCRT-III subunits can form large polymers in the absence of lipids (Lata et al., 2008).

Depletion of endogenous CHMP2B induced effects that closely resembled those of CHMP2B mutants, especially CHMP2B$^{\Delta 10}$, suggesting that the mutants have dominant negative activity. The effects of the CHMP2B siRNA were specific since they were reverted in rescue experiments (albeit not completely, presumably because the relative stoichiometries of ESCRT-III subunits need to be more finely balanced than was possible in such assays). Thus, CHMP2B may play a part in a spine maturation process in which filopodial spine growth stops and spine head enlargement is promoted. The dual function of the C terminus as intramolecular repressor and intermolecular docking domain may simultaneously explain the activated polymerisation and dominant-negative effect of the mutants. The CHMP2B C terminus binds to SKD1 / Vps4, the ATPase responsible for the disassembly of ESCRT-III (Stuchell-Brereton et al., 2007), and possibly other factors (Yang et al., 2008). While they are prone to polymerise, CHMP2B mutants therefore fail to recruit important regulators to ESCRT-III filaments. Inserting mutants or removing normal CHMP2B altogether would thus have similar consequences for such recruitment. Along this line, in yeast, the CHMP2B homologue Vps2 acts as a capping protein at the tip of growing ESCRT-III polymers, necessary to recruit Vps4 and terminate a polymerisation cycle (Teis et al., 2008).

The mechanism(s) through which mutant CHMP2B proteins and CHMP2B depletion affect the morphology of spines will require elucidation. The mutants might obviously interfere with endosomal processes necessary for spine maturation, such as trafficking of specific post-synaptic proteins (Passafaro et al., 2003; Steiner et al., 2005; Park et al., 2006), or perhaps endosomal processing of micro-RNAs (Schratt et al., 2006; Gibbings et al., 2009; Lee et al., 2009); however mutant protein aggregates did not seem to form on endosomes. The aggregates might also function as abnormal signalling platforms (Ahmad et al., 2009; Lee and Gao, 2009), but this would not explain the effect of CHMP2B depletion. A third possibility is that the mutant proteins may perturb a direct effect of ESCRT-III filaments on spine growth.

Akin to their function in virus budding (Hanson et al., 2008; Usami et al., 2009) and perhaps to that in dendritic arborisation (Sweeney et al., 2006; Lee et al., 2007), ESCRT-III filaments might contribute to filopodial spine growth. CHMP2B might be required to control this process by capping the filaments and allowing some interaction required for the expansion of spine heads. The emerging functional connection between ESCRT and the actin cytoskeleton (Sevrioukov et al., 2005; Vaccari et al., 2009) may well be relevant here. Future experiments will seek to investigate these possibilities.

Neuron intoxication induced by deficient autophagy has been proposed to drive FTD-3 (Filimonenko et al., 2007; Lee et al., 2007; Lee and Gao, 2009). $CHMP2B^{intron5}$ might also affect critical interactions between ESCRT-III and regulators of neuron death, such as Alix (Trioulier et al., 2004; Mahul-Mellier et al., 2006). However, the actual expression levels of $CHMP2B^{intron5}$ and $CHMP2B^{\Delta 10}$ proteins in the brains of affected individuals are unknown. The amount of the toxic $CHMP2B^{intron5}$ protein may in fact be quite low, due to nonsense-mediated decay (NMD), which would be expected to destroy the aberrantly spliced $CHMP2B^{intron5}$ transcript during the first round of translation (Le Hir and Seraphin, 2008). Our results suggest that at sufficiently low doses, the mutant proteins may not immediately cause cell death, but they may harm the development, homeostasis or plasticity of dendritic spines. In the long term, the resulting synaptic alterations may help promote neurodegeneration of specific neuronal populations in the brain (especially if NMD were altered and $CHMP2B^{intron5}$ biosynthesis enhanced). A synaptotoxic mechanism would be consistent with observations of synapse loss in FTD (Lipton et al., 2001) and the widespread abnormalities in spine density and morphology seen in diverse neurodegenerative diseases (Fiala et al., 2002; Wishart et al., 2006).

Ahmad ST, Sweeney ST, Lee JA, Sweeney NT, Gao FB (2009) Genetic screen identifies serpin5 as a regulator of the toll pathway and CHMP2B toxicity associated with frontotemporal dementia. Proc Natl Acad Sci U S A 106:12168-12173.

Bajorek M, Schubert HL, McCullough J, Langelier C, Eckert DM, Stubblefield WM, Uter NT, Myszka DG, Hill CP, Sundquist WI (2009) Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. Nat Struct Mol Biol 16:754-762.

Banker G, Goslin K (1998), 2nd Edition: MIT Press.

Boyer C, Schikorski T, Stevens CF (1998) Comparison of Hippocampal Dendritic Spines in Culture and in Brain. J Neurosci 18:5294-5300.

Carlton JG, Martin-Serrano J (2007) Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. Science 316:1908-1912.

Fiala JC, Spacek J, Harris KM (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? Brain Res Brain Res Rev 39:29-54.

Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerod L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A (2007) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. J Cell Biol 179:485-500.

Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O (2009) Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. 11:1143-1149.

Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE (2008) Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. J Cell Biol 180:389-402.

Hurley JH, Emr SD (2006) The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. Annu Rev Biophys Biomol Struct 35:277-298.

Lata S, Schoehn G, Jain A, Pires R, Piehler J, Gottlinger HG, Weissenhorn W (2008) Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. Science 321:1354-1357.

Le Hir H, Seraphin B (2008) EJCs at the heart of translational control. Cell 133:213-216.

Lee JA, Gao FB (2009) Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia. J Neurosci 29:8506-8511.

Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao FB (2007) ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. Curr Biol 17:1561-1567.

Lee YS, Pressman S, Andress AP, Kim K, White JL, Cassidy JJ, Li X, Lubell K, Lim do H, Cho IS, Nakahara K, Preall JB, Bellare P, Sontheimer EJ, Carthew RW (2009) Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. Nat Cell Biol 11:1150-1156.

Lipton AM, Cullum CM, Satumtira S, Sontag E, Hynan LS, White CL, III, Bigio EH (2001) Contribution of Asymmetric Synapse Loss to Lateralizing Clinical Deficits in Frontotemporal Dementias. Arch Neurol 58:1233-1239.

Mahul-Mellier A-L, Hemming FJ, Blot B, Fraboulet S, Sadoul R (2006) Alix, making a link between ALG-2, the ESCRT complex and neuronal death *in vivo*. Journal of Neuroscience 26:542-549.

Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Nat Neurosci 4:1086-1092.

Muziol T, Pineda-Molina E, Ravelli RB, Zamborlini A, Usami Y, Gottlinger H, Weissenhorn W (2006) Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. Dev Cell 10:821-830.

Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H (2005) Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca2+ signaling in dendrites. Neuron 46:609-622.

Papa M, Bundman M, Greenberger V, Segal M (1995) Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. J Neurosci 15:1-11.

Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD (2006) Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. Neuron 52:817-830.

Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, Sheng M (2003) Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. Nature 424:677-681.

Pickering-Brown SM (2007) The complex aetiology of frontotemporal lobar degeneration. Exp Neurol 206:1-10.

Rodriguez A, Ehlenberger DB, Hof PR, Wearne SL (2006) Rayburst sampling, an algorithm for automated three-dimensional shape analysis from laser scanning microscopy images. 1:2152-2161.

Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL (2008) Automated Three-Dimensional Detection and Shape Classification of Dendritic Spines from Fluorescence Microscopy Images. PLoS ONE 3:e1997.

Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. Cell 136:97-109.

Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. Nature 439:283-289.

Sevrioukov EA, Moghrabi N, Kuhn M, Kramer H (2005) A mutation in dVps28 reveals a link between a subunit of the endosomal sorting complex required for transport-I complex and the actin cytoskeleton in Drosophila. Mol Biol Cell 16:2301-2312.

Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A,

Johannsen P, Sorensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J (2005) Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. 37:806-808.

Slagsvold T, Pattni K, Malerød L, Stenmark H (2006) Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. Trends in Cell Biology 16:317-326.

Steiner P, Alberi S, Kulangara K, Yersin A, Sarria JC, Regulier E, Kasas S, Dietler G, Muller D, Catsicas S, Hirling H (2005) Interactions between NEEP21, GRIP1 and GluR2 regulate sorting and recycling of the glutamate receptor subunit GluR2. Embo J 24:2873-2884.

Stuchell-Brereton MD, Skalicky JJ, Kieffer C, Karren MA, Ghaffarian S, Sundquist WI (2007) ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. 449:740-744.

Sweeney NT, Brenman JE, Jan YN, Gao F-B (2006) The Coiled-Coil Protein Shrub Controls Neuronal Morphogenesis in Drosophila. Current Biology 16:1006-1011.

Teis D, Saksena S, Emr SD (2008) Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. Dev Cell 15:578-589.

Trioulier Y, Torch S, Blot B, Cristina N, Chatellard-Causse C, Verna JM, Sadoul R (2004) Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. J Biol Chem 279:2046-2052.

Usami Y, Popov S, Popova E, Inoue M, Weissenhorn W, H GG (2009) The ESCRT pathway and HIV-1 budding. Biochem Soc Trans 37:181-184.

Vaccari T, Rusten TE, Menut L, Nezis IP, Brech A, Stenmark H, Bilder D (2009) Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in Drosophila by efficient isolation of ESCRT mutants. J Cell Sci 122:2413-2423.

van der Zee J, Sleegers K, Van Broeckhoven C (2008a) Invited article: the Alzheimer disease-frontotemporal lobar degeneration spectrum. Neurology 71:1191-1197.

van der Zee J, Urwin H, Engelborghs S, Bruyland M, Vandenberghe R, Dermaut B, De Pooter T, Peeters K, Santens P, De Deyn PP, Fisher EM, Collinge J, Isaacs AM, Van Broeckhoven C (2008b) CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. Hum Mol Genet 17:313-322.

von Schwedler UK, Stuchell M, Müller B, Ward DM, Chung H-Y, Morita E, Wang HE, Davis T, He G-P, Cimbora DM, Scott A, Kräusslich H-G, Kaplan J, Morham SG, Sundquist WI (2003) The Protein Network of HIV Budding. Cell 114:701-713.

Wearne SL, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Rocher AB, Henderson SC, Hof PR (2005) New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. Neuroscience

Quantitative Neuroanatomy: from molecules to systems - A special issue in honor of the late Professor Theodor W Blackstad 136:661-680.

Wishart TM, Parson SH, Gillingwater TH (2006) Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 65:733-739.

Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH (2009) Membrane scission by the ESCRT-III complex. Nature 458:172-177.

Yang D, Rismanchi N, Renvoise B, Lippincott-Schwartz J, Blackstone C, Hurley JH (2008) Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. Nat Struct Mol Biol 15:1278-1286.

Yasumatsu N, Matsuzaki M, Miyazaki T, Noguchi J, Kasai H (2008) Principles of long-term dynamics of dendritic spines. J Neurosci 28:13592-13608.

Discussion

Dans ce travail, j'ai abordé successivement deux systèmes cellulaires distincts, à l'œuvre dans le développement, l'homéostase et la plasticité des épines dendritiques : les ribonucléoprotéines associées aux ARNm dendritiques, d'une part ; et le système endo-lysosomial d'autre part. J'ai principalement utilisé le modèle des neurones d'hippocampe de rat dissociés en culture primaire, manipulés par transfection, et analysés par la microscopie de fluorescence, confocale et conventionnelle. Reprenant le cours du travail inauguré par Julien Grange au laboratoire, j'ai d'abord étudié le rôle nouveau du facteur d'épissage Sam68 dans la traduction d'un ARNm directement impliqué dans la plasticité synaptique structurale : Eef1a1. L'utilisation d'un mutant dominant négatif de Sam68, a permis de montrer que Sam68 avait probablement un rôle stimulateur de la traduction d'Eef1a1. Le mouvement de facteurs de maturation des ARN du noyau vers les dendrites ne se limite pas au cas de Sam68, puisque j'ai également montré que la protéine TLS se localisait essentiellement dans le compartiment somato-dendritique et en particulier dans les épines. À l'époque de ce premier travail, les implications pathologiques de ces processus n'étaient pas connues.

Je me suis ensuite intéressée à la fonction physiopathologique de la protéine CHMP2B, mutée dans la forme FTD-U de la démence fronto-temporale. Ce travail a démontré qu'indépendamment de son effet d'accélération de la mort neuronale, la forme mutée de CHMP2B inhibe la maturation des épines dendritiques. L'inhibition peut s'interpréter comme un effet dominant négatif, puisque les expériences d'extinction de CHMP2B endogène donnent des résultats très similaires à ceux de l'expression des mutants. La protéine CHMP2B apparaît donc comme un facteur nécessaire à la maturation normale des épines dendritiques, au moins dans ce système *in vitro*. Ces résultats suggèrent de plus un mécanisme pathogène possible pour la FTD-U.

Les deux aspects de la physiologie neuronale que j'ai étudiés semblent actuellement contribuer à un même mécanisme pathogénique. En effet, des mutations de CHMP2B ont été associées non seulement à la forme FTD-U de démence fronto-temporale, mais aussi à des formes de sclérose latérale amyotrophique (ALS). Il est à noter qu'ALS et FTD peuvent parfois co-exister. Or des mutations de la protéine TLS ainsi que d'une autre protéine de liaison aux ARNm, TDP-43, sont également associées à des formes familiales d'ALS. De plus, TDP-43 forme des agrégats intracellulaires ubiquitinés dans une proportion importante

des FTD, mais pas la FTD-U. Les perturbations de TLS et TDP-43 et celles de CHMP2B paraissent donc déboucher sur des effets cliniques similaires. Un lien sera peut-être établi dans l'avenir entre perturbations de l'appareil de régulation des ARNm et perturbations de l'appareil endo-lysosomial.

1. Le facteur d'épissage Sam68 est associé à l'ARNm du facteur d'élongation de la traduction eEF1A

Nous avons montré que Sam68 est associée dans le cerveau à un éventail large mais sélectif d'ARNm cytoplasmiques codant des protéines impliquées dans la plasticité à long terme. Parmi ces derniers, Sam68 est particulièrement associé à l'ARNm d'Eef1a1. La dépolarisation membranaire de neurones en culture, induit en même temps le recrutement de Sam68 aux polysomes, et celui de l'ARNm d'Eef1a1 qui se trouve donc engagé dans la traduction en étant associé à Sam68 ; de plus, le fait que le mutant Sam68ΔC inhibe l'accumulation de la protéine eEF1A, suggère que Sam68 est impliquée dans l'activation de la traduction de l'ARNm de Eef1a1. Sam68 est, par ailleurs, spécifiquement recrutée par le complexe du récepteur NMDA. Sam68 pourrait fournir une plateforme d'amarrage pour des ARNm neuronaux spécifiques et/ou recruter spécifiquement des facteurs de traduction à des sites subsynaptiques.

La spécificité des ARNm identifiés sur la micro puce, est assurée d'une part par la reproductibilité de l'hybridation et de la procédure de détection ; en effet, les scores z de deux hybridations de la même population d'ARNm sont hautement reproductibles (Figure 1.C.). D'autre part nous avons comparé deux expériences distinctes c'est-à-dire deux immunoprécipitations à partir de deux cerveaux de rat distincts. Les fluctuations individuelles des scores z sont alors plus grandes, et probablement dues aux variations d'hydrolyse et de dissociation des ARNm pendant l'immunoprécipitation. Cependant la corrélation entre les échantillons est suffisamment correcte pour assurer qu'un ARNm ayant un score z supérieur à 1,5 (c'est à dire faisant partie des 7 % d'ARNm les plus abondants dans l'immunoprécipité)dans une expérience a 85 % de chance d'avoir un score z supérieur à 0 (c'est à dire de faire partie des 50 % d'ARNm les plus abondants, donc d'être sur-représenté) dans la seconde expérience (Figure 1.D.). De plus, les scores z ont été mesurés dans trois expériences indépendantes, et les ARNm dont les scores z présentaient une déviation standard

trop grande ont été éliminés. Enfin, l'ARNm de la β-actine, préalablement détecté dans le laboratoire par RT-PCR d'immunoprécipités de Sam68 dans le cerveau, fait partie des ARNm abondants de notre test ; et nous fournit un contrôle positif de la procédure d'immunoprécipitation. De plus l'équipe de Itoh avait déjà identifié l'actineβ comme une cible de Sam68 (Itoh et al., 2002). Par ailleurs, Moccia et al. ont montré que l'ARNm de eEF1A était présent dans les dendrites de neurones sensitifs de l'Aplysie en culture (Moccia et al., 2003) ; Poon et al. dans les dendrites de neurones d'hippocampe de rat en culture (Poon et al., 2006) ; et Matsumoto et al. dans la fraction polysomiale d'une préparation de synaptosomes de cerveau de rat adulte (Matsumoto et al., 2007). Ces données confirment la localisation dendritique de l'ARNm Eef1a1 et soulignent son importance fonctionnelle dans divers organismes.

Cependant, il est important de souligner que les ADNc présents sur la puce correspondent à une banque de 15000 séquences, théoriquement uniques, isolés à partir de 50.000 EST (Expressed Sequence Tag) d'embryon de souris. Sur cette puce ne sont donc pas représentés tous les ADNc correspondant aux ARNm impliqués dans des processus neuronaux chez l'adulte ; par exemple, l'ARNm de l'αCamKII n'est pas présent sur la puce. La liste des ARNm co-purifiés avec Sam68 n'est donc pas exhaustive. Elle nous permet cependant de réaliser que Sam68 est probablement un facteur ayant un rôle assez large dans le métabolisme des ARNm.

Nous avons montré que la dépolarisation des neurones activait la traduction d'Eef1a1. L'équipe de Monn a montré quant à elle que la dépolarisation de la membrane, à l'aide de potassium, induisait l'augmentation du nombre de clusters d'ARNm d'Eef1a1 dans les dendrites et près des densités postsynaptiques de neurones d'hippocampe en culture (Moon et al., 2008). Cette publication confirme l'accumulation d'ARNm Eef1a1 que nous avons observée dans les polysomes et les granules résolus biochimiquement.
Nos résultats suggèrent que Sam68 est impliquée dans l'activation de la traduction de l'ARNm de Eef1a1. Les expériences faites avec le mutant dominant négatif Sam68ΔC étayent cette idée. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'effet de Sam68ΔC soit indirect et résulte d'une dégradation accrue de eEF1A, voire d'une diminution dans la quantité d'ARNm Eef1a1. Ces questions ne pourront être résolues que par des expériences supplémentaires, en utilisant par exemple un ARNm indicateur contenant la séquence d'Eef1a1 reconnue par

Sam68, exprimé en présence de Sam68ΔC ou des mutants de Sam68ΔC spécifiquement déficients pour ce qui est de la liaison à cet ARNm. Cependant, Paronetto et al. ont montré que dans les spermatocytes en cours de maturation, Sam68 quittait le noyau et s'associait à des polysomes, de manière similaire à ce que nous avions observé dans le cas des neurones (Paronetto et al., 2006). À l'aide de spermatocytes issus de souris déficientes en Sam68, ces auteurs ont pu démontrer récemment que Sam68 était indispensable à la traduction de certains ARNm spécifiques (Paronetto et al., 2009). Ces résultats rendent d'autant plus plausible notre conclusion que Sam68 agit comme facteur stimulateur de la traduction.

L'utilisation de la souris Sam68 $^{-/-}$ pourrait permettre de déterminer si l'absence d'expression de Sam68 affecte la distribution subcellulaire et la traduction de ses ARNm cibles dans le cerveau. Le mécanisme selon lequel Sam68 pourrait activer la traduction reste à explorer. Outre son affinité pour les ARN, Sam68 interagit avec une série de protéines parmi lesquelles figurent des tyrosine-kinases, la PI3-Kinase, et des protéines impliquées dans le traitement de l'ARNm (hélicase). L'une de ces interactions pourrait accélérer le recrutement de facteurs de traduction généraux sur l'ARNm cible. Par ailleurs, au vu de sa localisation dendritique et de sa liaison au complexe du récepteur NMDA, Sam68 pourrait fournir une plateforme d'amarrage pour des ARNm neuronaux spécifiques et/ou recruter spécifiquement des facteurs de traduction à des sites subsynaptiques.

La protéine eEF1A joue un rôle essentiel dans l'élongation de la chaîne peptidique, au cours de la traduction. eEF1A est exprimée de manière ubiquitaire, est conservée tout au long de l'évolution, et son fonctionnement est vital pour la cellule. En plus de son rôle dans la synthèse protéique, eEF1A possède la capacité de se lier à l'actine et de favoriser la réticulation de filaments d'actine. Cette protéine peut ainsi directement influencer le cytosquelette et la morphologie de la cellule (Munshi et al., 2001) ; et pourquoi pas la morphologie des épines dendritiques. Il serait intéressant d'étudier si l'expression d'une forme mutée d'eEF1A n'interagissant plus avec l'actine (Liu et al., 2002), modifie la morphologie des épines dendritiques. On pourrait aussi imaginer qu'eEF1A permette l'association des granules avec l'actine et leur entrée dans l'épine dendritique.

2. Le facteur d'épissage TLS est localisé dans les dendrites des neurones

Nous avons montré que TLS est localisée dans les dendrites et près des synapses de neurones *in vivo* et en culture. Une fraction des molécules TLS s'accumule dans les mêmes structures granulaires que Sam68.

Depuis le début de cette étude, Kanai et ses collaborateurs ont montré dans le cerveau de souris, que TLS fait partie de granules d'ARN (comprenant entre autres les ARNm de l'αCamKII et de ARC) transportés dans les dendrites par le moteur moléculaire kinésine, KIF5 (Kanai et al., 2004). L'équipe de Fujï quant à elle, a montré d'une part que TLS est recrutée dans les épines dendritiques suite à la stimulation des récepteurs métabotropiques du glutamate de type I, mGluR5 (Fujii et al., 2005) ; et d'autre part que TLS est associé à l'ARNm d'une protéine stabilisatrice de l'actine, Nd1-L (Fujii and Takumi, 2005). Aussi, les souris déficientes en TLS ne sont pas viables (Hicks et al., 2000) et les cultures de neurones d'hippocampe issus de ces souris présentent, par rapport à des souris normales, une arborisation dendritique plus développée au niveau du soma, une diminution de la densité des épines et une morphologie anormale de celles-ci, elles ressemblent plus à des filopodes (Fujii et al., 2005). TLS semble donc bien avoir un rôle majeur dans le système nerveux central où elle participe à la mise en place des épines dendritiques, et au transport d'ARNm dans les dendrites.

Par ailleurs, dans trois études récentes, des mutations de la protéine TLS ont été identifiées chez des familles de patients atteints de sclérose amyotrophique latérale (ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis) (Chio et al., 2009; Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). L'ALS est une dégénérescence des motoneurones qui touche à la fois les motoneurones centraux et périphériques, conduisant à des paralysies fatales. La prévalence de la maladie est de 0,6 à 2,6 pour 10000. Les cas familiaux représentent 10% des cas. Trois gènes ont été liés aux cas familiaux de l'ALS : *SOD1* codant pour la métalloprotéine superoxyde dismutase cytoplasmique (SOD1) ; *ANG*, codant pour la petite ribonucléase, angiogenine ; et *TARDP*, codant pour la protéine à domaine TAR liant l'ADN, TDP-43. Des études antérieures avaient établi un lien entre le chromosome 16 et les formes familiales d'ALS. Basé sur le fait que TDP-43 est une protéine liant l'ADN et l'ARN, les équipes de

Kwiatkowski et de Vance ont cherché chez des patients atteints d'ALS, des mutations sur le chromosome 16 dans des gènes codant pour des protéines liant l'ADN et l'ARN ; c'est ainsi qu'ils ont identifié des mutations ponctuelles dominantes dans le gène de TLS. Ces mutations conduisent toutes à des substitutions peptidiques dans la protéine et sont toutes localisées dans les douze derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale (Figure A, Chapitre Résultats).

Les arginines mutées sont des sites potentiels de méthylation. Les méthylations protéiques sont des modifications post-traductionnelles stables, et sont impliquées dans des interactions protéiques, la localisation cellulaire et la maturation des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP). Dans le cas de Sam68, la méthylation est nécessaire à la localisation nucléaire (Cote et al., 2003). Ce pourrait aussi être le cas de TLS. Chez les patients, portant une mutation de TLS, TLS est retenue dans le cytoplasme des neurones du cortex frontal ou de la moelle épinière et dans le cytoplasme de cellules en cultures (N2A et SKNAS) transfectées avec TLS mutée (Kwiatkowski et al., 2009). L'équipe d'Ong, lors d'un criblage des sites de méthylation de protéines *in vivo* dans des cellules HeLa par la méthode SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acid in Cell culture), a identifié deux sites de méthylation sur TLS : les arginines 215 et 217 du domaine riche en glycine (Ong et al., 2004). Cette étude n'exclut pas la possibilité que les arginines 514, 518, 521, 522 et 524 de TLS puissent être méthylées, du fait de leur localisation extrême en C-terminale. L'activité navette de TLS entre le noyau et le cytoplasme étant importante pour sa fonction (Zinszner et al., 1997), la rétention de TLS dans le cytoplasme pourrait nuire à sa fonction. On pourrait imaginer que TLS ne puisse plus aller chercher les ARNm cibles pour les transporter jusque dans dendrites. Chez FMRP, en revanche, sa méthylation est nécessaire à sa liaison avec l'ARN (Denman, 2002). On pourrait alors imaginer que TLS mutée ne puisse plus lier les ARNm cibles.

Ainsi, il serait intéressant d'étudier si les arginines rapportées comme étant mutées par l'étude des patients atteints d'ALS, sont effectivement des sites de méthylation et si ces méthylations sont impliquées dans la localisation de TLS et/ou sa capacité à lier les ARN.

Par ailleurs nous avons montré que TLS est largement exclu des noyaux des neurones d'hippocampe *in vivo* et en culture, alors que Kwiatkowski et Vance ont montré que TLS est nucléaire dans le cortex préfrontal et la moelle épinière de leurs contrôles (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Ainsi peut-on imaginer une localisation subcellulaire différente de TLS selon les régions cérébrales, la stimulation des neurones, ou s'agit-il d'une différence entre espèces ?

Par ailleurs, des agrégats intracellulaires de TLS ont été identifiés dans une maladie neurodégénérative peu connue, la maladie à inclusion intra-neuronale de filaments intermédiaires (NIFID, Neuronal Intermediate Filament Inclusion Disease) (Neumann et al., 2009a), sans que TLS soit mutée. Cette maladie présente au début les mêmes caractéristiques que la démence frontotemporale.

3. Les mutants de CHMP2B associés à une démence frontotemporale empêchent la maturation des épines dendritiques

Dans les cellules BHK, $CHMP2B^{wt}$ est exprimé de manière diffuse dans le cytoplasme, se concentrant parfois au niveau d'adhérences focales. Le mutant $CHMP2B^{intron5}$, s'agrège en amas ; il provoque la formation d'endosomes aberrants non fonctionnels.

Dans les neurones de la région CA1 de cerveau de souris, la microscopie immuno-électronique sur coupe de cerveau montre qu'une population détectable de CHMP2B endogène est localisée dans les épines dendritiques. En immunofluorescence, dans des cultures de neurones d'hippocampe de rat, CHMP2B endogène a une distribution homogène dans le cytoplasme des neurones, incluant l'axone, les dendrites et les épines dendritiques. En biochimie, l'expression de CHMP2B augmente avec la maturation des neurones d'hippocampe en culture. Ces observations sont compatibles avec un rôle de CHMP2B dans la biologie des épines.

Dans nos conditions de transfection, les neurones peuvent survivre longtemps après la transfection des plasmides codant les différentes constructions, sans induire de processus autophagique. La forme de type sauvage de CHMP2B ($CHMP2B^{wt}$) possède le même profil d'expression que CHMP2B endogène. Les mutants en revanche, forment des agrégats de tailles variables, localisés dans le soma et les neurites proximales. Ces agrégats ne sont pas des endosomes. Dans le cas du mutant $CHMP2B^{intron5}$, CHMP2B endogène est en partie piégé dans ces agrégats.

L'expression des mutants de CHMP2B, n'affecte pas la longueur moyenne des épines. En revanche, ils provoquent, par rapport au contrôle, une augmentation de la densité linéaire des épines dendritiques toutes confondues et une diminution du diamètre moyen des têtes des épines. Le mutant $CHMP2B^{intron5}$ provoque une augmentation du nombre des épines fines et

une diminution de la proportion des épines larges de type mushroom. De plus, chez des neurones matures, il induit une diminution de l'expression en surface de GluR2.
Le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$ quant à lui provoque une diminution de la densité des épines de type mushroom et stubby. Les mesures des fréquences et de l'amplitude des minis courants postsynaptiques excitateurs nous indiquent que le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$ provoque une diminution des courants de large amplitude ($i > 20$ pA) et une augmentation des courants de faible amplitude ($i < 5$ pA) ; en d'autres termes, l'expression du mutant provoque la réduction de la proportion de synapses fortes et augmente la proportion de synapses faibles.
L'extinction spécifique de CHMP2B endogène par le système de l'interférence de l'ARN provoque aussi une augmentation de la densité des épines dendritiques, et une diminution du diamètre moyen des épines dendritiques. Les mutants de CHMP2B agissent donc comme des mutants dominant négatifs de CHMP2B, au regard de la fonction de CHMP2B dans la morphogenèse des épines dendritiques.

Nous avons réalisé l'étude de la morphologie des épines dendritiques à l'aide du logiciel NeuronStudio. Des chercheurs expérimentés ont classé manuellement les épines de dendrites de neurones d'hippocampe en tranche par type; et la comparaison de leurs résultats avec ceux obtenus par le logiciel NeuronStudio, ont permis aux créateurs du logiciel de valider leur système de classification des épines (Rodriguez et al., 2008). Nous avons évalué la distribution des volumes des têtes des épines de neurones témoins, à l'aide du logiciel. Cette distribution est similaire à celle décrite par l'équipe de Yasumatsu lors de la modélisation mathématique de la dynamique des volumes des têtes d'épines dendritiques de neurones d'hippocampe en tranche (Yasumatsu et al., 2008). Par ailleurs, nos données concernant les volumes des têtes concordent aussi avec celles obtenues par la microscopie électronique de neurones d'hippocampe en culture (Boyer et al., 1998). En revanche, la densité obtenue dans nos expériences : 1 épine par µm à 15 jours de culture, diffère de celle obtenue par Boyer et al. : 0,59 épines par µm à 14 jours de culture. Cette différence pourrait être due au fait que nous ensemençons les neurones d'hippocampe près de deux fois plus densément que Boyer et al. (12000 cellules/cm^2 contre 6000 à 8000 cellules/cm^2 pour Boyer et al.) ; mais aussi, au fait que l'algorithme RayBurst utilisé par NeuronStudio, permet la détection d'un grand nombre de petites protubérances dendritiques par la combinaison d'un échantillonnage systématique de chaque petit domaine de surface dendritique, d'une segmentation locale entre signal et bruit de fond, et d'une interpolation entre pixels. De

nombreuses protubérances seraient en dessous de la résolution de Boyer et al. qui ont utilisé un microscope à fluorescence avec un objectif 60X. Par ailleurs, dans le cas de neurones en culture, l'épaisseur des piles d'images ne dépasse pas 7 µm, ce qui minimise les artéfacts de résolution dans l'axe z. Le logiciel reconnait donc de vraies épines dendritiques et les classe correctement.

Le logiciel nous a permis de comparer des populations entières (au total : 258 neurones, 225 140 épines et 24,5 cm de dendrites) et d'observer des différences significatives entre ces populations. Le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$ et l'expression des CHMP2B-shRNA, n'ont pas d'effet sur la viabilité neuronale et ont le même effet sur les épines dendritiques que le mutant CHMP2B^{intron5} ; ainsi l'action de CHMP2B^{intron5}, sur les épines est séparable du mécanisme de mort que ce mutant peut activer.

Ce travail a été mené dans des neurones d'hippocampe en culture, à partir de neurones fœtaux prélevés au 19ème jour de vie embryonnaire. Les neurones sont transfectés à 10 jours de vie *in vitro* (DIV). Seule une petite proportion des neurones de la culture exprime les mutants (environ 2 à 5 ‰). Dans le cerveau des patients, toutes les cellules : neurones, glie, cellules du système vasculaire etc. expriment les mutants. L'équipe de Yamanaka a montré que les astrocytes accéléraient la dégénérescence des axones dans l'ALS via la stimulation de la microglie (Yamanaka et al., 2008). Notre système de transfection de neurones en culture *in vitro* est donc incomplet. Pour se rapprocher des conditions *in vivo*, nous avons mis en place une collaboration avec le laboratoire du Dr. Loeffler afin d'établir une lignée de souris transgéniques exprimant le mutant CHMP2B^{intron5} dans le système nerveux central. Ces souris nous permettront de savoir si la perturbation sélective des neurones par CHMP2B^{intron5} suffit à déclencher la neurodégénérescence dans le contexte du tissu cérébral entier, éventuellement après un délai assez long.

Les neurones ont été transfectés après 10 DIV et observés à 15 DIV. À 10 DIV, la spinogenèse et la synaptogenèse sont en cours. De ce fait, il ne nous est pas possible de conclure si les mutants gênent l'élargissement des têtes des épines, ou s'ils gênent le maintien de l'élargissement des têtes, ou encore les deux. Pour répondre à cette question, nous pourrions transfecter les neurones après 15 DIV et les observer après 21 DIV. Entre 15 DIV et 21 DIV la densité d'épines dendritiques ne change pas. Nous pourrions mesurer la distribution des diamètres des têtes sur neurones fixés ; ou filmer les neurones vivants et évaluer la stabilité d'épines individuelles au cours du temps. Si CHMP2B intervient dans le maintien des

épines alors, les épines des neurones exprimant les mutants devraient rétrécir plus souvent par rapport au contrôle. Dans des neurones transfectés à 15 DIV, le mutant CHMP2B^{intron5} provoque en 24h une diminution de l'expression en surface de la sous-unité GluR2. Vu le rôle de GluR2 dans la spinogenèse, ceci nous indique que CHMP2B pourrait être requis aussi pour le maintien des épines dendritiques.

Les patients atteints de démence frontotemporale dans laquelle le gène de CHMP2B est muté, expriment dans toutes leurs cellules les deux mutants de CHMP2B. Il serait intéressant de co-transfecter les deux mutants et d'évaluer si les effets sur les épines dendritiques sont accentués. Le fait que toutes les cellules expriment les mutants et que seuls les neurones manifestent une atteinte, laisse penser que CHMP2B joue un rôle primordial dans le système nerveux. Les cerveaux de ces patients, montrent des agrégats d'ubiquitine positifs pour la protéine p62 (protéine liant les polyubiquitine et interagissant avec la protéine autophagique LC3) (Holm et al., 2007). Ces données et celles des équipes de Gao et Simonsen (Filimonenko et al., 2007; Lee et al., 2007; Lee and Gao, 2009), suggèrent que CHMP2B est effectivement liée au processus autophagique. Cependant, dans nos conditions la protéine LC3-GFP, n'est pas recrutée systématiquement et complètement au niveau des amas de CHMP2B^{intron5}. Il serait intéressant d'étudier si une expression prolongée des mutants par des neurones d'hippocampe en culture, conduit à une accumulation nette de LC3-GFP ; et d'évaluer si leurs effets sur les épines dendritiques s'accentuent. Nos observations sont peut être les manifestions précoces de l'atteinte des mutants sur les neurones. Depuis le travail de Holm en 2007, qui montre la présence d'agrégats d'ubiquitine dans les cellules granulaires de l'hippocampe (Holm et al., 2007) ; la culture de neurones d'hippocampe et l'expression des mutants, à des doses raisonnables, par les neurones apparaissent comme un modèle de la maladie.

L'équipe de Gao a montré que la forme de type sauvage de CHMP2B ne s'associe pas dans les cellules Hek avec CHMP2B^{intron5}. Cependant, nous avons montré la présence de CHMP2B endogène dans les grains de CHMP2B^{intron5}. Il ne peut pas s'agir de réaction croisée, puisque l'anticorps anti-CHMP2B fabriqué par AbCam reconnait les derniers acides aminés de CHMP2B ; et que les extrémités C-terminales des membres de la famille CHMP sont très différentes. La présence de la protéine endogène dans les grains de CHMP2B^{intron5} peut être justifiée par la présence d'un partenaire, comme CHMP3. Le dimère CHMP3/CHMP2B peut

interagir avec VPS4 ; or VPS4 se multimérise et peut interagir en même temps avec douze protéines à domaine MIT. La présence de VPS4 dans les grains de CHMP2B^{intron5} devra être étudiée.

En dehors de la protéine endogène piégée dans les grains de CHMP2B^{intron5}, nous n'avons pas pu identifier d'autres protéines associées. Il ne semble pas s'agir d'endosomes. Nous avons réalisé des marquages de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA, de PSD95 et de l'actine filamenteuse ; ces marquages se sont révélés négatifs (données non montrées). Pourtant, l'équipe de Gao avait identifié la sous-unité NR1 dans les agrégats de CHMP2^{intron5} dans des neurones corticaux en culture. Une fois encore est-ce que l'expression prolongée de CHMP2B^{intron5} laisserait apparaître la présence de la sous-unité NR1 ?

Les mutants de CHMP2B diminuent le nombre de synapses fortes (les épines de type mushroom et stubby) et augmentent le nombre de synapses faibles (les épines fines) ; ainsi la distribution des courants est perturbée. Comment s'intègrent les inputs excitateurs dans les neurones exprimant les mutants ? Les mesures en électrophysiologie des courants postsynaptiques excitateurs miniatures, de neurones exprimant le mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$, montrent une réduction de la proportion de synapses fortes et une augmentation la proportion de synapses faibles. Ces mesures doivent être répétées sur des neurones exprimant les CHMP2B-shRNA.

L'augmentation de la capacitance, est en principe due à une augmentation de la surface membranaire. Dans le cas de la surexpression de CHMP2B^{wt}, ce phénomène pourrait s'expliquer par une augmentation de l'arborisation dendritique. En effet, Sweeney et al. ont montré chez la Drosophile, que l'arborisation dendritique dépend de la dose de CHMP4 (Sweeney et al., 2006). Dans le cas de l'expression du mutant CHMP2B$^{\Delta 10}$, l'augmentation de la densité des épines dendritiques qui n'a lieu que dans une proportion limitée des neurones, pourrait expliquer l'augmentation de la moyenne et de la variance de la capacitance.

3.1. Formation de polymères de CHMP2B dans les neurones

L'équipe de Gao a montré que dans les neurones corticaux, la protéine CHMP2B^{intron5} s'agrège et piège CHMP4A, aussi il serait intéressant de tester si dans nos conditions, d'une part les agrégats de CHMP2B^{intron5} piègent aussi CHMP4A et d'autre part s'ils piègent d'autres ESCRT, en particulier le partenaire de CHMP2B, CHMP3.

Les isoformes des ESCRT-III semblent avoir dans les neurones, des rôles bien définis. En effet, Lee et ses collaborateurs indiquent qu'à 3 DIV, l'extinction de CHMP4A empêche la mise en place de l'arborisation dendritique, alors que l'extinction de CHMP4C n'a aucun effet sur l'arborisation dendritique (Lee et al., 2007). CHMP2A joue-t-elle un rôle dans la morphogenèse des épines dendritiques ? L'alignement des séquences de CHMP2A et de CHMP2B indique une forte homologie des 188 premiers acides aminés, mais une grande différence des 25 derniers acides aminés, c'est à dire de la dernière hélice α. Ainsi CHMP2A et CHMP2B peuvent avoir des partenaires spécifiques ou faire l'objet de régulations différentes.
Cependant, cette forte homologie de séquence entre CHMP2A et CHMP2B dans les 188 premiers acides aminés suggère que CHMP2BΔC puisse comme CHMP2AΔC, former des tubes en association avec CHMP3 (Lata et al., 2008b). Afin d'évaluer si la fonction de CHMP2B dans la morphogenèse des épines dendritiques dépend de son interaction avec CHMP3, nous pourrions éteindre l'expression de CHMP3 dans les neurones à l'aide de shRNA, et étudier la morphologie des épines.
CHMP2B doit elle être délétée de sa partie C-terminale pour polymériser *in vivo* avec CHMP3 dans les neurones ? Si CHMP2B et CHMP3 forment des polymères, quelle est leur stabilité ?

Le mutant CHMP2B^{intron5} provoque une diminution de la proportion des épines larges, mais cette diminution est due à une augmentation du nombre d'épines fines. Les filopodes sont des structures très fines, en tubes. La formation de polymères de CHMP2B pourrait être à l'origine de ces tubes. Ce point peut être rapproché du fait que la surexpression de CHMP4 dans des cellules de mammifères produit, en présence de VPS4 catalytiquement inactive, des filaments qui pointent à l'extérieur de la cellule (Hanson et al. 2008). Nous pourrions imaginer que les filopodes aient dans les neurones exprimant CHMP2B^{intron5}, des difficultés pour se stabiliser et développer une tête ; et que les neurones compensent la petite taille des épines et donc des synapses, par une augmentation du nombre d'épines. Nous pourrions dans un premier temps étudier la formation des filopodes. CHMP2B est-il exprimé dans les filopodes ? Quels sont les effets des mutants sur le nombre et la longueur des filopodes ?

L'équipe de Williams a montré que Vps24 (homologue de CHMP3 dans la levure) est capable de former, seul, des filaments *in vitro* ; ces filaments peuvent être branchés (Ghazi-Tabatabai

et al., 2008). Gilles Bodon en thèse au laboratoire a réalisé des expériences de pull down à partir d'un homogénat de cerveau de rat. Les protéines purifiées par affinité pour la forme de type sauvage, et pour la partie C-terminale de CHMP2B ont été identifiées par spectroscopie de masse. La sous unité 4 du complexe ARP2/3 a été identifiée en complexe avec la partie C-terminale de CHMP2B. ARP2/3 est un complexe formé de 7 sous-unités, jouant un rôle majeur dans la régulation du cytosquelette d'actine. ARP2/3 sert de site de nucléation pour les filaments d'actine, il permet l'émergence d'un nouveau filament fils à partir d'un filament père ; et ainsi la création d'un réseau branché de filaments d'actine. La formation d'un réseau de filaments d'actine est particulièrement requise pour le grossissement et le maintien des épines dendritiques. Le complexe ARP2/3 joue une rôle clé dans la régulation de la morphologie des épines dendritiques (Kim et al., 2006b) ; il est notamment nécessaire au grossissement de la tête (Hotulainen et al., 2009). Le phénotype des épines de neurones déficients en ARP2/3 ressemble à celui des épines après extinction de CHMP2B, ou expression des mutants de CHMP2B. CHMP2B via son interaction avec le complexe ARP2/3, intervient-elle dans la régulation de la nucléation des filaments d'actine ? Si CHMP2B forme des filaments dans les neurones, le complexe ARP2/3 participe-t-il à la nucléation de ces filaments ?

Dans le cas des mutants, la dynamique des filaments pourrait être affectée par le fait qu'ils ne peuvent plus interagir avec l'ATPase VPS4 et qu'alors les filaments ne puissent être désassemblés. La nucléation des filaments potentiels de CHMP2B pourrait être affectée par les mutants par le fait qu'ils ne peuvent potentiellement plus interagir avec ARP2/3. Dans les deux cas, l'expression des mutants conduit à une diminution de la taille des têtes des épines.

L'équipe d'Emr a décrit dans la levure une stœchiométrie de l'assemblage des ESCRT-III : Les protéines Vps20 (CHMP6) + Snf7 (CHMP4) + Vps24 (CHMP3) + Vps2 (CHMP2) s'assemblent selon les proportions respectives de 1 : 10 : 5 : 3 (Saksena et al. 2009). Ainsi, l'assemblage ordonné du complexe ESCRT-III comprend trois étapes : la nucléation à partir de CHMP6 des filaments de CHMP4, la polymérisation de CHMP4, puis le capping de ces filaments par des hétéropolymères de CHMP3-CHMP2. Une telle stœchiométrie existe-t-elle dans les neurones et si oui, les mutants de CHMP2B ($CHMP2B^{intron5}$ et $CHMP2B^{\Delta 10}$) peuvent-ils encore jouer le rôle de capping ? Dans le cas où ils ne pourraient plus chapeauter les filaments de CHMP4, y a-t-il une polymérisation de CHMP4 en excès ? Dans le cas où ils peuvent encore chapeauter les filaments de CHMP4, le

fait qu'ils ne peuvent plus recruter l'ATPase VPS4, conduit il à l'impossibilité de désassembler le complexe ESCRT-III ?
Qu'en est-t-il du processus de vésiculation dans les neurones exprimant les mutants de CHMP2B ? Ont-ils des corps multivésiculés ?

3.2. Implication de CHMP2B dans le recyclage de protéines membranaires

Gilles a aussi identifié grâce à la spectrométrie de masse une interaction entre la partie C-terminale de CHMP2B et la petite protéine Rab11. Dans les neurones, Rab11 est sollicitée au niveau des endosomes de recyclage et joue un rôle majeur dans le processus de potentialisation à long terme (Brown et al., 2007). CHMP2B pourrait être impliquée dans le tri de récepteur et leur envoi vers la voie de recyclage. Gilles teste actuellement la capacité de CHMP2B à contrôler le recyclage de récepteurs dans une lignée cellulaire.

3.3. Implication de CHMP2B dans la dynamique des mitochondries

L'analyse des cerveaux de souris en microscopie électronique à révélé la présence de CHMP2B dans les mitochondries. Les mitochondries sont des organelles extrêmement dynamiques. Elles se divisent activement (fission) et fusionnent avec d'autres mitochondries (fusion) ; et sont transportées activement dans les axones et les dendrites. Les fissions et fusions mitochondriales sont importantes pour maintenir leur l'intégrité, leurs propriétés électriques et biochimiques, et pour proteger l'ADN mitochondrial. Des anomalies de la fission et de la fusion des mitochondries ont été impliquées notamment dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson ; et des dysfonctionnements des mitochondries ont été identifiés dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Knott et al., 2008). Les mitochondries jouent un rôle primordial dans les neurones où elles participent à la synaptogenèse, à la spinogenèse, et à la plasticité synaptique (Li et al., 2004). La fission des membranes mitochondriales requiert une courbure de la membrane externe, au niveau de laquelle la protéine DRP1 (Dynamin-Related Protein 1) serait recrutée et permettrait la fission de la mitochondrie. Notre hypothèse est que CHMP2B pourrait participer à la courbure des membranes et leur fission. Dans un fractionnement subcellulaire de cerveau de rat, Gilles a identifié CHMP2B à l'intérieur de membranes, dans la fraction mitochondriale. Gilles est en train de caractériser le phénotype des mitochondries de cellules dont l'expression de

CHMP2B a été éteinte. Les premiers résultats dans les neurones d'hippocampe, indiquent que l'extinction de CHMP2B endogène par les sh-RNA, provoque une augmentation de la longueur moyenne des mitochondries ; et l'utilisation de la forme de CHMP2B résistante aux sh-RNA permet de restaurer une longueur normale.
Ainsi, CHMP2B, et peut être les protéines du complexe ESCRT-III, auraient un nouveau rôle biologique, en relation avec leur capacité à interagir et à déformer les membranes ; elles interviendraient dans la dynamique membranaire des mitochondries.

3.4. Les complexes ESCRT impliqués dans la régulation du transport et de la traduction locale d'ARNm dans les neurones ?

Les protéines du complexe ESCRT-II sont impliquées dans la localisation antérieur de l'ARNm bicoïd dans l'embryon de Drosophile, indispensable à la mise en place d'un gradient morphogène le long de l'axe antéropostérieur ; et interagissent avec la protéine, bien connue du transport et de la régulation de la traduction des ARNm, Staufen (Irion and St Johnston, 2007).

Dans les neurones, les ARNm sont aussi présents au niveau des corps P (P-bodies, Processing-bodies) et des corps GW (GW-bodies, GW182 bodies). Les P-bodies et les GW-bodies sont des foci cytoplasmiques impliqués dans la régulation de la traduction, du stockage et de la dégradation des ARNm. Il a été récemment montré que les P-bodies et les GW-bodies, sont associés aux MVB et que la répression des ESCRT (0, I et II) provoque un dysfonctionnement des P- et GW-bodies (Gibbings et al., 2009). Malheureusement, il n'y a pas de données concernant la répression du complexe ESCRT-III. Dans les neurones, les MVB sont localisés au pied des épines dendritiques et peuvent donc être influencés par des signaux électriques et/ou biochimiques provenant de la synapse.

Le facteur d'épissage TDP-43 a été localisé dans les dendrites de neurones d'hippocampe en culture en association à de l'ARN (Wang et al., 2008a). De plus, la stimulation des neurones par la dépolarisation de leur membrane, favorise la liaison de TDP-43 à l'ARNm de l'actine-β et de la CamkIIα, provoque la relocalisation de TDP-43 dans les épines dendritiques ; et favorise l'assemblage de TDP-43 avec les protéines Staufen et FMRP. Le facteur d'épissage TDP-43 joue donc un rôle dans la régulation du transport et la traduction locale d'ARNm en

réponse à un stimulus neuronal. Par ailleurs, l'équipe de Shen, montre aussi que la dépolarisation induit la colocalisation de TDP-43 avec la protéine GW182, marqueur des GW bodies (Wang et al., 2008a).

Ces données mises ensemble suggèrent un rôle des ESCRT, via les MVB, dans la régulation locale de la traduction d'ARNm en réponse à l'activité neuronale.

Dans de nombreuses FTD, le facteur d'épissage TDP-43 s'accumule en agrégats intracytoplasmiques, sans pour autant être muté. Or TDP-43 est impliqué dans le transport d'ARNm dans les dendrites. Ces données suggèrent que le transport des ARNm pourrait être perturbé dans les FTD. Chez les patients portant la mutation dans le gène de CHMP2B, il n'y a pas d'agrégation de TDP-43 (Holm IE, 2007) ; et l'équipe de Simonsen a montré, dans des cellules HeLa, que TDP-43 ne s'accumule pas dans les agrégats p62 positifs exprimant les mutants $CHMP2^{intron5}$ et $CHMP2B^{\Delta 10}$ (Filimonenko et al., 2007).
Cependant, les granules transporteurs d'ARN dans les neurones, peuvent être de plusieurs types, par exemple les granules positifs pour Staufen, ne transportent pas les même ARNm que les granules composés de FMRP. Nous pourrions imaginer que CHMP2B soit nécessaire à d'autres types de granules, par exemple ceux composés des facteurs d'épissage Sam68 ou TLS.

Références Bibliographiques

A

Ackermann M, Matus A. 2003. Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. Nat Neurosci 6:1194-1200.

Agromayor M, Martin-Serrano J. 2006. Interaction of AMSH with ESCRT-III and Deubiquitination of Endosomal Cargo. J. Biol. Chem. 281:23083-23091.

Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL. 2007. Distinct structural and ionotropic roles of NMDA receptors in controlling spine and synapse stability. J Neurosci 27:7365-7376.

Araya R, Eisenthal KB, Yuste R. 2006a. Dendritic spines linearize the summation of excitatory potentials. Proc Natl Acad Sci U S A 103:18799-18804.

Araya R, Jiang J, Eisenthal KB, Yuste R. 2006b. The spine neck filters membrane potentials. Proc Natl Acad Sci U S A 103:17961-17966.

B

Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD. 2002a. Escrt-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. Developmental Cell 3:271-282.

Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD. 2002b. Endosome-Associated Complex, ESCRT-II, Recruits Transport Machinery for Protein Sorting at the Multivesicular Body. Developmental Cell 3:283-289.

Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD. 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. Embo J 17:2982-2993.

Baechtold H, Kuroda M, Sok J, Ron D, Lopez BS, Akhmedov AT. 1999. Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. J Biol Chem 274:34337-34342.

Baloyannis SJ, Manolidis SL, Manolidis LS. 1992. The acoustic cortex in Alzheimer's disease. Acta Otolaryngol Suppl 494:1-13.

Baloyannis SJ, Manolidis SL, Manolidis LS. 1995. Synaptic alterations in acoustic cortex in Creutzfeldt-Jacob disease. Acta Otolaryngol 115:202-205.

Baloyannis SJ, Manolidis SL, Manolidis LS. 2001. The acoustic cortex in frontal dementia. Acta Otolaryngol 121:289-292.

Barr FA, Gruneberg U. 2007. Cytokinesis: Placing and Making the Final Cut. Cell 131:847-860.

Barrionuevo G, Schottler F, Lynch G. 1980. The effects of repetitive low frequency stimulation on control and "potentiated" synaptic responses in the hippocampus. Life Sci 27:2385-2391.

Beattie EC. 2000. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. Nature Neurosci. 3:1291-1300.

Beaumelle BD, Gibson A, Hopkins CR. 1990. Isolation and preliminary characterization of the major membrane boundaries of the endocytic pathway in lymphocytes. J Cell Biol 111:1811-1823.

Ben Fredj N, Grange J, Sadoul R, Richard S, Goldberg Y, Boyer V. 2004. Depolarization-induced translocation of the RNA-binding protein Sam68 to the dendrites of hippocampal neurons. J Cell Sci 117:1079-1090.

Benajiba L, Le Ber I, Camuzat A, Lacoste M, Thomas-Anterion C, Couratier P, Legallic S, Salachas F, Hannequin D, Decousus M, Lacomblez L, Guedj E, Golfier V, Camu W, Dubois B, Campion D, Meininger V, Brice A. 2009. TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. Ann Neurol 65:470-473.

Bertrand P, Akhmedov AT, Delacote F, Durrbach A, Lopez BS. 1999. Human POMp75 is identified as the pro-oncoprotein TLS/FUS: both POMp75 and POMp100 DNA homologous pairing activities are associated to cell proliferation. Oncogene 18:4515-4521.

Bieniasz PD. 2006. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. Virology 344:55-63.

Blanpied TA, Scott DB, Ehlers MD. 2002. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. Neuron 36:435-449.

Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 232:331-356.

Blomberg F, Cohen RS, Siekevitz P. 1977. The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. II. Characterization and arrangement of some of the major proteins within the structure. J Cell Biol 74:204-225.

Bockers TM, Segger-Junius M, Iglauer P, Bockmann J, Gundelfinger ED, Kreutz MR, Richter D, Kindler S, Kreienkamp HJ. 2004. Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. Mol Cell Neurosci 26:182-190.

Bourne J, Harris KM. 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? Curr Opin Neurobiol 17:381-386.

Boyer C, Schikorski T, Stevens CF. 1998. Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. J Neurosci 18:5294-5300.

Bozdagi O, Shan W, Tanaka H, Benson DL, Huntley GW. 2000. Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. Neuron 28:245-259.

Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K. 2009. The Arc of synaptic memory. Exp Brain Res.

Bramham CR, Wells DG. 2007. Dendritic mRNA: transport, translation and function. Nat Rev Neurosci 8:776-789.

Brown TC, Correia SS, Petrok CN, Esteban JA. 2007. Functional Compartmentalization of Endosomal Trafficking for the Synaptic Delivery of AMPA Receptors during Long-Term Potentiation. J. Neurosci. 27:13311-13315.

C

Cajal. Roy. 1888. Estructura de los centros nerviosos de las aves. Rev. Trim. Histol. Norm. Patol.:1–10.

Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH. 2006. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci 29:77-103.

Carlton JG, Martin-Serrano J. 2007. Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding: A Role for the ESCRT Machinery. Science 316:1908-1912.

Carroll RC, Beattie EC, Xia H, Luscher C, Altschuler Y, Nicoll RA, Malenka RC, von Zastrow M. 1999a. Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 96:14112-14117.

Carroll RC, Lissin DV, von Zastrow M, Nicoll RA, Malenka RC. 1999b. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. Nat Neurosci 2:454-460.

Casey M, Maguire C, Kelly A, Gooney MA, Lynch MA. 2002. Analysis of the presynaptic signaling mechanisms underlying the inhibition of LTP in rat dentate gyrus by the tyrosine kinase inhibitor, genistein. Hippocampus 12:377-385.

Castren E, Pitkanen M, Sirvio J, Parsadanian A, Lindholm D, Thoenen H, Riekkinen PJ. 1993. The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus. Neuroreport 4:895-898.

Catala I, Ferrer I, Galofre E, Fabregues I. 1988. Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in dementia. A quantitative Golgi study on biopsy samples. Hum Neurobiol 6:255-259.

Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST. 2003. Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. Hum Mol Genet 12:3295-3305.

Chen X, Vinade L, Leapman RD, Petersen JD, Nakagawa T, Phillips TM, Sheng M, Reese TS. 2005a. Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. Proc Natl Acad Sci U S A 102:11551-11556.

Chen X, Winters C, Azzam R, Li X, Galbraith JA, Leapman RD, Reese TS. 2008a. Organization of the core structure of the postsynaptic density. Proc Natl Acad Sci U S A 105:4453-4458.

Chen Y, Bourne J, Pieribone VA, Fitzsimonds RM. 2004. The role of actin in the regulation of dendritic spine morphology and bidirectional synaptic plasticity. Neuroreport 15:829-832.

Chen Y, Stevens B, Chang J, Milbrandt J, Barres BA, Hell JW. 2008b. NS21: re-defined and modified supplement B27 for neuronal cultures. J Neurosci Methods 171:239-247.

Chen ZY, Ieraci A, Tanowitz M, Lee FS. 2005b. A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. Mol Biol Cell 16:5761-5772.

Chicurel ME, Harris KM. 1992. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. J Comp Neurol 325:169-182.

Chio A, Restagno G, Brunetti M, Ossola I, Calvo A, Mora G, Sabatelli M, Monsurro MR, Battistini S, Mandrioli J, Salvi F, Spataro R, Schymick J, Traynor BJ, La Bella V. 2009. Two Italian kindreds with familial amyotrophic lateral sclerosis due to FUS mutation. Neurobiol Aging 30:1272-1275.

Cho SJ, Jung JS, Ko BH, Jin I, Moon IS. 2004. Presence of translation elongation factor-1A (eEF1A) in the excitatory postsynaptic density of rat cerebral cortex. Neurosci Lett 366:29-33.

Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc 1:581-585.
Choquet D, Triller A. 2003. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. Nat Rev Neurosci 4:251-265.
Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. 1983. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. J Physiol 334:33-46.
Colonnier M. 1968. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. Brain Res 9:268-287.
Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. 1997. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. Proc Natl Acad Sci U S A 94:5401-5404.
Cooney JR, Hurlburt JL, Selig DK, Harris KM, Fiala JC. 2002. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. J Neurosci 22:2215-2224.
Cote J, Boisvert FM, Boulanger MC, Bedford MT, Richard S. 2003. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. Mol Biol Cell 14:274-287.
Crozat A, Aman P, Mandahl N, Ron D. 1993. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. Nature 363:640-644.

D

Dahm R, Kiebler M, Macchi P. 2007. RNA localisation in the nervous system. Semin Cell Dev Biol 18:216-223.
Dailey ME, Smith SJ. 1996. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. J Neurosci 16:2983-2994.
Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME. 2000. EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. Cell 103:945-956.
Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. 1983. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A 80:2258-2262.
De Roo M, Klauser P, Mendez P, Poglia L, Muller D. 2008. Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. Cereb Cortex 18:151-161.
De Ruiter JP, Uylings HB. 1987. Morphometric and dendritic analysis of fascia dentata granule cells in human aging and senile dementia. Brain Res 402:217-229.
DeKosky ST, Scheff SW. 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. Ann Neurol 27:457-464.
Demoor J. 1896. La plasticité morphologique des neurones cérébraux. Arch. Biol. Bruxelles 14:723-752.
Denman RB. 2002. Methylation of the arginine-glycine-rich region in the fragile X mental retardation protein FMRP differentially affects RNA binding. Cell Mol Biol Lett 7:877-883.
Desmond NL, Levy WB. 1986a. Changes in the numerical density of synaptic contacts with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus. J Comp Neurol 253:466-475.
Desmond NL, Levy WB. 1986b. Changes in the postsynaptic density with long-term potentiation in the dentate gyrus. J Comp Neurol 253:476-482.
Desmond NL, Levy WB. 1990. Morphological correlates of long-term potentiation imply the modification of existing synapses, not synaptogenesis, in the hippocampal dentate gyrus. Synapse 5:139-143.
Dubnau J, Chiang AS, Grady L, Barditch J, Gossweiler S, McNeil J, Smith P, Buldoc F, Scott R, Certa U, Broger C, Tully T. 2003. The staufen/pumilio pathway is involved in Drosophila long-term memory. Curr Biol 13:286-296.
Dudek SM, Bear MF. 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. Proc Natl Acad Sci U S A 89:4363-4367.
Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R. 1999. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 96:13438-13443.

E

Ehlers MD. 2000. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. Neuron 28:511-525.
Ehrlich I, Klein M, Rumpel S, Malinow R. 2007. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. Proc Natl Acad Sci U S A 104:4176-4181.
Ehrlich I, Malinow R. 2004. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. J Neurosci 24:916-927.
Einstein G, Buranosky R, Crain BJ. 1994. Dendritic pathology of granule cells in Alzheimer's disease is unrelated to neuritic plaques. J Neurosci 14:5077-5088.

El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Bredt DS. 2000. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. Science 290:1364-1368.

El Hachimi KH, Foncin JF. 1990. [Loss of dendritic spines in Alzheimer's disease]. C R Acad Sci III 311:397-402.

Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong XK, Serrano A, Fan X, del Rayo Sanchez-Carbente M, Servant F, Bell AW, Boismenu D, Lacaille JC, McPherson PS, DesGroseillers L, Sossin WS. 2006. Characterization of an RNA granule from developing brain. Mol Cell Proteomics 5:635-651.

Engert F, Bonhoeffer T. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. Nature 399:66-70.

Eom T, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ. 2003. Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. J Neurosci 23:10433-10444.

Eskelinen EL, Saftig P. 2009. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. Biochim Biophys Acta 1793:664-673.

F

Ferrante RJ, Kowall NW, Richardson EP, Jr. 1991. Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. J Neurosci 11:3877-3887.

Ferrer I, Gullotta F. 1990. Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. Acta Neuropathol 79:680-685.

Ferrer I, Roig C, Espino A, Peiro G, Matias Guiu X. 1991. Dementia of frontal lobe type and motor neuron disease. A Golgi study of the frontal cortex. J Neurol Neurosurg Psychiatry 54:932-934.

Fiala BA, Joyce JN, Greenough WT. 1978. Environmental complexity modulates growth of granule cell dendrites in developing but not adult hippocampus of rats. Exp Neurol 59:372-383.

Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. 1998. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. J Neurosci 18:8900-8911.

Field MC, Dacks JB. 2009. First and last ancestors: reconstructing evolution of the endomembrane system with ESCRTs, vesicle coat proteins, and nuclear pore complexes. Curr Opin Cell Biol 21:4-13.

Fifkova E, Anderson CL. 1981. Stimulation-induced changes in dimensions of stalks of dendritic spines in the dentate molecular layer. Exp Neurol 74:621-627.

Fifkova E, Delay RJ. 1982. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. J Cell Biol 95:345-350.

Fifkova E, Van Harreveld A. 1977. Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of the entorhinal area. J Neurocytol 6:211-230.

Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerod L, Fisher EMC, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A. 2007. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. J. Cell Biol. 179:485-500.

Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. Neuron 20:847-854.

Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, Matus A. 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. Nat Neurosci 3:887-894.

Fonseca R, Vabulas RM, Hartl FU, Bonhoeffer T, Nagerl UV. 2006. A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. Neuron 52:239-245.

Foster M, Sherrington C. 1897. A Textbook of Physiology. Part III. The Central Nervous System. London: MacMillan & Co.

Fujii R, Okabe S, Urushido T, Inoue K, Yoshimura A, Tachibana T, Nishikawa T, Hicks GG, Takumi T. 2005. The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology. Curr Biol 15:587-593.

Fujii R, Takumi T. 2005. TLS facilitates transport of mRNA encoding an actin-stabilizing protein to dendritic spines. J Cell Sci 118:5755-5765.

Fujii S, Saito K, Miyakawa H, Ito K, Kato H. 1991. Reversal of long-term potentiation (depotentiation) induced by tetanus stimulation of the input to CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. Brain Res 555:112-122.

Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K. 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. Neuron 38:447-460.

G

Garcia-Lopez P, Garcia-Marin V, Freire M. 2007. The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. Prog Neurobiol 83:110-130.

Gertz HJ, Cervos-Navarro J, Ewald V. 1987. The septo-hippocampal pathway in patients suffering from senile dementia of Alzheimer's type. Evidence for neuronal plasticity? Neurosci Lett 76:228-232.

Ghazi-Tabatabai S, Saksena S, Short JM, Pobbati AV, Veprintsev DB, Crowther RA, Emr SD, Egelman EH, Williams RL. 2008. Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. Structure 16:1345-1356.

Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. 2009. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. Nat Cell Biol 11:1143-1149.

Giorgi C, Yeo GW, Stone ME, Katz DB, Burge C, Turrigiano G, Moore MJ. 2007. The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression. Cell 130:179-191.

Goetze B, Tuebing F, Xie Y, Dorostkar MM, Thomas S, Pehl U, Boehm S, Macchi P, Kiebler MA. 2006. The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. J. Cell Biol. 172:221-231.

Grange J, Belly A, Dupas S, Trembleau A, Sadoul R, Goldberg Y. 2009. Specific interaction between Sam68 and neuronal mRNAs: implication for the activity-dependent biosynthesis of elongation factor eEF1A. J Neurosci Res 87:12-25.

Grange J, Boyer V, Fabian-Fine R, Fredj NB, Sadoul R, Goldberg Y. 2004. Somatodendritic localization and mRNA association of the splicing regulatory protein Sam68 in the hippocampus and cortex. J Neurosci Res 75:654-666.

Grant BD, Donaldson JG. 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol 10:597-608.

Gray EG. 1959. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. Nature 183:1592-1593.

Gray NW, Weimer RM, Bureau I, Svoboda K. 2006. Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex in vivo. PLoS Biol 4:e370.

Greenough WT, Volkmar FR, Juraska JM. 1973. Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. Exp Neurol 41:371-378.

Griffiths G, Gruenberg J. 1991. The arguments for pre-existing early and late endosomes. Trends Cell Biol 1:5-9.

Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S. 1988. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. Cell 52:329-341.

Grimes ML, Beattie E, Mobley WC. 1997. A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. Proc Natl Acad Sci U S A 94:9909-9914.

Grutzendler J, Kasthuri N, Gan WB. 2002. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. Nature 420:812-816.

H

Hall A. 1994. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. Annu Rev Cell Biol 10:31-54.

Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE. 2008. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. J. Cell Biol.:jcb.200707031.

Hanson PI, Shim S, Merrill SA. 2009. Cell biology of the ESCRT machinery. Curr Opin Cell Biol 21:568-574.

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. Nature 441:885-889.

Harris EW, Ganong AH, Cotman CW. 1984. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. Brain Res 323:132-137.

Harris K, Stevens J. 1989. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. J. Neurosci. 9:2982-2997.

Harris KM, Jensen FE, Tsao B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. J Neurosci 12:2685-2705.

Havik B, Rokke H, Bardsen K, Davanger S, Bramham CR. 2003. Bursts of high-frequency stimulation trigger rapid delivery of pre-existing alpha-CaMKII mRNA to synapses: a mechanism in dendritic protein synthesis during long-term potentiation in adult awake rats. Eur J Neurosci 17:2679-2689.

Hayashi Y. 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. Science 287:2262-2267.

Hering H, Lin CC, Sheng M. 2003. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. J Neurosci 23:3262-3271.

Hering H, Sheng M. 2003. Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. J Neurosci 23:11759-11769.

Heuser J. 1989. The role of coated vesicles in recycling of synaptic vesicle membrane. Cell Biol Int Rep 13:1063-1076.

Hicks GG, Singh N, Nashabi A, Mai S, Bozek G, Klewes L, Arapovic D, White EK, Koury MJ, Oltz EM, Van Kaer L, Ruley HE. 2000. Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. Nat Genet 24:175-179.

Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD. 1991. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. Am J Med Genet 41:289-294.

Holm IE EE, Mackenzie IR, Johannsen P, Isaacs AM. 2007. A Reassessment of the Neuropathology of Frontotemporal Dementia Linked to Chromosome 3. J Neuropathol Exp Neurol. 66:884-891.

Holm IE, Englund E, Mackenzie IRA, Johannsen P, Isaacs AM. 2007. A Reassessment of the Neuropathology of Frontotemporal Dementia Linked to Chromosome 3. J Neuropathol Exp Neurol. 66:884-891.

Holtmaat AJ, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW, Svoboda K. 2005. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. Neuron 45:279-291.

Hosokawa T, Rusakov DA, Bliss TV, Fine A. 1995. Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. J Neurosci 15:5560-5573.

Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpaa K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P. 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. J Cell Biol 185:323-339.

Hou L, Antion MD, Hu D, Spencer CM, Paylor R, Klann E. 2006. Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. Neuron 51:441-454.

Huang F, Chotiner JK, Steward O. 2005. The mRNA for elongation factor 1alpha is localized in dendrites and translated in response to treatments that induce long-term depression. J Neurosci 25:7199-7209.

Hung AY, Futai K, Sala C, Valtschanoff JG, Ryu J, Woodworth MA, Kidd FL, Sung CC, Miyakawa T, Bear MF, Weinberg RJ, Sheng M. 2008. Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. J Neurosci 28:1697-1708.

Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG. 2000. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. Nat Neurosci 3:661-669.

Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dictenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH. 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. Nature 438:512-515.

I

Iki J, Inoue A, Bito H, Okabe S. 2005. Bi-directional regulation of postsynaptic cortactin distribution by BDNF and NMDA receptor activity. Eur J Neurosci 22:2985-2994.

Im YJ, Wollert T, Boura E, Hurley JH. 2009. Structure and function of the ESCRT-II-III interface in multivesicular body biogenesis. Dev Cell 17:234-243.

Irion U, St Johnston D. 2007. bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. Nature 445:554-558.

Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowski PB, Swain RA, Weiler IJ, Greenough WT. 2001. Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. Am J Med Genet 98:161-167.

Ishii N, Owada Y, Yamada M, Miura S, Murata K, Asao H, Kondo H, Sugamura K. 2001. Loss of neurons in the hippocampus and cerebral cortex of AMSH-deficient mice. Mol Cell Biol 21:8626-8637.

Itoh M, Haga I, Li QH, Fujisawa J. 2002. Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. Nucleic Acids Res 30:5452-5464.

J

Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Garner CC, Tsien RY, Ellisman MH, Malenka RC. 2004. Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. Nat Neurosci 7:244-253.

K

Kacharmina JE, Job C, Crino P, Eberwine J. 2000. Stimulation of glutamate receptor protein synthesis and membrane insertion within isolated neuronal dendrites. Proc Natl Acad Sci U S A 97:11545-11550.

Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. Neuron 43:513-525.

Karpova A, Mikhaylova M, Thomas U, Knopfel T, Behnisch T. 2006. Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. J Neurosci 26:4949-4955.

Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. Trends Neurosci 26:360-368.

Katzman David MBaSDE. 2001. Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. Cell 106:145-155.

Kim BY, Olzmann JA, Barsh GS, Chin LS, Li L. 2007. Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking. Mol Biol Cell 18:1129-1142.

Kim CH, Lisman JE. 1999. A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. J Neurosci 19:4314-4324.

Kim S, Burette A, Chung HS, Kwon S-K, Woo J, Lee HW, Kim K, Kim H, Weinberg RJ, Kim E. 2006a. NGL family PSD-95-interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation. 9:1294-1301.

Kim Y, Sung JY, Ceglia I, Lee KW, Ahn JH, Halford JM, Kim AM, Kwak SP, Park JB, Ho Ryu S, Schenck A, Bardoni B, Scott JD, Nairn AC, Greengard P. 2006b. Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. Nature 442:814-817.

Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. Cell 120:195-208.

Klausner RD, Ashwell G, van Renswoude J, Harford JB, Bridges KR. 1983. Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. Proc Natl Acad Sci U S A 80:2263-2266.

Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. 1979. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 76:6270-6273.

Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. 2008. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. Nat Rev Neurosci 9:505-518.

Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. 2002. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. Neuron 34:265-273.

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. Nature 441:880-884.

Krucker T, Siggins GR, Halpain S. 2000. Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 97:6856-6861.

Kuroda M, Sok J, Webb L, Baechtold H, Urano F, Yin Y, Chung P, de Rooij DG, Akhmedov A, Ashley T, Ron D. 2000. Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(-/-) mice. Embo J 19:453-462.

Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH, Jr. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Science 323:1205-1208.

L

Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL. 2007. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. J Neurosci 27:796-807.

Lagier-Tourenne C, Cleveland DW. 2009. Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. Cell 136:1001-1004.

Lasiecka ZM, Yap CC, Vakulenko M, Winckler B. 2009. Compartmentalizing the neuronal plasma membrane from axon initial segments to synapses. Int Rev Cell Mol Biol 272:303-389.

Lata S, Roessle M, Solomons J, Jamin M, Gottlinger HG, Svergun DI, Weissenhorn W. 2008a. Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. J Mol Biol 378:818-827.

Lata S, Schoehn G, Jain A, Pires R, Piehler J, Gottlinger HG, Weissenhorn W. 2008b. Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. Science 321:1354-1357.

Lavezzari G, McCallum J, Dewey CM, Roche KW. 2004. Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. J Neurosci 24:6383-6391.

Le Hir H, Seraphin B. 2008. EJCs at the heart of translational control. Cell 133:213-216.

Lee J-A, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao F-B. 2007. ESCRT-III Dysfunction Causes Autophagosome Accumulation and Neurodegeneration. Current Biology 17:1561-1567.

Lee JA, Gao FB. 2009. Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia. J Neurosci 29:8506-8511.

Lee SH, Liu L, Wang YT, Sheng M. 2002. Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. Neuron 36:661-674.

Lewis V, Green SA, Marsh M, Vihko P, Helenius A, Mellman I. 1985. Glycoproteins of the lysosomal membrane. J Cell Biol 100:1839-1847.

Li J, Belogortseva N, Porter D, Park M. 2008. Chmp1A functions as a novel tumor suppressor gene in human embryonic kidney and ductal pancreatic tumor cells. Cell Cycle 7:2886-2893.

Li Z, Okamoto K-I, Hayashi Y, Sheng M. 2004. The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses. Cell 119:873-887.

Lin JW, Ju W, Foster K, Lee SH, Ahmadian G, Wyszynski M, Wang YT, Sheng M. 2000. Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. Nat Neurosci 3:1282-1290.

Lin Y, Kimpler LA, Naismith TV, Lauer JM, Hanson PI. 2005. Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. J Biol Chem 280:12799-12809.

Liu G, Grant WM, Persky D, Latham VM, Jr., Singer RH, Condeelis J. 2002. Interactions of elongation factor 1alpha with F-actin and beta-actin mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions. Mol Biol Cell 13:579-592.

Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA. 1995. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 92:11175-11179.

Lledo PM, Zhang X, Sudhof TC, Malenka RC, Nicoll RA. 1998. Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. Science 279:399-403.

Lu J, Helton TD, Blanpied TA, Racz B, Newpher TM, Weinberg RJ, Ehlers MD. 2007. Postsynaptic Positioning of Endocytic Zones and AMPA Receptor Cycling by Physical Coupling of Dynamin-3 to Homer. Neuron 55:874-889.

Lukong KE, Richard S. 2003. Sam68, the KH domain-containing superSTAR. Biochim Biophys Acta 1653:73-86.

Luscher C, Xia H, Beattie EC, Carroll RC, von Zastrow M, Malenka RC, Nicoll RA. 1999. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. Neuron 24:649-658.

M

Mahul-Mellier AL, Hemming FJ, Blot B, Fraboulet S, Sadoul R. 2006. Alix, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death in vivo. J Neurosci 26:542-549.

Majewska A, Sur M. 2003. Motility of dendritic spines in visual cortex in vivo: changes during the critical period and effects of visual deprivation. Proc Natl Acad Sci U S A 100:16024-16029.

Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN. 1989. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. Nature 340:554-557.

Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. Science 283:1923-1927.

Malinow R, Schulman H, Tsien RW. 1989. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. Science 245:862-866.

Man HY, Lin JW, Ju WH, Ahmadian G, Liu L, Becker LE, Sheng M, Wang YT. 2000. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. Neuron 25:649-662.

Masliah E, Terry RD, DeTeresa RM, Hansen LA. 1989. Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. Neurosci Lett 103:234-239.

Matsumoto M, Setou M, Inokuchi K. 2007. Transcriptome analysis reveals the population of dendritic RNAs and their redistribution by neural activity. Neurosci Res 57:411-423.

Matsuno H, Okabe S, Mishina M, Yanagida T, Mori K, Yoshihara Y. 2006. Telencephalin slows spine maturation. J Neurosci 26:1776-1786.

Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. Nature 429:761-766.

Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byers HR, Fujiwara K. 1982. High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. Proc Natl Acad Sci U S A 79:7590-7594.

McGlade-McCulloh E, Yamamoto H, Tan SE, Brickey DA, Soderling TR. 1993. Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Nature 362:640-642.

McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ. 2001. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. Arch Neurol 58:1803-1809.

Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Janus C, Cruz L, Jackson M, Lu WY, MacDonald JF, Wang JY, Falls DL, Jia Z. 2002. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. Neuron 35:121-133.

Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC. 1991. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. J Biol Chem 266:3239-3245.

Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG. 1998. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. Nature 396:433-439.

Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M. 2002. Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. Neuron 36:507-519.

Moccia R, Chen D, Lyles V, Kapuya E, E Y, Kalachikov S, Spahn CM, Frank J, Kandel ER, Barad M, Martin KC. 2003. An unbiased cDNA library prepared from isolated Aplysia sensory neuron processes is enriched for cytoskeletal and translational mRNAs. J Neurosci 23:9409-9417.

Momeni P, Rogaeva E, Van Deerlin V, Yuan W, Grafman J, Tierney M, Huey E, Bell J, Morris CM, Kalaria RN, van Rensburg SJ, Niehaus D, Potocnik F, Kawarai T, Salehi-Rad S, Sato C, St George-Hyslop P, Hardy J. 2006. Genetic variability in CHMP2B and frontotemporal dementia. Neurodegener Dis 3:129-133.

Moon IS, Cho SJ, Lee H, Seog DH, Jung YW, Jin I, Walikonis R. 2008. Upregulation by KCl treatment of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) mRNA in the dendrites of cultured rat hippocampal neurons. Mol Cells 25:538-544.

Morita E, Sandrin V, Alam SL, Eckert DM, Gygi SP, Sundquist WI. 2007. Identification of human MVB12 proteins as ESCRT-I subunits that function in HIV budding. Cell Host Microbe 2:41-53.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature 319:774-776.

Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP, Toh BH. 1995. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. J Biol Chem 270:13503-13511.

Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC. 1994. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. Nature 369:486-488.

Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC. 1993. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. Science 261:1051-1055.

Munshi R, Kandl KA, Carr-Schmid A, Whitacre JL, Adams AE, Kinzy TG. 2001. Overexpression of translation elongation factor 1A affects the organization and function of the actin cytoskeleton in yeast. Genetics 157:1425-1436.

Murphy RF. 1991. Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. Trends Cell Biol 1:77-82.

Muziol T, Pineda-Molina E, Ravelli RB, Zamborlini A, Usami Y, Gottlinger H, Weissenhorn W. 2006. Structural Basis for Budding by the ESCRT-III Factor CHMP3. Developmental Cell 10:821-830.

N

Nagerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T. 2004. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. Neuron 44:759-767.

Nagy V, Bozdagi O, Huntley GW. 2007. The extracellular protease matrix metalloproteinase-9 is activated by inhibitory avoidance learning and required for long-term memory. Learn Mem 14:655-664.

Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, Balcerzyk M, Okulski P, Dzwonek J, Costa RM, Silva AJ, Kaczmarek L, Huntley GW. 2006. Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. J Neurosci 26:1923-1934.

Nakagawa T, Engler JA, Sheng M. 2004. The dynamic turnover and functional roles of alpha-actinin in dendritic spines. Neuropharmacology 47:734-745.

Nakayama AY, Harms MB, Luo L. 2000. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. J Neurosci 20:5329-5338.

Neumann M, Roeber S, Kretzschmar HA, Rademakers R, Baker M, Mackenzie IR. 2009a. Abundant FUS-immunoreactive pathology in neuronal intermediate filament inclusion disease. Acta Neuropathol.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar

HA, Trojanowski JQ, Lee VM. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science 314:130-133.
Neumann M, Tolnay M, Mackenzie IR. 2009b. The molecular basis of frontotemporal dementia. Expert Rev Mol Med 11:e23.
Nickerson DP, Russell MR, Odorizzi G. 2007. A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. EMBO Rep 8:644-650.
Niell CM, Meyer MP, Smith SJ. 2004. In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. Nat Neurosci 7:254-260.
Nixon RA. 2005. Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. Neurobiology of Aging 26:373-382.
Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H. 2005. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca2+ signaling in dendrites. Neuron 46:609-622.
Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P. 1998. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. Neuron 21:545-559.

O

Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S, Gill DJ, Perisic O, Emr SD, Williams RL. 2007. Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. Nature 449:735-739.
Okabe S, Miwa A, Okado H. 2001. Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. J Neurosci 21:6105-6114.
Ong SE, Mittler G, Mann M. 2004. Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. Nat Methods 1:119-126.
Ostroff LE, Fiala JC, Allwardt B, Harris KM. 2002. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. Neuron 35:535-545.

P

Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD. 2004. Recycling Endosomes Supply AMPA Receptors for LTP. Science 305:1972-1975.
Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD. 2006. Plasticity-Induced Growth of Dendritic Spines by Exocytic Trafficking from Recycling Endosomes. Neuron 52:817-830.
Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, Morrison KE, Pall HS, Hardiman O, Collinge J, Shaw PJ, Fisher EM. 2006. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). Neurology 67:1074-1077.
Parnass Z, Tashiro A, Yuste R. 2000. Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. Hippocampus 10:561-568.
Paronetto MP, Messina V, Bianchi E, Barchi M, Vogel G, Moretti C, Palombi F, Stefanini M, Geremia R, Richard S, Sette C. 2009. Sam68 regulates translation of target mRNAs in male germ cells, necessary for mouse spermatogenesis. J Cell Biol 185:235-249.
Paronetto MP, Zalfa F, Botti F, Geremia R, Bagni C, Sette C. 2006. The nuclear RNA-binding protein Sam68 translocates to the cytoplasm and associates with the polysomes in mouse spermatocytes. Mol Biol Cell 17:14-24.
Parton RG, Simons K. 2007. The multiple faces of caveolae. 8:185-194.
Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, Sheng M. 2003. Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. Nature 424:677-681.
Patt S, Gerhard L. 1993. A Golgi study of human locus coeruleus in normal brains and in Parkinson's disease. Neuropathol Appl Neurobiol 19:519-523.
Patt S, Gertz HJ, Gerhard L, Cervos-Navarro J. 1991. Pathological changes in dendrites of substantia nigra neurons in Parkinson's disease: a Golgi study. Histol Histopathol 6:373-380.
Pettit DL, Perlman S, Malinow R. 1994. Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons. Science 266:1881-1885.
Pfeffer SR. 2001. Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. Trends Cell Biol 11:487-491.
Poon MM, Choi SH, Jamieson CA, Geschwind DH, Martin KC. 2006. Identification of process-localized mRNAs from cultured rodent hippocampal neurons. J Neurosci 26:13390-13399.
Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R. 2003. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. J Neurosci 23:7129-7142.
Prange O, Murphy TH. 2001. Modular transport of postsynaptic density-95 clusters and association with stable spine precursors during early development of cortical neurons. J Neurosci 21:9325-9333.

Q

Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. Cell 128:931-946.

R

Rabbitts TH, Forster A, Larson R, Nathan P. 1993. Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. Nat Genet 4:175-180.

Racz B, Blanpied TA, Ehlers MD, Weinberg RJ. 2004. Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. Nat Neurosci 7:917-918.

Raiborg C, Stenmark H. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. Nature 458:445-452.

Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat Genet 36:585-595.

Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH. 1992. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. Mol Biol Cell 3:1389-1402.

Reid E, Connell J, Edwards TL, Duley S, Brown SE, Sanderson CM. 2005. The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. Hum. Mol. Genet. 14:19-38.

Richards DA, De Paola V, Caroni P, Gahwiler BH, McKinney RA. 2004. AMPA-receptor activation regulates the diffusion of a membrane marker in parallel with dendritic spine motility in the mouse hippocampus. J Physiol 558:503-512.

Ringholz GM, Greene SR. 2006. The relationship between amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. Curr Neurol Neurosci Rep 6:387-392.

Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL. 2008. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. PLoS One 3:e1997.

Rodriguez A, Ehlenberger DB, Hof PR, Wearne SL. 2006. Rayburst sampling, an algorithm for automated three-dimensional shape analysis from laser scanning microscopy images. Nat Protoc 1:2152-2161.

Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH. 1997. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. Mol Cell Biol 17:2158-2165.

Rostaing P, Real E, Siksou L, Lechaire JP, Boudier T, Boeckers TM, Gertler F, Gundelfinger ED, Triller A, Marty S. 2006. Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography. Eur J Neurosci 24:3463-3474.

Roux A, Uyhazi K, Frost A, De Camilli P. 2006. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. Nature 441:528-531.

Russell MRG, Nickerson DP, Odorizzi G. 2006. Molecular mechanisms of late endosome morphology, identity and sorting. Current Opinion in Cell Biology

Membranes and organelles 18:422-428.

Rusten TE, Stenmark H. 2009. How do ESCRT proteins control autophagy? J Cell Sci 122:2179-2183.

S

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

Saksena S, Sun J, Chu T, Emr SD. 2007. ESCRTing proteins in the endocytic pathway. Trends Biochem Sci 32:561-573.

Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD. 2009. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. Cell 136:97-109.

Sakurai E, Hashikawa T, Yoshihara Y, Kaneko S, Satoh M, Mori K. 1998. Involvement of dendritic adhesion molecule telencephalin in hippocampal long-term potentiation. Neuroreport 9:881-886.

Sala C, Cambianica I, Rossi F. 2008. Molecular mechanisms of dendritic spine development and maintenance. Acta Neurobiol Exp (Wars) 68:289-304.

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

Sala C, Piech V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M. 2001. Regulation of Dendritic Spine Morphology and Synaptic Function by Shank and Homer. Neuron 31:115-130.

Sampedro MN, Bussineau CM, Cotman CW. 1981. Postsynaptic density antigens: preparation and characterization of an antiserum against postsynaptic densities. J Cell Biol 90:675-686.

Santamaria F, Wils S, De Schutter E, Augustine GJ. 2006. Anomalous diffusion in Purkinje cell dendrites caused by spines. Neuron 52:635-648.

Santi S, Cappello S, Riccio M, Bergami M, Aicardi G, Schenk U, Matteoli M, Canossa M. 2006. Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. Embo J 25:4372-4380.

Saxena S, Howe CL, Cosgaya JM, Steiner P, Hirling H, Chan JR, Weis J, Kruttgen A. 2005. Differential endocytic sorting of p75NTR and TrkA in response to NGF: a role for late endosomes in TrkA trafficking. Mol Cell Neurosci 28:571-587.

Scheff SW, DeKosky ST, Price DA. 1990. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 11:29-37.

Scheff SW, Price DA. 1993. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. Ann Neurol 33:190-199.

Scheibel AB. 1979. Dendritic changes in senile and presenile dementias. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 57:107-124.

Schenk F, Morris RG. 1985. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. Exp Brain Res 58:11-28.

Schikorski T, Stevens CF. 1999. Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. Proc Natl Acad Sci U S A 96:4107-4112.

Schmid SL, Fuchs R, Male P, Mellman I. 1988. Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. Cell 52:73-83.

Schmidt H, Eilers J. 2009. Spine neck geometry determines spino-dendritic cross-talk in the presence of mobile endogenous calcium binding proteins. J Comput Neurosci.

Sheng M, Hoogenraad CC. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. Annu Rev Biochem 76:823-847.

Shi SH. 1999. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. Science 284:1811-1816.

Shim S, Kimpler LA, Hanson PI. 2007. Structure/Function Analysis of Four Core ESCRT-III Proteins Reveals Common Regulatory Role for Extreme C-Terminal Domain. Traffic 8:1068-1079.

Shirk AJ, Anderson SK, Hashemi SH, Chance PF, Bennett CL. 2005. SIMPLE interacts with NEDD4 and TSG101: evidence for a role in lysosomal sorting and implications for Charcot-Marie-Tooth disease. J Neurosci Res 82:43-50.

Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sorensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J. 2005. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. 37:806-808.

Soros VB, Carvajal HV, Richard S, Cochrane AW. 2001. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by a dominant-negative mutant of Sam68 through sequestration of unspliced RNA at perinuclear bundles. J Virol 75:8203-8215.

Spacek J, Harris KM. 1997. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. J Neurosci 17:190-203.

Stanton PK, Sarvey JM. 1984. Blockade of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region by inhibitors of protein synthesis. J Neurosci 4:3080-3088.

Staubli U, Lynch G. 1990. Stable depression of potentiated synaptic responses in the hippocampus with 1-5 Hz stimulation. Brain Res 513:113-118.

Stauffer DR, Howard TL, Nyun T, Hollenberg SM. 2001. CHMP1 is a novel nuclear matrix protein affecting chromatin structure and cell-cycle progression. J Cell Sci 114:2383-2393.

Stefanowska M. 1897. Les appendices terminaux des dendrites cérébraux et leurs différents états phisiologiques. Ann. Soc. Roy. Sci. Méd. Nat. Bruxelles 6:351-407.

Steiner P, Alberi S, Kulangara K, Yersin A, Sarria JC, Regulier E, Kasas S, Dietler G, Muller D, Catsicas S, Hirling H. 2005. Interactions between NEEP21, GRIP1 and GluR2 regulate sorting and recycling of the glutamate receptor subunit GluR2. Embo J 24:2873-2884.

Steiner P, Higley MJ, Xu W, Czervionke BL, Malenka RC, Sabatini BL. 2008. Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. Neuron 60:788-802.

Steward O, Levy WB. 1982. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. J Neurosci 2:284-291.

Steward O, Worley PF. 2001. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. Neuron 30:227-240.

Stuffers S, Brech A, Stenmark H. 2009. ESCRT proteins in physiology and disease. Exp Cell Res 315:1619-1626.

Sutton MA, Schuman EM. 2006. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. Cell 127:49-58.

Sweeney NT, Brenman JE, Jan YN, Gao FB. 2006. The coiled-coil protein shrub controls neuronal morphogenesis in Drosophila. Curr Biol 16:1006-1011.

T

Takahashi H, Sekino Y, Tanaka S, Mizui T, Kishi S, Shirao T. 2003. Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. J Neurosci 23:6586-6595.

Takashima S, Becker LE, Armstrong DL, Chan F. 1981. Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. Brain Res 225:1-21.

Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, Kasai H. 2008. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. Science 319:1683-1687.

Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH, 3rd, Becker KG, Ko MS. 2000. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. Proc Natl Acad Sci U S A 97:9127-9132.

Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E. 2001. A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. Neuron 32:463-475.

Tashiro A, Yuste R. 2004. Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. Mol Cell Neurosci 26:429-440.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. Ann Neurol 30:572-580.

Tian L, Stefanidakis M, Ning L, Van Lint P, Nyman-Huttunen H, Libert C, Itohara S, Mishina M, Rauvala H, Gahmberg CG. 2007. Activation of NMDA receptors promotes dendritic spine development through MMP-mediated ICAM-5 cleavage. J Cell Biol 178:687-700.

Tiruchinapalli DM, Oleynikov Y, Kelic S, Shenoy SM, Hartley A, Stanton PK, Singer RH, Bassell GJ. 2003. Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. J Neurosci 23:3251-3261.

Tomita S, Stein V, Stocker TJ, Nicoll RA, Bredt DS. 2005. Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs. Neuron 45:269-277.

Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D. 1999. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. Nature 402:421-425.

Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K. 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. Nature 420:788-794.

Trioulier Y, Torch S, Blot B, Cristina N, Chatellard-Causse C, Verna J-M, Sadoul R. 2004. Alix, a Protein Regulating Endosomal Trafficking, Is Involved in Neuronal Death. J. Biol. Chem. 279:2046-2052.

Trommald M, Hulleberg G, Andersen P. 1996. Long-term potentiation is associated with new excitatory spine synapses on rat dentate granule cells. Learn Mem 3:218-228.

Tsokas P, Grace EA, Chan P, Ma T, Sealfon SC, Iyengar R, Landau EM, Blitzer RD. 2005. Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. J Neurosci 25:5833-5843.

U

Ultanir SK, Kim JE, Hall BJ, Deerinck T, Ellisman M, Ghosh A. 2007. Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 104:19553-19558.

Uranishi H, Tetsuka T, Yamashita M, Asamitsu K, Shimizu M, Itoh M, Okamoto T. 2001. Involvement of the pro-oncoprotein TLS (translocated in liposarcoma) in nuclear factor-kappa B p65-mediated transcription as a coactivator. J Biol Chem 276:13395-13401.

V

Valverde F. 1967. Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse. Exp Brain Res 3:337-352.

Valverde F. 1971. Rate and extent of recovery from dark rearing in the visual cortex of the mouse. Brain Res 33:1-11.

Van der Zee J, Urwin H, Engelborghs S, Bruyland M, Vandenberghe R, Dermaut B, De Pooter T, Peeters K, Santens P, De Deyn PP, Fisher EM, Collinge J, Isaacs AM, Van Broeckhoven C. 2008. CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. Hum Mol Genet 17:313-322.

Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. 1990. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A 87:1663-1667.

Van Harreveld A, Fifkova E. 1975. Swelling of dendritic spines in the fascia dentata after stimulation of the perforant fibers as a mechanism of post-tetanic potentiation. Exp Neurol 49:736-749.

Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleroche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE. 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. Science 323:1208-1211.

W

Wallace CS, Lyford GL, Worley PF, Steward O. 1998. Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. J Neurosci 18:26-35.

Wallace W, Bear MF. 2004. A morphological correlate of synaptic scaling in visual cortex. J Neurosci 24:6928-6938.

Wang IF, Wu LS, Chang HY, Shen CK. 2008a. TDP-43, the signature protein of FTLD-U, is a neuronal activity-responsive factor. J Neurochem 105:797-806.

Wang XB, Bozdagi O, Nikitczuk JS, Zhai ZW, Zhou Q, Huntley GW. 2008b. Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. Proc Natl Acad Sci U S A 105:19520-19525.

Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Jr., Karcher R, Li XD, Davison IG, Ikebe M, Mercer JA, Kauer JA, Ehlers MD. 2008c. Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. Cell 135:535-548.

Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. Science 313:1093-1097.

Wightman G, Anderson VE, Martin J, Swash M, Anderton BH, Neary D, Mann D, Luthert P, Leigh PN. 1992. Hippocampal and neocortical ubiquitin-immunoreactive inclusions in amyotrophic lateral sclerosis with dementia. Neurosci Lett 139:269-274.

Williams RL, Urbe S. 2007. The emerging shape of the ESCRT machinery. 8:355-368.

Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH. 2009. Membrane scission by the ESCRT-III complex. Nature 458:172-177.

X

Xu HT, Pan F, Yang G, Gan WB. 2007. Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex. Nat Neurosci 10:549-551.

Y

Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. 2008. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. Nat Neurosci 11:251-253.

Yang D, Rismanchi N, Renvoise B, Lippincott-Schwartz J, Blackstone C, Hurley JH. 2008a. Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. Nat Struct Mol Biol 15:1278-1286.

Yang L, Embree LJ, Tsai S, Hickstein DD. 1998. Oncoprotein TLS interacts with serine-arginine proteins involved in RNA splicing. J Biol Chem 273:27761-27764.

Yang Y, Wang XB, Frerking M, Zhou Q. 2008b. Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. J Neurosci 28:5740-5751.

Yasumatsu N, Matsuzaki M, Miyazaki T, Noguchi J, Kasai H. 2008. Principles of long-term dynamics of dendritic spines. J Neurosci 28:13592-13608.

Yoshimura A, Fujii R, Watanabe Y, Okabe S, Fukui K, Takumi T. 2006. Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/protein complex in dendritic spines. Curr Biol 16:2345-2351.

Yoshimura Y, Shinkawa T, Taoka M, Kobayashi K, Isobe T, Yamauchi T. 2002. Identification of protein substrates of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in the postsynaptic density by protein sequencing and mass spectrometry. Biochem Biophys Res Commun 290:948-954.

Z

Zamborlini A, Usami Y, Radoshitzky SR, Popova E, Palu G, Gottlinger H. 2006. Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. PNAS 103:19140-19145.

Zhang YQ, Bailey AM, Matthies HJ, Renden RB, Smith MA, Speese SD, Rubin GM, Broadie K. 2001. Drosophila fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. Cell 107:591-603.

Zheng J, Shen WH, Lu TJ, Zhou Y, Chen Q, Wang Z, Xiang T, Zhu YC, Zhang C, Duan S, Xiong ZQ. 2008. Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. J Biol Chem 283:13280-13288.

Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. Neuron 44:749-757.

Zinszner H, Sok J, Immanuel D, Yin Y, Ron D. 1997. TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. J Cell Sci 110 (Pt 15):1741-1750.

Zitzer H, Honck HH, Bachner D, Richter D, Kreienkamp HJ. 1999. Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. J Biol Chem 274:32997-33001.

Ziv NE, Smith SJ. 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. Neuron 17:91-102.

Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB. 2005a. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. Neuron 46:181-189.

Zuo Y, Yang G, Kwon E, Gan WB. 2005b. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. Nature 436:261-265.

Résumé

Les milliards de neurones du cerveau des mammifères communiquent entre eux via les synapses. La vaste majorité des synapses excitatrices sont établies entre un bouton axonal présynaptique et une épine dendritique postsynaptique. Les épines dendritiques sont des petites protubérances à la surface des dendrites. Ces structures sont remarquablement dynamiques, et leur géométrie influence leurs propriétés électriques et biochimiques, modulant ainsi la transmission du message nerveux. La force avec laquelle le message nerveux est transmis par la synapse peut être modifiée ; on parle de plasticité synaptique. La conservation à long terme de l'amélioration ou de la dépression de la force synaptique nécessite des changements protéiques et structuraux, de la synapse et de l'épine dendritique. Ces changements sont régulés par l'activité neuronale et font intervenir de nombreux facteurs, dont la synthèse locale de nouvelles protéines et une modification de la composition protéique membranaire.

La synthèse locale de protéines nécessite le transport des ARNm dans les dendrites et une régulation de leur traduction ; nous nous sommes intéressés aux facteurs d'épissage Sam68 et TLS dans ces processus. Nous avons montré que Sam68 est associée dans le cerveau à un éventail large d'ARNm cytoplasmiques codant des protéines impliquées dans la plasticité à long terme, dont celui du facteur d'élongation de la traduction, eEF1A ; et que TLS, d'ordinaire nucléaire, est localisée dans les dendrites et près des synapses de neurones *in vivo* et en culture.

La composition protéique de la membrane est contrôlée par la voie endolysosomiale, dans laquelle les complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complexe Required for Transport) sont impliqués dans le transport de protéines transmembranaires. Le complexe ESCRT-III semble aussi avoir un rôle générique consistant à étirer et scinder des tubes de membrane lipidique en agissant de l'intérieur. Cette activité pourrait être importante pour la formation ou le maintien de structures spécifiques telles que les épines dendritiques. Nous nous sommes intéressés à une protéine du complexe ESCRT-III, CHMP2B (Charged Multivesicular Body Protein 2B), mutée dans une maladie neurodégénérative. Nous avons montré que l'expression des mutants de CHMP2B et l'extinction de CHMP2B endogène, dans des neurones d'hippocampe de rat en culture, affectaient la morphologie des épines dendritiques ; la proportion des épines larges de type mushroom diminue. Nous avons aussi montré par la mesure des minis EPSC, que les mutants pouvaient affaiblir les synapses fortes perturbant ainsi les connexions neuronales.
Cette étude a montré que CHMP2B était impliquée dans la morphogenèse des épines dendritiques, et suggère des hypothèses nouvelles, tant concernant celle-ci, qu'au sujet des mécanismes pathogènes à l'œuvre dans la neurodégénérescence.