



HAL
open science

Rôle du récepteur BAI3 dans le développement neuronal - Études in vitro et in vivo -

Vanessa Lanoue

► **To cite this version:**

Vanessa Lanoue. Rôle du récepteur BAI3 dans le développement neuronal - Études in vitro et in vivo -. Neurosciences. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : . tel-00865692

HAL Id: tel-00865692

<https://theses.hal.science/tel-00865692>

Submitted on 24 Sep 2013

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité Neurosciences
Ecole doctorale ED3C

Présentée par

M^{elle} Vanessa LANOUE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Rôle du récepteur BAI3 dans le développement neuronal
- Études in vitro et in vivo -**

Laboratoire : UMR 7241, CIRB-Collège de France, équipe MMS
UMR 7102, laboratoire NPA, équipe DVSN

Soutenue le 11 mai 2012

devant le jury composé de :

Dr. Isabelle DUSART	Présidente du jury
Dr. Fabrice ANGO	Rapporteur
Dr. Philippe ISOPE	Rapporteur
Dr. Nathalie SANS	Examinatrice
Dr. Fekrije SELIMI	Directrice de thèse
Pr. Jean MARIANI	Directeur de thèse

À mon grand-père...

*Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de
ce que les choses sont ce qu'elles sont.*

Aristote

Remerciements

[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[Redacted text block 5]

[Redacted text block 6]

[Redacted text block 7]

[Redacted text block 8]

[Redacted text block 9]

[Redacted text block 10]

[Redacted text block 11]

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières.....	3
Liste des illustrations et des tableaux	8
Liste des abbréviations	10
Résumé	14
Abstract.....	15
Introduction	17
I. La dendritogenèse et la spinogenèse, deux étapes clés dans la formation d'un réseau neuronal fonctionnel	17
I.1. Les principales étapes de la genèse d'un réseau neuronal fonctionnel	17
I.1.1. Morphogenèse des neurones.....	17
I.1.2. Mise en place des connexions synaptiques.....	18
I.2. La dendritogenèse	20
I.2.1. Description du phénomène de dendritogenèse	20
I.2.2. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la dendritogenèse	21
I.2.2.1 <i>Le cytosquelette, acteur majeur de la dendritogenèse</i>	<i>21</i>
I.2.2.2 <i>Les RhoGTPases régulent le cytosquelette lors du développement des dendrites.....</i>	<i>23</i>
I.2.2.3 <i>Les protéines en amont des RhoGTPases et des GEF.....</i>	<i>25</i>
I.3. La spinogenèse.....	29
I.3.1. Caractéristiques des épines dendritiques	29
I.3.1.1 <i>Généralités</i>	<i>29</i>
I.3.1.2 <i>Bref aperçu de la constitution moléculaire des épines dendritiques.....</i>	<i>30</i>
I.3.2. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la spinogenèse	31
I.3.2.1 <i>L'actine joue un rôle clé dans la spinogenèse</i>	<i>31</i>
I.3.2.2 <i>Les voies moléculaires impliquées dans la spinogenèse</i>	<i>32</i>
I.4. Des défauts dans la morphogenèse des neurones peuvent mener à des maladies neurodéveloppementales	37
I.4.1. Exemple de l'autisme et des retards mentaux.....	37
I.4.2. Exemple de la schizophrénie	39
II. BAI3, un RCPG d'adhésion impliqué dans le développement neuronal ?	41
II.1. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)	41
II.1.1. Généralités	41
II.1.2. Structure et classification des RCPG.....	42
II.2. La famille des RCPG d'Adhésion.....	45
II.2.1. La structure protéique caractéristique des RCPG d'Adhésion	45

II.2.1.1	<i>Le domaine N-terminal caractéristique des récepteurs d'Adhésion</i>	45
II.2.1.2	<i>Le site de clivage GPS</i>	46
II.2.1.3	<i>Les domaines transmembranaires et C-terminal</i>	48
II.2.2.	Les variants d'épissage des RCPG d'Adhésion.....	48
II.2.3.	Les rôles connus des RCPG d'Adhésion et leurs voies de signalisation.....	49
II.3.	Les récepteurs BAI	52
II.3.1.	La découverte des récepteurs BAI.....	52
II.3.2.	La structure des récepteurs BAI	55
II.3.2.1	<i>Les domaines extracellulaires</i>	55
II.3.2.2	<i>Les motifs intracellulaires</i>	58
II.3.3.	Les rôles connus des récepteurs BAI.....	60
II.3.3.1	<i>Les rôles des récepteurs BAI dans la tumorigenèse et l'angiogenèse</i>	60
II.3.3.2	<i>Les rôles des récepteurs BAI dans la phagocytose</i>	61
II.3.3.3	<i>Les rôles des récepteurs BAI dans le SNC</i>	63
III.	Le cortex cérébelleux murin comme modèle d'étude du développement neuronal	66
III.1.	Le cortex cérébelleux	68
III.1.1.	Les neurones du cortex cérébelleux.....	69
III.1.2.	Les fibres afférentes.....	70
III.2.	La cellule de Purkinje, un pivot du cortex cérébelleux	72
III.2.1.	Différentiation morphologique des cellules de Purkinje	72
III.2.2.	Les mécanismes moléculaires de la dendritogenèse des cellules de Purkinje	73
III.2.3.	La spinogenèse des cellules de Purkinje.....	76
III.2.4.	La mise en place des connexions synaptiques des cellules de Purkinje	77
III.2.4.1	<i>Innervations inhibitrices des cellules de Purkinje par les interneurons</i>	77
III.2.4.2	<i>Innervations excitatrices des cellules de Purkinje</i>	80
III.2.4.3	<i>Compétition pour le territoire d'innervation entre les fibres parallèles et les fibres grimpantes</i>	84
Objectifs de la thèse		87
Résultats expérimentaux		89
I.	Le RCPG d'Adhésion BAI3 régule la morphogenèse des neurones via la voie de signalisation ELMO1/Dock180/Rac1 <i>in vitro</i>	89
I.1.	Article en préparation	90
II.	Rôle du récepteur BAI3 dans le développement des épines dendritiques <i>in vitro</i>	113
II.1.	Dans les neurones matures, BAI3 est localisé dans les épines dendritiques.	113
II.2.	La surexpression de BAI3 dans les neurones d'hippocampe matures n'influe ni sur la densité ni sur la morphologie des épines dendritiques	115
II.3.	Conclusion et perspectives	115
III.	Étude <i>in vivo</i> de la localisation et du rôle du récepteur BAI3	117
III.1.	Localisation du récepteur BAI3 <i>in vivo</i>	119
III.1.1.	Localisation du récepteur BAI3 endogène	119

III.1.2. Localisation des protéines de fusion SCT et FLT <i>in vivo</i> : l'extrémité C-terminale de BAI3 pourrait permettre l'adressage du récepteur à la PSD	122
III.2. Voie de signalisation de BAI3 <i>in vivo</i>.....	128
III.2.1. Étude de la localisation du partenaire de BAI3 ELMO1 dans les cellules de Purkinje adultes	128
III.2.2. Interaction d'ELMO1 avec la queue cytoplasmique de BAI3 <i>in vivo</i>	130
III.3. Étude du rôle de BAI3 dans le développement et l'innervation des cellules de Purkinje	132
III.3.1. La protéine BAI3 pourrait réguler la mise en place de l'innervation excitatrice sur les cellules de Purkinje	132
III.3.2. Le récepteur BAI3 pourrait réguler la morphogenèse des cellules de Purkinje	135
III.4. Conclusion et perspectives.....	137
Discussion générale et perspectives	139
I. BAI3, un nouveau RCPG d'adhésion contrôlant la morphogenèse dendritique	140
I.1. BAI3 contrôle la longueur et la complexité de l'arborisation dendritique... ..	140
I.2. BAI3 interagit avec ELMO1	141
I.3. BAI3 régule la morphogenèse dendritique via ELMO1.....	143
II. BAI3 joue-t-il rôle un dans la morphogenèse des épines ?	145
III. <i>In vivo</i>, BAI3 joue-il un rôle dans la compétition fibres parallèles/fibres grimpantes sur les cellules de Purkinje?	146
III.1. BAI3, un RCPG d'Adhésion synaptique	146
III.2. BAI3 contrôle-t-il la compétition synaptique ?.....	147
IV. BAI3, une nouvelle cible thérapeutique?	149
IV.1. BAI3 est-il impliqué dans les maladies neurodéveloppementales ?.....	149
IV.2. BAI3, cible thérapeutique potentielle dans le traitement des cancers ?... ..	150
Conclusion générale	153
Annexe : Matériels et méthodes	155
I. Constructions	155
II. Anticorps	155
III. Culture de cellules HEK-293H	156
III.1. Plastiques et milieux.....	156
III.2. Culture des cellules HEK-293H	157
III.3. Principe de transfection des cellules HEK-293H.....	157
III.4. Test d'étalement cellulaire.....	157
IV. Souris	158
IV.1. Fond génétique.....	158

IV.2.	Animalerie	158
IV.3.	Génotypage des souris transgéniques FLT et SCT	158
IV.3.1.	Solutions	158
IV.3.2.	Protocole de génotypage des souris FLT et SCT	159
V.	PCR quantitative (qPCR) et transcription inverse-qPCR (RT-qPCR)	160
V.1.	Extraction de l'ADN génomique	160
V.2.	Quantification du taux d'expression des transgènes	160
V.2.1.	Extraction d'ARN	160
V.2.2.	Synthèse des ADNc - transcription inverse	160
V.3.	Protocole de PCR quantitative	161
VI.	Immunomarquages	163
VI.1.	Immunocytochimie (ICC)	163
VI.1.1.	Solutions	163
VI.1.2.	Protocole d'immunocytochimie.....	163
VI.1.3.	Marquage des microfilaments d'actine à la phalloïdine	163
VI.2.	Immunohistochimie (IHC)	163
VI.2.1.	Solutions	163
VI.2.2.	Perfusion des souris et coupe des cerveaux	164
VI.2.3.	IHC simple	164
VI.2.4.	IHC amplifiées	165
VI.2.4.1	<i>IHC simple : avec un anticorps secondaire couplé à l'HRP</i>	165
VI.2.4.2	<i>IHC double : avec un anticorps secondaire couplé à la biotine</i>	165
VII.	Pseudo-Golgi	166
VII.1.	Solutions	166
VII.2.	Révélation de la biocytine	166
VIII.	Immunoprécipitation	166
VIII.1.	Immunoprécipitations <i>in vitro</i>	166
VIII.1.1.	Solutions	166
VIII.1.2.	Préparation des billes couplées à la protéine G.....	167
VIII.1.3.	Immunoprécipitation.....	167
VIII.2.	Immunoprécipitations <i>in vivo</i>	168
VIII.2.1.	Solutions	168
VIII.2.2.	Préparation des billes couplées à la protéine G.....	169
VIII.2.3.	Immunoprécipitation.....	169
VIII.3.	Western Blot	170
VIII.3.1.	Solutions	170
VIII.3.2.	Transfert des protéines sur une membrane PVDF	170
VIII.3.3.	Détection des protéines par Western Blot.....	171
IX.	Culture des neurones d'hippocampe	171
IX.1.	Plastiques et milieux	171
IX.2.	Mise en culture des neurones d'hippocampe de souris	171
IX.3.	Transfection des neurones d'hippocampes en culture	172
X.	Imagerie et quantifications	172

X.1. Microscopes et logiciels d'acquisition d'images	172
X.2. Traitement et analyse des images	173
X.2.1. Déconvolution des images de microscopie confocale	173
X.2.2. Traitement des images	173
XI. Statistiques	174
Bibliographie	175

Liste des illustrations et des tableaux

Figure 1 : Initiation de la morphogénèse des neurones.....	18
Figure 2 : La mise en place des synapses se fait en plusieurs étapes.	19
Figure 3 : Durant le développement, des microtubules avec l'extrémité (-) distale envahissent les dendrites.....	21
Figure 4 : Les facteurs neurotrophiques sont impliqués dans la dendritogénèse.	26
Figure 5 : Les protéines transmembranaires en amont des RhoGTPases régulent la dendritogénèse.....	28
Figure 6 : Les différentes catégories d'épines dendritiques.	30
Figure 7 : Les protéines de la PSD sont impliquées dans la régulation de la spinogénèse.	34
Figure 8 : Les récepteurs d'adhésion et les récepteurs aux neurotransmetteurs présents à la surface des épines régulent leur développement.	36
Figure 9 : Représentation schématique des récepteurs couplés aux protéines G.	42
Figure 10 : Classification des RCPG selon le système GRAFS.	44
Figure 11 : Schéma des domaines N-terminaux des différents GPCR d'Adhésion et leur groupe d'appartenance.	46
Figure 12 : Le nouveau domaine d'autoprotéolyse GAIN.	47
Figure 13 : Expression des récepteurs BAI dans le SNC murin.	54
Figure 14 : Représentation schématique des récepteurs BAI1, BAI2 et BAI3.	56
Figure 15 : Alignement des séquences des quatre TSR1 des récepteurs BAI.....	57
Figure 15 : Alignement des séquences des quatre TSR1 des récepteurs BAI.....	57
Figure 16 : Illustration de l'action de Vstat120 sur les cellules endothéliales.....	61
Figure 17 : Représentation schématique de la morphogénèse du cervelet.....	68
Figure 18 : Cytoarchitecture du cortex cérébelleux	70
Figure 19 : Différentiation morphologique des cellules de Purkinje	73
Figure 20 : Mise en place de l'innervation inhibitrice des interneurons en panier.	78
Figure 21 : Les glies de Bergmann servent de support aux axones des interneurons étoilés.	79
Figure 22 : Développement des grains et innervation des cellules de Purkinje.	81
Figure 23 : Représentation schématique de la mise en place de l'innervation des fibres grimpantes sur les cellules de Purkinje	84

Figure 24 : Schéma résumant les mécanismes moléculaires alimentant la compétition synaptique entre les fibres parallèles et les fibres grimpantes pour leur territoire d'innervation sur les cellules de Purkinje.	86
Figure 25 : Schéma des différentes constructions de BAI3.	90
Figure 26 : BAI3 est localisé dans les épines dendritiques matures <i>in vitro</i>	114
Figure 27 : La modulation de BAI3 dans les neurones matures n'influence pas la densité ni la morphologie des épines dendritiques.	116
Figure 28 : Les formes modifiées de BAI3 sont exprimées dans le cervelet des souris transgéniques SCT et FLT.	118
Figure 29 : Expression du récepteur BAI3 endogène dans le cerveau de souris.	121
Figure 30 : Expression des protéines BAI3-SCT et -FLT dans les cellules de Purkinje.	125
Figure 32 : ELMO1 est localisé dans les dendrites et les épines dendritiques des cellules de Purkinje adultes <i>in vivo</i>	129
Figure 33 : ELMO1 semble interagir avec la queue cytoplasmique de BAI3 de façon labile <i>in vivo</i>	131
Figure 34 : Les souris transgéniques FLT présentent des modifications de la taille des cellules de Purkinje ainsi qu'une extension de l'innervation des fibres grimpantes.	134
Figure 35 : L'expression de la protéine de fusion BAI3-FLT n'entraîne pas de modification significative de la morphologie des cellules de Purkinje.	136
Tableau 2 : Anticorps secondaires utilisés en IHC, ICC et WB.	156
Tableau 3 : Séquence des amorces utilisées.	159
Tableau 4.	159
Tableau 5 : Préparation du mix de transcription inverse.	161
Tableau 6 : Paramètres utilisés pour la transcription inverse des ARNm des extraits de cervelet des souris transgéniques.	161
Tableau 7 : Séquences des amorces du gène contrôle GAPDH et du gène d'intérêt BAI3 utilisées en qPCR.	162
Tableau 8 : Paramètres de qPCR.	162

Liste des abbréviations

7 TM : sept domaines transmembranaires

Abl : Abelson

AIS : Axone Initial Segment

AMPA(R) : α -Amino-3-hydroxy-5-Methylisozazol-4-Propionate Acid (Receptor)

ARNi : ARN interférence

ARNnc : ARN non codant

Arp2/3 : Actin related protein 2/3

BAI : Brain Angiogenesis Inhibitor

BAP1, 2 (BAIAP2), 3 : BAI-Associated Protein

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

BrdU : 5-Bromo-2'-deoxyUridine

BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfert

C1ql : C1q-like

CA : Corne d'Amon (hippocampe)

CaBP : Calbindine

CaMK : Calcium/CalModuline Kinase

CaMKK : CaMK Kinase

CASR : Calcium-Sensing Receptor

Ca_v2.1 : canal calcique voltage-dépendant

Cbln1 : Cérébéline 1

Cdc42 : Cell division control 42

CDCP1 : CUB-Domain Containing Protein

CDK : Cyclin Dependant Kinase

CDKL5 : CDK-Like 5

CHL1 : Close Homologue of L1

CIRL : Calcium-Independent Receptor of α -Latrotoxine

CLESH : CD36, LIMP2, EMP Structural Homology

Cobl : Cordon-bleu

CRF : Corticotropine-Releasing Factor

CUB : C1r/C1s, Uegf, BMP1

Cy3 : Cyanine (fluorophore rouge)
DH : Dbl Homology
DISC1 : Disrupted In Schizophrenia 1
DIV : Day In Vitro
Dlg1 : Drosophila disc large tumor suppressor
Dock180 : Dedicator of cytokinesis 180
E : jour Embryonnaire
ECL : ExtraCellular Loop
EGF : Epidermal Growth Factor
EGL : External Granular Layer
ELMO1 : Engulfment and cell MOtility 1
EST : Expressed Sequence Tagged
F-actine : actine Filamenteuse
FAK : Focal Adhesion Kinase
FERM : 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin
FITC : Fluorescéine Iso Thio Cyanate (fluorophore vert)
FLT (BAI3-) : Full Length Tagged
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
GABA : γ -AminoButirique Acid
GABP : GA-Binding Protein
GAD67 : Glutamic Acid Decarboxylase
GAIN : GPCR Autoproteolysis INducing domain
GAP : GTPase-Activating Proteins
GEF : Guanine Exchange Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
GIT1 : G-protein-coupled receptor kinase-InTeracting protein 1
GPI : Glutaminase Interacting Protein
GPS : GPCR-Proteolysis Site
GRAFS (classification) : Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/taste2 et Sécrétine
HBD : Hormone Binding Domain
HRP : Horse Radish Peroxydase
ICL : IntraCelular Loop
Ig : Immunoglobulines
IGL : Internal Granular Layer

IRSp53 : récepteur tyrosine kinase à l'insuline
LRR : Leucin Reach Repeat
LTD : Long Term Depression
LTP : Long Term Potentiation
MAG11 : Membrane Associated Guanylate kinase Inverted 1
MAGUK : Membrane Associated GUanylate Kinase homologue
MAP2 : Microtubule Associated Protein 2
mGluR: metabotropic Glutamate Receptor
NGF : Nerve Growth Factor
NMDA(R) : N-Methyl-D-Aspartate (Receptor)
NRX : Neurexine
ORC : Origin Recognition Complex
P : jour Postnatal
Pak : p21-activating kinase 1
PC12 : rat Pheochromocytoma Cell
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDZ : Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, and Zonula Occludens-1
PIP₂ : Phosphatidylinositol 4,5-bisPhosphate
PSD : PostSynaptic Density
PSD95 : PostSynaptic Density protein 95
QTEV : motif glutamine-thréonine-glutamate-valine
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
RhoA : Ras homologous member A
RKR : motif arginine-lysine-arginine
ROR α : Retinoic acid receptor related Orphan Receptor α
RT-PCR : Reverse-Transcription PCR
RT-qPCR : Reverse-Transcription quantitative PCR
SCT (BAI3-) : Soluble Cytoplasmic Tagged
SNC : Système Nerveux Central
SNR : Signal to Noise Ratio
SYProt : SYnaptic Protein profiling approach
TAS1, 2 : récepteurs du goût (TAS_{te}) 1, 2

TCoB : Tubulin Cofactor B

TRITC : Tetraméthyle Rhodamine IsoThioCyanate (fluorophore rouge)

TrkA, B : récepteur Tyrosine kinase A, B

TSR : ThromboSpondin Repeat

TST : Tail Suspension Test

VEGF : Vascular Endothelium Growth Fator

VGLuT1, 2 : Vesicular Glutamate Transporteur 1, 2

VLGR1 : Very Large G protein coupled Receptor 1

Vstat120 : Vasculostatine

WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

ZO1 : Zonula Occludens-1

β-PIX : β-Pak-Interacting eXchange factor

Résumé

La dendritogenèse et la spinogenèse sont des étapes clés du développement neuronal. Elles impliquent de nombreuses protéines jouant un rôle essentiel dans la réorganisation du cytosquelette d'actine via les RhoGTPases. Des défauts dans ces processus peuvent mener à des maladies neurodéveloppementales comme l'autisme ou la schizophrénie. Les récepteurs BAI appartiennent à la famille des RCPG d'Adhésion et ont été identifiés dans des préparations biochimiques de densités postsynaptiques. BAI1 module la RhoGTPase Rac1 via son interaction avec la protéine ELMO1. De plus, les protéines sécrétées C1q-like ont récemment été identifiées comme ligands du récepteur BAI3 *in vitro* et cette interaction régulerait la synaptogenèse. Nous avons émis l'hypothèse que le récepteur BAI3 pourrait réguler le développement neuronal, en particulier la dendritogenèse et la spinogenèse, en interagissant avec ELMO1. Nos travaux ont montré que BAI3 est localisé dans les dendrites, et chez les neurones matures dans les épines dendritiques. Des études morphométriques nous ont permis de montrer son rôle dans la croissance et la complexification de l'arbre dendritique des neurones *in vitro*. Nos données *in vivo* sont en accord avec un rôle du récepteur BAI3 dans la morphogenèse des cellules de Purkinje du cervelet et la mise en place de leur innervation excitatrice. Le rôle de BAI3 dans la morphogenèse dendritique semble dépendre en partie de son interaction avec ELMO1. Par ailleurs, BAI3 module l'étalement cellulaire, suggérant son implication dans la régulation des RhoGTPases. L'ensemble de nos résultats met en lumière un nouveau rôle des récepteurs BAI comme régulateurs de la dendritogenèse et de la formation des synapses, en partie via la voie de signalisation ELMO1/Rac1. Nos résultats identifient les récepteurs BAI comme de nouveaux acteurs de la morphogenèse neuronale et, au vu du lien génétique existant entre BAI3 et certains symptômes de la schizophrénie, offrent de nouvelles perspectives dans l'étude des maladies neurodéveloppementales.

Mots-clés : BAI3, Rac1, dendritogenèse, spinogenèse, RCPG.

Abstract

Dendritogenesis and spinogenesis constitute key steps of neuronal development. They involve many proteins that play an essential role in the reorganization of the actin cytoskeleton through RhoGTPases. Defects in these processes can lead to neurodevelopmental disorders such as autism or schizophrenia. BAI receptors belong to the family of adhesion-GPCRs and have been identified in biochemical preparations of post-synaptic densities. BAI1 modulates the RhoGTPase Rac1 via its interaction with the protein ELMO1 in non-neuronal cells. C1q-like secreted proteins were recently identified as ligands for the BAI3 receptor *in vitro* and this interaction might regulate synaptogenesis. We thus hypothesized that BAI3 could regulate neuronal development, especially dendritogenesis and spinogenesis, via its interaction with ELMO1. Our work showed that BAI3 localizes in developing dendrites, and in mature neurons in dendritic spines. *In vitro*, morphometric studies have shown its role in the growth and complexity of the dendritic tree. *In vivo*, BAI3 is involved in the morphogenesis of cerebellar Purkinje cells and in the development of their excitatory innervation. These effects appear to depend in part on BAI3's interaction with ELMO1. BAI3 modulates cell spreading, suggesting its involvement in the regulation of RhoGTPases. Altogether, our results highlight a new role of BAI receptors as regulators of dendritogenesis and synapse formation partly via the signaling pathway ELMO1/Rac1. Given the potential link between BAI3 and some symptoms of schizophrenia, our results identify the BAI receptors as new players in neuronal morphogenesis and offer new perspectives in the study of neurodevelopmental disorders.

Key words: BAI3, Rac1, dendritogenesis, spinogenesis, GPCR.

Introduction

I. La dendritogenèse et la spinogenèse, deux étapes clés dans la formation d'un réseau neuronal fonctionnel

La formation d'un réseau neuronal fonctionnel est un phénomène complexe reposant sur plusieurs étapes, dont la différenciation et le développement des neurones aboutissant à la mise en place de connexions physiques entre ces derniers : les synapses.

Dans cette première partie, nous rappellerons brièvement les différentes étapes permettant la mise en place des connexions synaptiques. Nous décrirons ensuite plus en détail les processus de dendritogenèse et de spinogenèse, en développant les mécanismes moléculaires qui régulent le cytosquelette d'actine, acteur majeur de la formation des dendrites et des épines. Enfin, nous verrons que des défauts dans l'une des étapes permettant la formation des synapses peuvent mener à des maladies neurodéveloppementales comme l'autisme, différents retards mentaux ou encore la schizophrénie.

I.1. Les principales étapes de la genèse d'un réseau neuronal fonctionnel

I.1.1. Morphogenèse des neurones

Les neurones, issus de la division asymétrique des cellules progénitrices, migrent des zones de prolifération jusqu'à des zones spécifiques du futur Système Nerveux Central (SNC). À la fin de leur migration, les précurseurs neuronaux entreprennent d'importants processus de remodelage morphologique : ils perdent leur forme sphérique et étendent des protrusions dans leur environnement (**figure 1** ; Da Silva et Dotti, 2002; Dent et al., 2007). Ces protrusions, hautement dynamiques grâce à leur constitution riche en microfilaments d'actine qui se polymérisent et se dépolymérisent rapidement, « sentent » le milieu externe et détectent des molécules attractives ou répulsives qui guident leur direction d'extension. L'axone, déterminé en premier et guidé par ces molécules (Goshima et al., 2000), s'enfonce dans la substance blanche vers ses neurones cibles, tandis que l'arbre dendritique se met en place – souvent à l'opposé – durant le processus de dendritogenèse. Le développement de l'axone et de l'arbre dendritique permet ainsi aux neurones d'adopter une forme polarisée caractéristique, essentielle à la mise en place d'interactions synaptiques. Les dendrites se développent et forment des branchements grâce à la régulation du cytosquelette, dont nous détaillerons les mécanismes dans la deuxième partie de ce chapitre (cf. § I.2.). Ces dendrites

sont recouvertes de filopodes qui formeront les futures épines dendritiques (Dailey et Smith, 1996). Lors de la maturation des neurones, la morphologie de ces filopodes est modifiée via de profonds remaniements de leur cytosquelette d'actine et des protéines d'interaction qui lui sont associées, leur donnant la forme de « champignons » et aboutissant à des épines dendritiques matures (cf. § I.3). Le développement des épines est le plus souvent dépendant de leur connexion par des terminaisons axonales présynaptiques, mais certains neurones, comme les cellules de Purkinje, semblent posséder des mécanismes intrinsèques régulant ce phénomène (cf. § III.3.2.). Nous verrons dans la suite de cette introduction que la complexité de la morphologie des neurones est corrélée au nombre d'afférences synaptiques reçues.

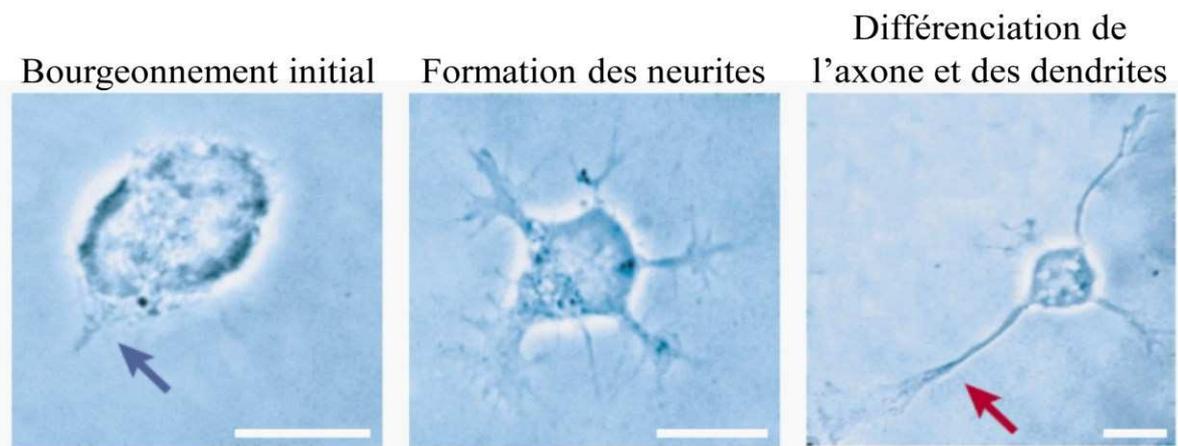


Figure 1 : Initiation de la morphogénèse des neurones.

Neurone d'hippocampe en culture en contraste de phase durant les premiers stades de neuritogénèse. Les neurones en développement perdent leur morphologie sphérique lors de la formation de bourgeons (flèche bleue) à leur surface qui s'étendent pour former des filopodes qui « sentent » le milieu. Par la suite l'axone (flèche rouge) et les dendrites se différencient et croissent (*d'après* Da Silva et Dotti, 2002).

I.1.2. Mise en place des connexions synaptiques

La formation des synapses se déroule en trois étapes : 1/ la reconnaissance du neurone cible par la terminaison nerveuse d'un neurone, 2/ la différenciation synaptique, qui correspond à la mise en place de l'échafaudage moléculaire créant le lien physique et fonctionnel entre les domaines pré- et postsynaptiques et 3/ la maturation de la synapse via un processus de stabilisation/déstabilisation aboutissant respectivement à la maintenance ou à l'élimination synaptique. Les synapses excitatrices sont majoritairement (>90%) formées sur les épines dendritiques présentes à la surface des dendrites (Kasai et al., 2003; Tada et Sheng, 2006), alors que les synapses inhibitrices peuvent se former directement sur les dendrites, sur

le soma ou encore sur l'axone, comme les interneurons en panier du cervelet qui contactent les cellules de Purkinje au niveau du segment initial de l'axone (cf. § III.3.3.1 ; Ango et al., 2004; Sotelo, 2008). Au début de la formation des synapses, des molécules d'adhésion permettent de stabiliser les contacts entre l'axone et le neurone cible (**figure 2 gauche** ; de Wit et al., 2009; Ko et al., 2009; Siddiqui et al., 2010). Lors de la seconde étape, les compartiments pré- et postsynaptiques se différencient. Pour cela, des protéines spécifiques des deux compartiments sont recrutées, comme par exemple les protéines d'échaffaudage sous la membrane postsynaptique ou les récepteurs aux neurotransmetteurs, présents dans les neurones avant la formation des synapses sous la forme de « paquets de transport » (**figure 2 centre** ; Ziv et Garner, 2001; McAllister, 2007). Enfin, la dernière étape permet la maturation de ces contacts en synapses fonctionnelles (**figure 2 droite**). Ce processus est régulé notamment par l'activité synaptique qui, comme nous le verrons ultérieurement, conduit à la croissance de la tête des épines dendritiques, et ainsi au renforcement et à la stabilisation des synapses. La phase de maturation inclut l'élimination de synapses surnuméraires et redondantes, permettant le raffinement des circuits neuronaux (Purves et Lichtman, 1980; Kano et Hashimoto, 2009). Ce mécanisme semble, entre autres, être régulé par des molécules de la cascade du complément (Stevens et al., 2007).

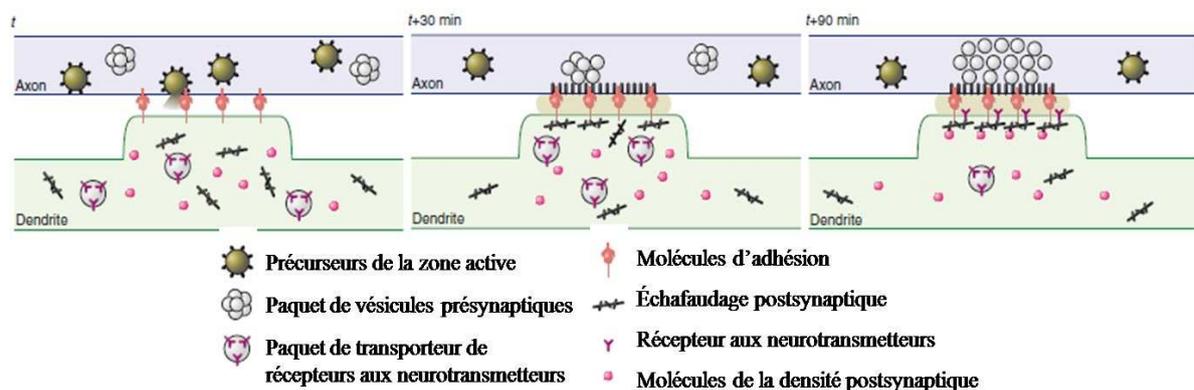


Figure 2 : La mise en place des synapses se fait en plusieurs étapes.

Lors du contact entre l'axone et son neurone cible, des molécules d'adhésion pré- et postsynaptiques sont recrutées afin de stabiliser le contact. Par la suite, les compartiments pré- et postsynaptiques se différencient : des récepteurs aux neurotransmetteurs sont recrutés à la surface de la membrane postsynaptique, tandis que des vésicules transportant les neurotransmetteurs se concentrent du côté présynaptique (*d'après* Ziv et Garner, 2001).

I.2. La dendritogenèse

I.2.1. Description du phénomène de dendritogenèse

La dendritogenèse est un phénomène essentiel pour la formation d'un réseau neuronal fonctionnel car elle permet aux neurones de passer d'une forme ronde de surface réduite à une forme complexe occupant un territoire suffisamment étendu pour recevoir toutes les afférences synaptiques qui leur sont destinées (Da Silva et Dotti, 2002). C'est par exemple le cas des cellules de Purkinje du cervelet qui étendent leur arbre dendritique sur plusieurs centaines de microns pour maximiser l'interaction avec les fibres parallèles (Ito, 2006).

L'élaboration de l'arbre dendritique débute par la formation de filopodes à la surface du soma qui vont « sentir » le milieu extérieur puis s'allonger et se rétracter de manière très dynamique. Les filopodes croissent et s'étendent autour du soma sous la forme de neurites à l'origine de l'axone et des dendrites. Au cours de la différenciation dendritique, de nouveaux filopodes émergent à la surface des dendrites et s'étendent à leur tour de façon dynamique avant de se stabiliser, donnant naissance à des dendrites secondaires (Dailey et Smith, 1996).

Les premiers stades de la dendritogenèse reposent sur des facteurs intrinsèques aux neurones. En effet, l'observation du développement de neurones en culture montre que ceux-ci développent une morphologie très proche de leur morphologie *in vivo*, sans toutefois atteindre la forme des neurones adultes (Montague et Friedlander, 1989, 1991; Baptista et al., 1994; Threadgill et al., 1997; Metzger et al., 1998; Spatkowski et Schilling, 2003). Des études ont montré le rôle de certains facteurs de transcription (Hand et al., 2005; Boukhtouche et al., 2006). Ainsi, l'activation de la Neurogénine 2 est suffisante pour induire le développement unipolaire des dendrites dans les neurones pyramidaux du cortex cérébral (Hand et al., 2005). Le récepteur nucléaire ROR α (Retinoic acid receptor related Orphan Receptor α) régule l'initiation de la morphogenèse dendritique des cellules de Purkinje (Boukhtouche et al., 2006). Dans ces modèles, les facteurs de transcription semblent contrôler l'expression de gènes codant pour des protéines régulant le cytosquelette (Sotelo et Dusart, 2009), dont le rôle essentiel durant la dendritogenèse sera développé dans la partie suivante (cf. § I.2.2). Des facteurs extrinsèques sont essentiels à la formation d'arbres dendritiques matures. Certaines molécules, également connues pour leurs rôles dans le guidage axonal, sont impliquées dans l'orientation ou la complexification de l'arborisation dendritique. Il a notamment été montré que la sémaphorine 3A, connue pour son rôle répulsif dans le guidage de l'axone, est à l'inverse un facteur chemoattractant pour les dendrites des neurones corticaux et induit leur

croissance vers la surface piaie (Polleux et al., 2000). De même, la molécule Slit1 et ses récepteurs ROBO1 et ROBO2 induisent, durant la dendritogenèse des neurones corticaux, la formation d'embranchements, permettant ainsi d'augmenter la complexité de l'arborisation dendritique (Whitford et al., 2002).

I.2.2. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la dendritogenèse

I.2.2.1 Le cytosquelette, acteur majeur de la dendritogenèse

La dendritogenèse débute par la formation de filopodes à la surface des cellules (Da Silva et Dotti, 2002), fines protrusions constituées de faisceaux d'actine filamenteuse (F-actine) qui semblent fonctionner comme des senseurs de l'environnement externe (Chhabra et Higgs, 2007). La polymérisation de l'actine entraîne l'extension des filopodes en neurites, qui sont ensuite envahis en leur centre par des microtubules orientés avec leur extrémité (-) vers le corps cellulaire (Dailey et Smith, 1996). Lors de la différenciation des neurites, l'axone conserve l'orientation d'origine des microtubules, tandis que les dendrites en développement sont envahies par des microtubules avec l'extrémité (-) distale (**figure 3**). Ces microtubules débutent leur polymérisation dans le corps cellulaire des neurones et sont transportés dans les dendrites grâce à des moteurs moléculaires comme la protéine CHO/MKLP1 (Baas et al., 1988, 1989; Sharp et al., 1997; Stone et al., 2008). Le blocage de la polymérisation de la F-actine par des drogues telles que la cytochalasine D ou par l'expression ectopique de protéines de stabilisation durant les premiers stades de développement des dendrites entraîne l'inhibition de la formation des filopodes et donc de la formation des neurites (Lafont et al., 1993; Dent et al., 2007). Par la suite, le blocage de la polymérisation de l'actine n'interfère plus avec la croissance des dendrites, les microtubules permettant leur stabilisation et leur croissance (Lafont et al., 1993).

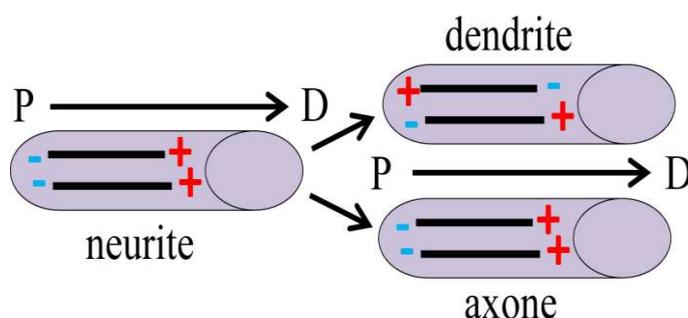


Figure 3 : Durant le développement, des microtubules avec l'extrémité (-) distale envahissent les dendrites.

Dans les neurites indifférenciés, les microtubules sont orientés avec leur extrémité (-) proximale (P) et leur extrémité (+) distale (D). Alors que les axones conservent cette orientation, les dendrites sont envahies de microtubules polymérisés dans le soma et transporté avec leur extrémité (-) distale.

La dynamique des microtubules entraîne l'élongation des dendrites ; des expériences *in vitro* réalisées sur des neurones d'hippocampe en culture ont montré que le blocage de leur extrémité de croissance par la protéine associée aux microtubules 2 (Microtubules Associated Protein 2, MAP2) phosphorylée permet l'arrêt de la croissance des dendrites et induit la formation d'embranchements dendritiques (Audesirk et al., 1997; Hely et al., 2001). En parallèle, la modulation du cytosquelette d'actine induit la formation de nouveaux filopodes à la surface des dendrites. À nouveau, ces filopodes sont hautement dynamiques : ils s'allongent et se rétractent rapidement et leur invasion par les microtubules permet la formation de nouvelles dendrites. De nombreuses protéines associées au cytosquelette sont impliquées dans la mise en place d'embranchements. Par exemple, il a été montré chez *Drosophila melanogaster* que Shortstop, une protéine liant les deux types de cytosquelette, régule le branchement hautement ordonné des neurones du système nerveux périphérique (Gao et al., 1999). Par ailleurs, le complexe Actin-related proteins 2/3 (Arp2/3) lie la F-actine et induit la nucléation de nouveaux filaments branchés (Da Silva et Dotti, 2002; Insall et Machesky, 2009; Ridley, 2011). Ce complexe est activé par les protéines de la famille Wiskott-Aldrich syndrome (WASP) WAVE et N-WASP (Etienne-Manneville et Hall, 2002) et la surexpression de N-WASP dans des neurones d'hippocampe en culture induit une augmentation du nombre de neurites et du nombre d'embranchements des neurones en développement (Pinyol et al., 2007; Rocca et al., 2008). La liaison du complexe Arp2/3 par la protéine synaptique PICK1 empêche quant à elle l'interaction de N-WASP et Arp2/3, entraînant une diminution du nombre de branchements dendritiques distaux mais une augmentation du nombre d'embranchements dendritiques proximaux (Rocca et al., 2008), démontrant ainsi le rôle important de ces protéines dans le développement correct de l'arborisation dendritique des neurones. Cordon-bleu (Cobl) est également un facteur de nucléation de l'actine exprimé dans le cerveau. Il agit indépendamment d'Arp2/3 pour promouvoir l'élongation de F-actine non branchée. La surexpression du domaine C-terminal de Cobl, nécessaire à son activité, dans des neurones d'hippocampe en culture induit la formation d'un arbre dendritique très ramifié (Ahuja et al., 2007). Enfin, les Septines, des GTPases impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine et des microtubules jouent aussi un rôle dans la formation d'embranchements dendritiques : *in vitro*, le blocage de leur expression à l'aide d'ARN interférence (ARNi) induit une diminution du nombre d'embranchements dendritiques dans les neurones d'hippocampe (Tada et al., 2007). Par ailleurs, il a aussi été montré que certaines protéines de l'échafaudage postsynaptique, comme la protéine PostSynaptic Density 95 (PSD95) ou les protéines Shank, jouent un rôle précoce

dans la formation des branchements dendritiques (Vessey et Karra, 2007). Une régulation fine du cytosquelette est donc essentielle à la formation des dendrites.

1.2.2.2 Les RhoGTPases régulent le cytosquelette lors du développement des dendrites

Les petites RhoGTPases Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), Cell division control 42 (Cdc42) et Ras homologous member A (RhoA) sont des acteurs essentiels de la régulation du cytosquelette d'actine et, dans une moindre mesure, des microtubules. Par exemple, Rac1 et Cdc42 promeuvent la polymérisation et le branchement de l'actine en activant le complexe Arp2/3 (Da Silva et Dotti, 2002; Insall et Machesky, 2009; Ridley, 2011). À l'inverse, RhoA active la Formine, une protéine qui inhibe l'élongation rapide des filaments d'actine, induisant une extension lente et non branchée des microfilaments (Chen et Firestein, 2007; Insall et Machesky, 2009; Ridley, 2011).

Ces RhoGTPases sont exprimées dès le 16^{ème} jour embryonnaire (E16) dans le cortex en développement (Threadgill et al., 1997), suggérant leur implication dans le développement neuronal. Depuis le début des années 1990, des études sur des formes dominantes négatives ou, à l'inverse, constitutivement actives de Rac1, Cdc42 et RhoA ont permis de mieux comprendre leurs fonctions durant le développement des dendrites. L'expression d'une forme constitutivement active de Rac1 dans des neurones corticaux de rats ou des neurones du tectum optique de Xénope induit une augmentation du nombre de dendrites primaires et un renforcement de la dynamique d'élongation/rétraction des branchements dendritiques (Threadgill et al., 1997; Li et al., 2000). À l'inverse, le blocage de l'activité de Rac1 par l'expression d'une forme dominante négative entraîne une diminution d'environ 50% du nombre de dendrites primaires (Threadgill et al., 1997) – sans affecter le développement de l'axone (Gualdoni et al., 2007) – démontrant ainsi le rôle majeur de Rac1 dans la dendritogenèse, notamment lors des processus d'élongation et de branchement. De même, l'expression d'une forme dominante négative de Cdc42 entraîne une diminution – plus faible – du nombre de dendrites primaires (Threadgill et al., 1997; Li et al., 2000). Dans les fibroblastes, Cdc42 joue un rôle majeur lors de la formation des filopodes (Insall et Machesky, 2009; Ridley, 2011). Plusieurs études ont d'ailleurs suggéré un rôle de Cdc42 dans l'initiation de la dendritogenèse, au moment où le neurone, sphérique, commence à étendre des filopodes (*pour revue voir* Da Silva et Dotti, 2002; Luo, 2002). Cette RhoGTPase semble donc être impliquée plus généralement dans la formation des neurites, *i.e.* axones et dendrites. Enfin, la RhoGTPase RhoA joue, elle, le rôle de régulateur négatif de la croissance et du

branchement dendritiques. L'expression d'une forme constitutivement active de RhoA provoque en effet une simplification de l'arbre dendritique en réduisant l'élongation des microfilaments d'actine (Li et al., 2000; Nakayama et al., 2000). RhoA inhibe la neuritogenèse en formant des complexes avec la kinase ROCK et la Profiline IIa qui diminuent la stabilité des filaments d'actine et induisent l'élimination des dendrites (Nakayama et al., 2000; Da Silva et al., 2003).

Dans une moindre mesure, les RhoGTPases sont aussi impliquées dans la régulation de la polymérisation des microtubules. Notamment, Rac1 et Cdc42 interagissent avec la protéine effectrice Pak1 (p21-activating kinase 1) qui phosphoryle le cofacteur B de la tubuline (Tubulin Cofactor B, TCoB) et régule ainsi la dynamique des microtubules (Vadlamudi et al., 2005). Dans les fibroblastes, la polymérisation des microtubules entraîne l'activation de Rac1 et la formation de protrusions riches en F-actine (Waterman-Storer et al., 1999). Réciproquement, Rac1 – et Cdc42 – induit la phosphorylation de la stathmine, une protéine séquestrant les monomères de tubuline et provoquant la dépolymérisation des microtubules (Daub et al., 2001). Des expériences réalisées sur des neurones de ganglions sympathiques d'embryons de poulet ont mis en évidence l'existence d'un rétrocontrôle positif entre l'activation de Rac1 et la croissance des microtubules dans les neurones. En effet, dans les cônes de croissance des neurites, la polymérisation des microtubules induit l'activation de Rac1 et la formation de protrusions riches en F-actine ; en retour, Rac1 inhibe la dépolymérisation des microtubule (Grabham et al., 2003). Enfin, l'activation de RhoA entraîne une diminution de l'expression de la Cypine, une guanine déaminase qui lie les dimères de tubuline et induit la formation des microtubules, diminuant ainsi le nombre de branchements dendritiques (Chen et Firestein, 2007).

Les RhoGTPases sont retrouvées dans les cellules sous deux configurations : liée au GTP activée et liée au GDP inactivée. L'activité des RhoGTPases est régulée par des facteurs d'échange de guanine (Guanine Exchange Factor, GEF) et des protéines induisant l'activité GTPase (GTPase-Activating Proteins, GAP). Les GEF activent les RhoGTPases en catalysant l'échange d'un nucléotide de guanine, tandis que les GAP stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP, ramenant les RhoGTPases dans une conformation inactive liée au GDP (Etienne-Manneville et Hall, 2002; Insall et Machesky, 2009). Dans le SNC, deux GEF ont été mis en évidence pour leurs rôles importants dans la morphogenèse des dendrites : Tiam1 et la Kalirine7, qui lient et activent Rac1 via leur domaine d'homologie à Dbl (Dbl Homology, DH). Tiam1 est exprimé dans les neurones pyramidaux du cortex cérébral, dans les

interneurones et les neurones pyramidaux de l'hippocampe, ainsi que dans le stratum radiatum de la Corne d'Amon 1 (CA1) de l'hippocampe, une région riche en synapses, dès E18. Son expression décroît progressivement durant le développement postnatal. Des analyses en microscopie électronique ont montré que, dans le stratum radiatum des rats adultes, Tiam1 est localisé dans la densité postsynaptique (Tolias et al., 2005). L'expression d'ARNi dirigés contre Tiam1 dans des neurones d'hippocampe en culture induit une simplification de l'arborisation dendritique, indiquant que cette protéine est impliquée dans la croissance et le branchement des dendrites (Tolias et al., 2005). La Kalirine7 est, elle aussi, exprimée de façon prédominante dans le cerveau et localisée dans les épines dendritiques (Johnson et al., 2000; Ma et al., 2003). À l'inverse des autres GEF, la Kalirine7 n'est pas exprimée durant la période prénatale : son expression ne débute qu'aux alentours du 10^{ème} ou 15^{ème} jour postnatal (P10-P15) (Ma et al., 2003; Xie et al., 2007). Comme pour Tiam1, la diminution de l'expression de la Kalirine7 induite par des ARNi conduit à une simplification de l'arbre dendritique apical des neurones d'hippocampe, suivie d'une diminution du nombre de dendrites basales (Ma et al., 2003). Un GEF non conventionnel de Rac1, Dedicator of cytokinesis 180 (Dock180), a également été impliqué dans le contrôle du développement des neurites (Katoh et Negishi, 2003) et plus récemment, dans le développement de l'arbre dendritique (Kim et al., 2011). Dock180 est un GEF particulier de Rac1 car il ne contient pas de domaine DH comme les autres GEF mais un domaine Docker qui lie et active Rac1 (Brugnera et al., 2002). De plus, son activité GEF est dépendante de sa liaison à la protéine cytoplasmique Engulfment and cell MObility 1 (ELMO1) (Gumienny et al., 2001; Lu et al., 2004; Komander et al., 2008). Des expériences réalisées *in vitro* sur une lignée cellulaire dérivée de phéochromocytome de rat (PC12) a montré que l'expression d'une forme dominante négative de Dock180 et/ou une forme tronquée en N-terminal d'ELMO1 supprime la croissance des neurites (Katoh et Negishi, 2003). Par ailleurs, l'inhibition de l'expression de Dock180 par ARNi induit une diminution de l'arborisation dendritique de neurones d'hippocampe en culture, suggérant un rôle pour le complexe bipartite ELMO1/Dock180 dans le contrôle de Rac1 au cours de la dendritogenèse (Kim et al., 2011).

1.2.2.3 Les protéines en amont des RhoGTPases et des GEF

En amont des RhoGTPases et de leurs régulateurs les GEF, de nombreux signaux extracellulaires sont impliqués dans la dendritogenèse, incluant des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion ou encore des neurotransmetteurs.

Par exemple, le NGF (Nerve Growth Factor) est une molécule sécrétée qui induit la formation des neurites, notamment en régulant la réorganisation du cytosquelette d'actine. Pour cela, le NGF interagit avec le récepteur Tyrosine kinase A (TrkA) qui induit l'activation de Rac1 via le GEF Tiam1 (**figure 5**) et entraîne ainsi la croissance des dendrites (Shirazi Fard et al., 2010). Dans les PC12, la croissance des neurites induite par le NGF est aussi régulée par la RhoGTPase RhoG qui semble activer la cascade de signalisation ELMO1/Dock180/Rac1 (Kato et Negishi, 2003). De même, le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) se lie au récepteur TrkB et active la voie moléculaire Tiam1/Rac1 (Shirazi Fard et al., 2010). Il a aussi été montré *in vitro* que l'addition de BDNF au milieu de culture de neurones corticaux induit la phosphorylation de CDKL5 (Cyclin-Dependant Kinase-Like 5), une sérine/thréonine kinase dont certaines mutations ont été découvertes chez des patients atteints de retard mental (Tao et al., 2004; Scala et al., 2005; Archer et al., 2006). Cet effet semble reposer sur l'activation du récepteur au BDNF TrkB (**figure 4**). Phosphorylé, CDKL5 induit l'activation de Rac1 et promeut la croissance dendritique (Chen et al., 2010).

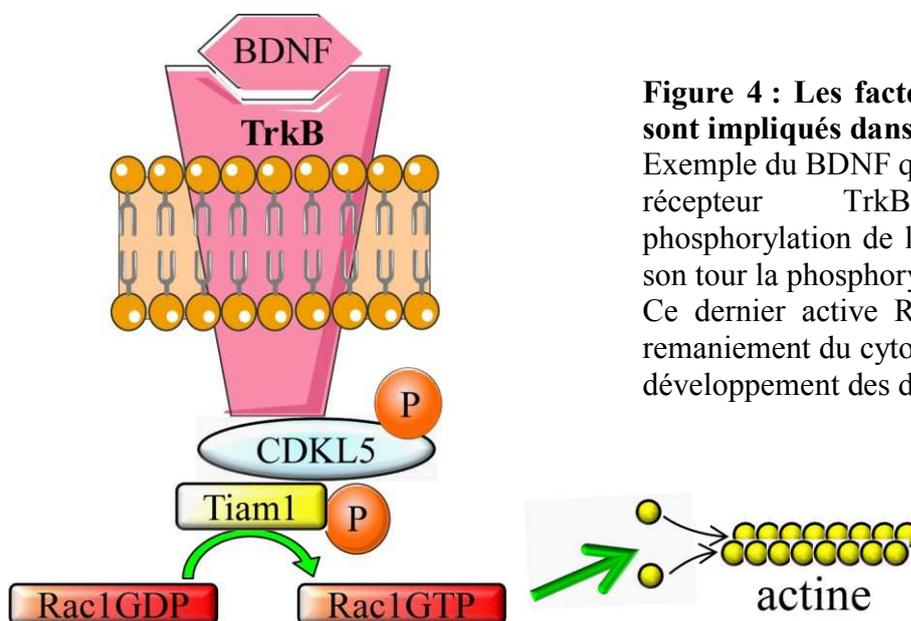


Figure 4 : Les facteurs neurotrophiques sont impliqués dans la dendritogenèse.

Exemple du BDNF qui, en se fixant sur son récepteur TrkB, entraîne la phosphorylation de la CDKL5 qui induit à son tour la phosphorylation du GEF Tiam1. Ce dernier active Rac1, régulant ainsi le remaniement du cytosquelette d'actine et le développement des dendrites.

D'autres protéines interagissant avec les Cyclin-Dependent Kinases (CDK) durant le contrôle du cycle cellulaire jouent un rôle dans l'initiation de la dendritogenèse. Notamment, les protéines de la famille ORC (Origin Recognition Complex), exprimées dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet murins, sont exclues, durant le développement neuronal, de l'axone différencié, mais pas des dendrites, et l'inhibition de l'expression des ORC *in vitro* dans des neurones d'hippocampe par une technique d'ARN interférence entraîne une

réduction importante du nombre de dendrites. Les protéines ORC pourraient donc réguler le cytosquelette d'actine, via leur interaction avec des kinases de type CDK, lors de la formation des dendrites et des branchements dendritiques (Huang et al., 2005). De manière intéressante, le gène codant pour ORC3-like est muté dans certains symptômes de la schizophrénie, maladie neurodéveloppementale caractérisée par une simplification de l'arborisation dendritique (cf. § I.4.2. ; DeRosse et al., 2008), appuyant le rôle potentiel de ces protéines dans le développement neuronal.

La Nétrine 1 est une molécule de la matrice extracellulaire mise en évidence au début des années 1990 pour son rôle dans le guidage axonal. Plus récemment, des expériences de transfert d'énergie de fluorescence (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) réalisées sur une lignée cellulaire issue de neuroblastomes exprimant le récepteur de la Nétrine 1 UNC5A ont mis en évidence l'activation de Rac1 et Cdc42, puis de RhoA par la Nétrine 1 au cours de la neuritogenèse (Picard et al., 2009). La Nétrine 1 serait donc impliquée dans l'initiation et la croissance des dendrites, puis dans leur stabilisation. Tiam1 a été identifié *in vitro* et *in vivo* comme un partenaire des molécules éphrines A1 et B1 et de leur récepteur EphA2. *In vitro*, la liaison des ligands éphrines A1 et B1 sur leur récepteur EphA2 induit la polymérisation de l'actine et la croissance des dendrites en activant Tiam1 et Rac1 (**figure 5** ; Tanaka et al., 2004). Les intégrines sont aussi impliquées dans le développement de l'arbre dendritique, notamment dans les mécanismes d'embranchement. Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont effectivement montré que la liaison des intégrines à la laminine – durant le développement précoce – ou à la sémaphorine 7A induit la croissance et la complexification de l'arbre dendritique des neurones corticaux (Moresco et al., 2005). Cet effet est dépendant de la présence des tyrosines kinases de la famille Abelson (Abl ; **figure 5**) (Moresco et al., 2005). Les protéines Abl stimulent l'extension et le branchement des dendrites en inhibant l'activité de RhoA. Notamment, des expériences sur des cultures de neurones d'hippocampe ont montré que l'inhibition d'Abl entraîne une augmentation de l'activité de RhoA et une importante simplification de l'arbre dendritique. À l'inverse, l'expression d'une forme constitutivement active d'Abl induit la formation de nouveaux embranchements et de nouvelles dendrites (Jones et al., 2004).

Par ailleurs, l'activité synaptique qui débute durant le développement favorise la croissance et la complexification de l'arbre dendritique des neurones. Il a par exemple été mis en évidence *in vitro* que l'activation du récepteur N-Méthyl-D-Aspartate (NMDAR) entraîne la phosphorylation de Tiam1, favorisant l'activation de Rac1 et la polymérisation de l'actine, et ainsi la croissance dendritique (Rajan et al., 1999; Tolia et al., 2005). En parallèle, le NMDAR inhibe l'activation de RhoA, empêchant ainsi la régression des dendrites (**figure 5** ; Li et al., 2000).

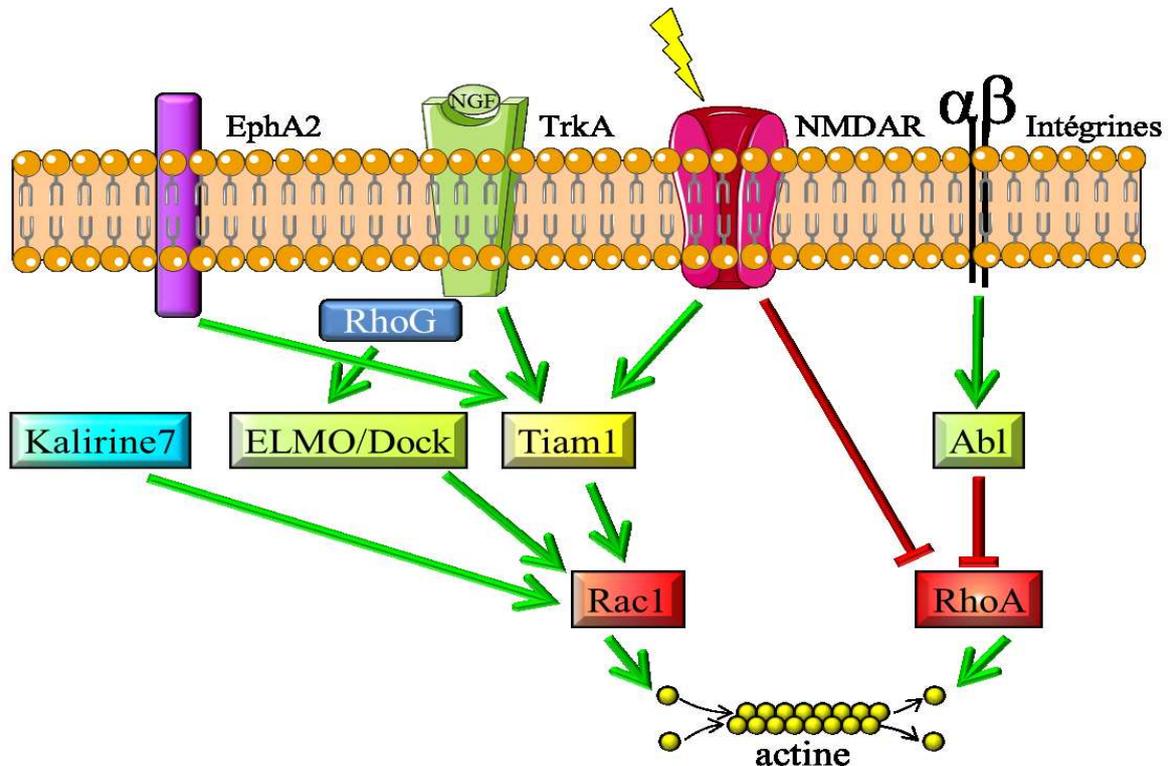


Figure 5 : Les protéines transmembranaires en amont des RhoGTPases régulent la dendritogenèse.

Les récepteurs d'adhésion (EphA, intégrines), les récepteurs aux facteurs neurotrophiques (TrkA) ou encore les récepteurs aux neurotransmetteurs (NMDAR) sont des acteurs importants de la dendritogenèse en amont des RhoGTPases. L'activation de Rac1 en aval de ces différents récepteurs entraîne la polymérisation de l'actine et ainsi la croissance dendritique. De même, l'inhibition de RhoA empêche la dépolymérisation de l'actine, permettant là encore l'allongement des dendrites.

I.3. La spinogénèse

I.3.1. Caractéristiques des épines dendritiques

I.3.1.1 Généralités

« [...] la surface... apparaît hérissée de pointes ou de courtes épines », Ramón y Cajal, 1888.

Voilà plus d'un siècle que les épines dendritiques passionnent les neurobiologistes et cet intérêt s'est accru depuis une trentaine d'années avec, dans un premier temps, la mise en évidence d'une corrélation entre les maladies neurologiques et la morphologie des épines (Sekino et al., 2007) et, plus récemment, l'amélioration des techniques d'imagerie en temps réel qui ont permis d'observer les épines *in vivo* (Tada et Sheng, 2006).

Les épines dendritiques forment de petites protrusions à la surface des dendrites de la plupart des neurones sur lesquelles se forment la majorité des synapses excitatrices (>90%). Bien qu'elles présentent des formes variées, leur morphologie commune, qui ressemble à un « champignon », consiste en une tête d'un diamètre variant de 0,4 à 1,5 μm , et d'un cou reliant la tête à la dendrite sous-jacente. Leur taille totale – *i.e.* de la base du cou au haut de la tête – est d'environ 2,5 μm (Harris et al., 1992). Le cou des épines semble servir de barrière empêchant la diffusion des molécules, formant ainsi des microcompartiments dans lesquels les variations biochimiques peuvent être isolées des autres synapses faites sur le même neurone (Bosch et Hayashi, 2011). Au début du développement, les épines sont fines et allongées. Elles prennent graduellement la forme d'un « champignon » au fur et à mesure du développement neuronal. Des études en microscopie électronique ont identifié trois catégories d'épines en fonction de leur morphologie (**figure 6**) : les « thin » : protrusions de type filopodes, les « stubby » : des épines courtes, dépourvues de cou, et les « mushroom » : ces épines présentent une large tête et un cou fin (Bourne et Harris, 2008). Mais il semble que les épines ne soient pas statiques et puissent changer de morphologie continuellement. En effet, les différentes tailles et morphologies observées semblent être corrélées à la robustesse des synapses formées : les épines pourvues d'une large tête expriment à leur surface plus de récepteurs au glutamate de type AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisozazol-4-Propionate Acid). Ces épines sont plus stables et forment des connexions plus robustes avec les terminaisons axonales. À l'inverse, les épines présentant une tête plus fine sont instables et motiles (Kasai et al., 2003; Matsuzaki et al., 2004). L'activité synaptique conduisant à une potentiation à long terme (Long Terme Potentiation, LTP) promeut la formation de nouvelles

épines et l'augmentation de la taille des épines existantes. En augmentant la taille des épines dendritiques et donc la robustesse des synapses, la LTP participe à la plasticité synaptique, et cette modulation contribuerait au stockage de la mémoire (Hosokawa et al., 1995; Kasai et al., 2003; Matsuzaki et al., 2004).

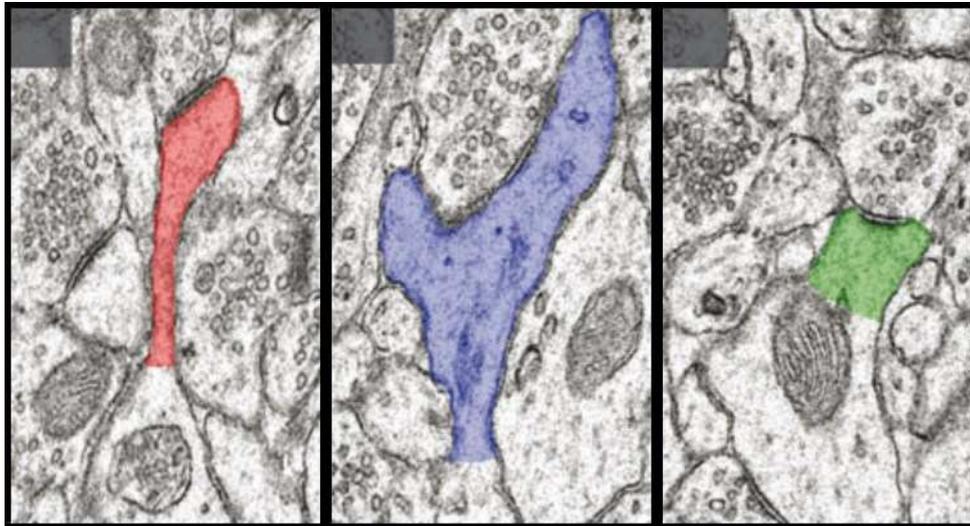


Figure 6 : Les différentes catégories d'épines dendritiques.

Les épines de type « thin » (rouge) ont une tête et un cou fins ; les épines de type « mushroom » (bleu) présentent un cou fin et une tête large ; les épines de type « stubby » (vert) sont des épines courtes et dépourvues de cou (*d'après* Bourne et Harris, 2008).

1.3.1.2 Bref aperçu de la constitution moléculaire des épines dendritiques

Dans la tête des épines dendritiques, sous la membrane plasmique postsynaptique, se trouve la densité postsynaptique (PostSynaptic density, PSD). La PSD est une structure en forme de disque dense aux électrons, constituée d'une multitude de protéines (Bosch et Hayashi, 2011) liées les unes aux autres au niveau de domaines d'interaction spécifiques comme le domaine PDZ ((Post Synaptic Density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1) and Zonula Occludens-1 protein (ZO-1)). Ce domaine est l'un des plus importants puisqu'il permet la formation d'une structure maillée organisée en couches consécutives. Parmi les constituants de la PSD, on trouve des récepteurs aux neurotransmetteurs (AMPA, NMDAR, ...), des protéines d'échafaudage comme la protéine PSD95 ou les protéines Shank qui stabilisent les récepteurs et constituent environ 8% des protéines de la PSD, des canaux ioniques, des molécules d'adhésion (7%) et des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), des GTPases et leurs régulateurs (8%) et des composants du cytosquelette d'actine (12%) (Sheng et Hoogenraad, 2007). Les microfilaments d'actine

servent de cadre structurel pour l'épine et jouent également un rôle important dans la régulation du trafic vésiculaire. En plus des constituants de la PSD, certaines épines possèdent aussi un réticulum endoplasmique lisse, qui semble être impliqué dans le stockage et le relargage du calcium (Spacek et Harris, 1997), et des endosomes, essentiels pour la dégradation ou le recyclage des protéines membranaires (Blanpied et al., 2002).

I.3.2. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la spinogénèse

I.3.2.1 L'actine joue un rôle clé dans la spinogénèse

La spinogénèse, processus par lequel se forment les épines dendritiques, débute durant le développement des dendrites. En effet, lors de la dendritogénèse, des filopodes se forment à la surface des dendrites stabilisées (Dailey et Smith, 1996). Certains de ces filopodes, envahis par les microtubules, se développent en neurites, tandis que les autres restent à l'état de fines protrusions membranaires de quelques microns de long. Par la suite, les terminaisons axonales contactent ces fines protrusions et les stabilisent, réduisant ainsi leur motilité. Dès lors, la longueur des filopodes diminue et les épines dendritiques à proprement parler se forment. Alors que le cou des épines reste constitué de F-actine organisée en faisceaux parallèles comme dans les filopodes, la tête des épines grossit grâce à l'activation des complexes Arp2/3 qui permettent le branchement de la F-actine et entraînent ainsi la mise en place d'un réseau d'actine (Hotulainen et al., 2009). Les protéines de la PSD sont ensuite recrutées, notamment la protéine d'échafaudage PSD95, qui semble essentielle pour stabiliser les épines (Ehrlich et al., 2007). En parallèle, le début de l'activité synaptique, lié à la présence des terminaisons présynaptiques, induit le recrutement des récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique, entraînant la maturation et la stabilisation des épines par la régulation de voies moléculaires qui contrôlent la réorganisation du cytosquelette d'actine (Yoshihara et al., 2009). La polymérisation et le branchement de l'actine jouent donc un rôle crucial dans le développement des épines dendritiques. De surcroît, le blocage de la polymérisation de l'actine empêche la LTP, démontrant le rôle prépondérant des microfilaments non seulement au cours du développement mais aussi, par la suite, dans la plasticité des connexions synaptiques (Chen et al., 2007). Cependant, si le développement des épines est essentiel à la mise en place des synapses, l'inverse n'est pas toujours vérifié. En effet, les cellules de Purkinje, majoritairement connectées par les cellules granulaires, développent des épines dendritiques normales même en absence de leurs afférences (Rakic et Sidman, 1973; Mariani et al., 1977).

I.3.2.2 Les voies moléculaires impliquées dans la spinogénèse

La formation et la dynamique – *i.e.* la plasticité – des épines dendritiques sont majoritairement liées à la régulation du cytosquelette d'actine, notamment par les RhoGTPases. De nombreuses voies moléculaires impliquées dans la régulation des RhoGTPases et du cytosquelette d'actine ont été mises en évidence au cours des quinze dernières années.

Luo et ses collaborateurs ont proposé un rôle important des RhoGTPases dans le développement des neurones. Pour vérifier leur hypothèse, ils ont généré des lignées de souris transgéniques exprimant, spécifiquement dans les cellules de Purkinje, une forme humaine constitutivement active de Rac1. La complexité de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje dans ces mutants est légèrement simplifiée alors que les épines de ces neurones présentent, elles, une importante diminution de leur taille, accompagnée d'une augmentation de leur densité. De plus, ces épines présentent fréquemment des synapses surnuméraires (Luo et al., 1996). À l'inverse, l'inactivation du gène codant pour Rac1, spécifiquement dans les neurones d'hippocampe *in vivo*, entraîne une diminution de la densité des épines accompagnée d'une augmentation de la surface de la PSD et de la tête de ces épines (Haditsch et al., 2009). Par ailleurs, des études réalisées *in vitro* sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe ont montré que l'expression de Rac1 augmente durant le développement (Wiens, 2005). Des données contradictoires, bien que confirmant le rôle important de Rac1 dans le développement des épines, ont été obtenues *in vitro* (Wiens, 2005; Tashiro et Yuste, 2008). En effet, la surexpression ou l'expression d'une forme constitutivement active de Rac1 dans des neurones d'hippocampe en culture induit une augmentation du diamètre des épines dendritiques existantes, avec notamment un élargissement du diamètre de la tête (Wiens, 2005; Tashiro et Yuste, 2008), contrastant avec les épines miniatures observées par Luo et ses collaborateurs *in vivo* (Luo et al., 1996). Dans les neurones immatures, l'expression de Rac1 constitutivement actif induit la formation d'épines larges (Wiens, 2005). À l'inverse, l'expression d'une forme dominante négative induit la formation d'épines longues mais de faible diamètre et leur densité est diminuée (Tashiro et Yuste, 2008).

Cdc42 semble jouer des rôles similaires à Rac1 dans la régulation de la dendritogénèse (Threadgill et al., 1997; Li et al., 2000), mais il existe à l'heure actuelle peu de données expérimentales sur son rôle dans la spinogénèse. Une étude a cependant suggéré que cette RhoGTPase pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la spinogénèse en promouvant la

formation de filopodes à la surface des dendrites via l'activation de l'effecteur Pak3 (Kreis et al., 2007). Par ailleurs, des expériences réalisées *in vitro* sur des neurones d'hippocampe en culture ont montré que l'inhibition de RhoA par la transférase C3 entraîne une augmentation de la densité et de la longueur des épines dendritiques, tandis que l'expression d'une forme constitutivement active de cette GTPase induit une diminution de la densité et de la taille des épines (Tashiro et Yuste, 2008), suggérant la coopération des différentes RhoGTPases dans le processus de spinogénèse.

Une récente étude a mis en évidence l'implication de Dock180 dans la régulation de la spinogénèse. Par des expériences de modulation de son expression ou de celle de son partenaire ELMO1 dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe, cette étude a montré que l'absence de Dock180 entraîne une diminution de la densité des épines dendritiques et une simplification de l'arborisation dendritique. De même, l'inhibition de l'expression d'ELMO1 induit une diminution de la densité des épines dendritiques, mais aucune modification de la complexité de l'arborisation dendritique n'a été observée dans ce cas. En revanche, les auteurs ont observé un phénotype spécifique à l'absence d'ELMO1 : l'apparition de filopodes à la surface des dendrites. Des phénotypes différents ont aussi été observés dans les neurones surexprimant Dock180 et ceux surexprimant ELMO1. En effet, la surexpression de Dock180 entraîne la formation d'un grand nombre d'épines branchées et de protrusions membranaires de types lamellipodes, tandis que la surexpression d'ELMO1 entraîne une augmentation de la densité des épines mais n'induit pas la formation de lamellipodes ou d'épines de forme anormale. Ces différents phénotypes suggèrent que Dock180 et ELMO1 pourraient être impliqués indépendamment dans d'autres voies de signalisation. Par ailleurs, les auteurs ont suggéré que, dans ce processus, le complexe ELMO1/Dock180 agit en aval de la RhoGTPase RhoG, précédemment mise en évidence dans la régulation de la cascade moléculaire ELMO1/Dock180/Rac1 (cf. § I.2.2.3 ; Katoh et Negishi, 2003). De fait, les effets sur le développement des épines induits par l'expression d'une forme constitutivement active – diminution de la densité des épines – ou d'un dominant négatif de RhoG – augmentation de la densité des épines et développement d'épines anormales – peuvent être réversés par le blocage ou la surexpression d'ELMO1, respectivement. Cependant, certains phénotypes ne sont observés que dans certains cas, suggérant que chacun des trois partenaires supputés pourrait être impliqué dans d'autres cascades de signalisation régulant la spinogénèse (Kim et al., 2011). Par ailleurs, les

partenaires transmembranaires et extracellulaires en amont de cette cascade restent encore à déterminer.

La PSD constitue, avec le cytosquelette d'actine, la structure la plus importante des épines dendritiques. PSD95 est l'une des protéines d'échafaudage les plus abondantes dans la PSD et il a été mis en évidence qu'elle interagit avec le GEF Kalirine7 pour activer Rac1 (**figure 7** ; Penzes et al., 2001). Par ailleurs, le récepteur tyrosine kinase à l'insuline (IRSp53) est un effecteur de Rac1 présent dans les épines dendritiques et se lie avec la PSD95. Sa surexpression dans les neurones entraîne une augmentation de la densité des épines (Choi et al., 2005). PSD95 pourrait ainsi induire une cascade de signalisation Kalirine7/Rac1/IRSp53 activatrice de la spinogénèse. L'analyse d'une banque d'ADNc issus de cerveau humain par des expériences de double-hybride avec comme proie la protéine PSD95 a mis en évidence une nouvelle protéine de la densité postsynaptique : Preso. Preso est caractérisée par la présence d'un domaine FERM (4.1, Ezrin, Radixin, Moesin) et d'un domaine PDZ. Elle est exprimée dans différentes régions du cerveau murin et des expériences de co-purification ont mis en évidence l'interaction du domaine FERM de Preso avec le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), un phospholipide concentré à la membrane plasmique régulant notamment l'interaction entre la membrane plasmique et le cytosquelette sous-jacent. Par ailleurs, des expériences réalisées *in vitro* ont montré que le domaine PDZ de Preso interagit avec le GEF β -Pak-Interacting eXchange factor (β -PIX) et induit l'activation de Rac1 et la polymérisation du cytosquelette d'actine (**figure 7**), aboutissant à une augmentation de la densité des épines dendritiques (Lee et al., 2008). β -PIX est exprimé dès E18 dans le cortex cérébral et l'hippocampe ; son expression décroît durant le développement postnatal et est presque absente du cerveau adulte (Kim et al., 2000).

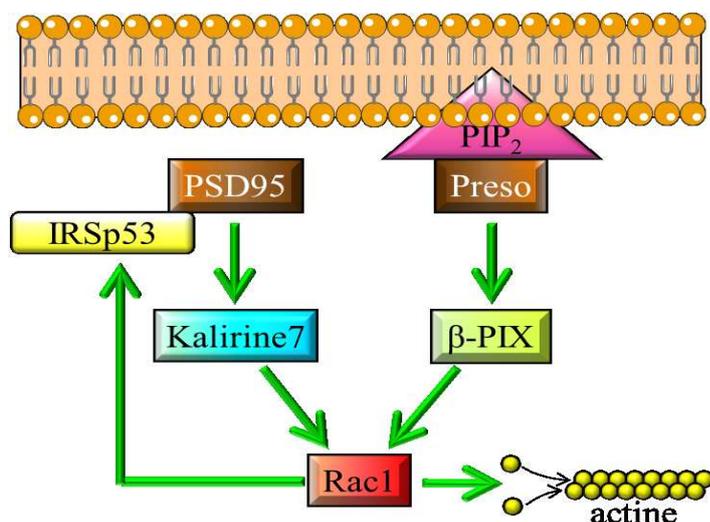


Figure 7 : Les protéines de la PSD sont impliquées dans la régulation de la spinogénèse.

PSD95 et Preso, deux protéines de la PSD, régule la RhoGTPase Rac1 et induisent la formation d'épines dendritiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, la plasticité des épines est étroitement liée à l'activité synaptique. Les récepteurs de type NMDA sont essentiels dans ce processus. En effet, l'activation des NMDAR induit l'entrée de calcium dans les neurones, entraînant l'activation d'effecteurs importants de la signalisation calcique : les protéines kinases Ca^{2+} /calmoduline-dépendantes (Ca^{2+} /calModuline-dependant protein Kinase, CaMK). Les CaMK sont des sérine/thréonine kinases qui phosphorylent différents types d'effecteurs et notamment les GEF des RhoGTPases (Penzes et al., 2008; Urbanska et al., 2008). Plusieurs voies de signalisation ont été mises en évidence en aval des récepteurs NMDA et des CaMK. Par exemple, des expériences réalisées sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe ont montré que la stimulation des NMDAR provoque l'activation de la CaMK-Kinase β (CaMKK β), qui phosphoryle la CaMKI. La CaMKI lie le complexe formé par le GEF β -PIX et la protéine de l'échafaudage synaptique G-protein-coupled receptor kinase-Interacting protein 1 (GIT1) et phosphoryle β -PIX (Saneyoshi et al., 2008). L'activation de β -PIX induit l'activation de la voie Rac1/Pak1 (**figure 8**) et ainsi le remodelage du cytosquelette d'actine (Saneyoshi et al., 2008). L'activation de cette cascade de signalisation NMDAR/CaMKK β /CaMKI/GIT1/ β -PIX/Rac1/Pak1 promeut la formation des épines et ainsi le développement des synapses excitatrices qu'elles reçoivent (Saneyoshi et al., 2008). Des expériences *in vitro* dans des neurones corticaux ou d'hippocampe en culture ont montré que l'activation du récepteur NMDA induit aussi l'activation de la CaMKII (**figure 8**) qui phosphoryle les GEF Tiam1 ou Kalirine7, provoquant l'activation de la voie Rac1/Pak1 et induisant le remodelage du cytosquelette d'actine et le développement des épines (Penzes et al., 2001; Tolia et al., 2005; Xie et al., 2007). Par ailleurs, l'expression d'une forme constitutivement active de Rac1 dans des neurones d'hippocampe en culture a permis de mettre en évidence que l'activation de Rac1 induit le recrutement des AMPAR à la membrane postsynaptique (Wiens, 2005). Ainsi, l'activation des NMDAR induit une augmentation de la taille des épines dendritiques et le renforcement des synapses portées par ces épines par l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA présents à la membrane postsynaptique (Penzes et al., 2001; Wiens, 2005; Xie et al., 2007).

D'autres récepteurs membranaires jouent un rôle clé dans le développement des épines : les récepteurs d'adhésion. Par exemple, des expériences réalisées *in vitro* dans des neurones corticaux ont montré que la N-cadhérine module la forme des épines existantes en recrutant la protéine d'échafaudage AF6/afidine à la membrane postsynaptique. AF6/afidine interagit avec la Kalirine7 et active Rac1 (**figure 8**), entraînant une augmentation du diamètre de la tête

des épines dendritiques et un renforcement des synapses grâce au recrutement de récepteurs AMPA (Xie et al., 2008). De même, des expériences *in vitro* utilisant une technique d'ARNi ont permis de mettre en évidence que l'intégrine $\alpha 5$ régule la formation des épines dans les neurones d'hippocampe via la voie de signalisation β -PIX/Rac1/Pak1 (Webb et al., 2007). Par ailleurs, l'activation du récepteur EphB2 par l'éphrineB entraîne une cascade moléculaire Tiam1/Rac1 induisant la formation des épines (Tolias et al., 2007). À l'inverse, une étude a récemment mis en évidence l'implication du récepteur EphA dans la dépolymérisation de l'actine et la rétraction des épines dendritiques *in vitro* dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe (Zhou et al., 2012). Pour cela, EphA régule une cascade de signalisation impliquant la phosphatase Slingshot1 qui déphosphoryle la calcineurine, un effecteur de RhoA (**figure 8**), induisant la dépolymérisation de l'actine. Les auteurs suggèrent donc que EphA activerait RhoA en amont de cette cascade (Zhou et al., 2012). Ces travaux mettent en lumière l'importance des récepteurs membranaires dans la plasticité des épines dendritiques et donc des synapses. De nombreux autres récepteurs d'adhésion ont été identifiés au niveau des épines dendritiques, comme les RCPG CIRL et BAI (Tobaben et al., 2000; Jordan et al., 2004; Selimi et al., 2009), mais leur rôle dans la morphogenèse des épines dendritiques reste à élucider.

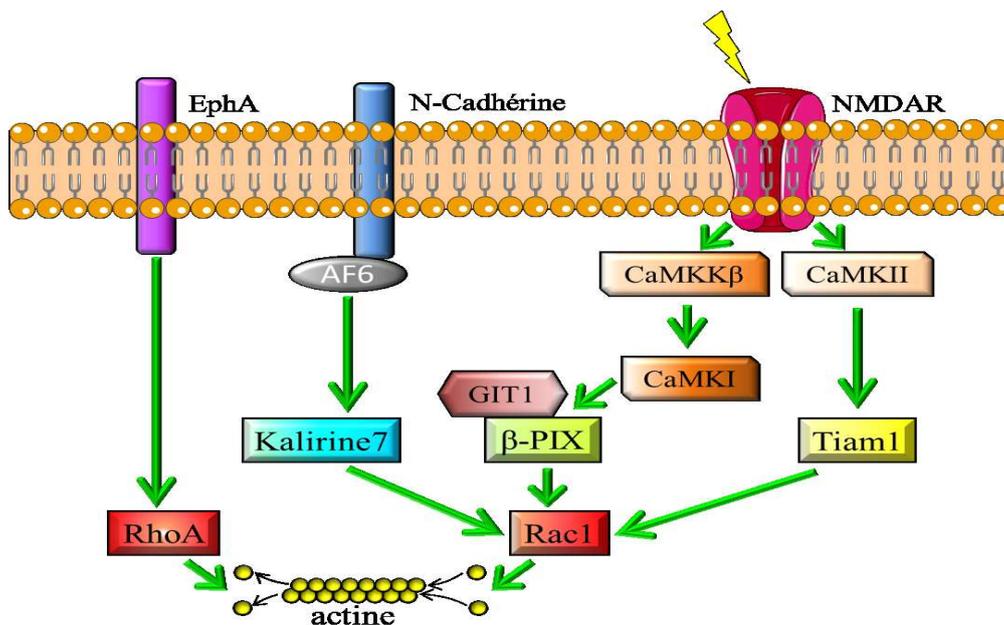


Figure 8 : Les récepteurs d'adhésion et les récepteurs aux neurotransmetteurs présents à la surface des épines régulent leur développement.

En liant leurs partenaires, les récepteurs d'adhésion comme les Eph ou la N-cadhérine induisent des voies de signalisation qui activent les RhoGTPases et permettent une régulation fine de la dynamique du cytosquelette d'actine. De même, la stimulation des récepteurs NMDA provoque différentes cascades de signalisation qui aboutissent au développement des épines dendritiques et sont aussi impliquées dans la plasticité synaptique.

I.4. Des défauts dans la morphogenèse des neurones peuvent mener à des maladies neurodéveloppementales

L'autisme, les retards mentaux et la schizophrénie sont des maladies neurodéveloppementales. D'un point de vue cellulaire, ces maladies sont généralement liées à des modifications de la morphologie de l'arbre dendritique des neurones et à une variation de la densité des épines dendritiques, suggérant ainsi des défauts dans le contrôle des processus de dendritogenèse et de spinogenèse.

I.4.1. Exemple de l'autisme et des retards mentaux

L'autisme se manifeste chez les enfants au cours des deux premières années de vie. Cette maladie a été décrite en 1943 par le pédopsychiatre américain Léo Kanner comme une instabilité des enfants affectés à développer une réciprocité sociale (Kanner, 1943). En effet, les enfants atteints d'autisme présentent des troubles du comportement qui se traduisent par des actions restreintes et répétitives, des perturbations de la communication et une interaction sociale anormale (HAS, 2010; OMS, 2010). Par exemple, Kanner décrit comment les enfants qu'il étudie entrent en contact uniquement avec ses mains ou ses pieds lorsqu'il s'adresse à eux, semblant considérer ces parties comme des objets détachés de la personne, et donc n'envahissant pas leur espace (Kanner, 1943).

Plusieurs maladies relatives à l'autisme – dont l'autisme lui-même – s'accompagnent d'un retard mental plus ou moins sévère. C'est le cas du syndrome de Rett, une maladie ne touchant que les femmes et se déclarant entre 7 et 24 mois ; le syndrome d'Asperger ; le syndrome de Down ou encore le syndrome de l'X fragile (HAS, 2010; OMS, 2010). Les retards mentaux se traduisent chez les personnes atteintes par des déficits de mémoire, un retard dans le développement de la communication, une lenteur dans l'apprentissage, ou encore une désinhibition sociale. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les retards mentaux sont dus à « *un arrêt ou un développement incomplet du fonctionnement mental, caractérisé essentiellement par une altération, durant la période du développement, des facultés qui déterminent le niveau global d'intelligence [...]* ». De fait, le retard mental est déclaré sous le score historiquement défini de 70 de quotient intellectuel (OMS, 2010).

Au début des années 1970, des neuropathologistes ont établi l'existence d'une corrélation entre la morphologie des neurones et des épines dendritiques et les maladies neurodéveloppementales. En effet, l'utilisation de la technique de Golgi pour le marquage de

neurones de cerveau *post mortem* de patients atteints de retards mentaux a montré une simplification de l'arborisation dendritique de ces neurones, se traduisant par une diminution du nombre et de la longueur des dendrites des neurones pyramidaux du cortex (Huttenlocher, 1970, 1974). Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'analyse de la morphologie des neurones d'hippocampe d'enfants atteints d'autisme (Raymond et al., 1996). Par ailleurs, les dendrites des neurones corticaux présentent des altérations de leur morphologie, se traduisant sur le plan cellulaire par l'apparition de varicosités le long des dendrites distales et de longues et fines épines sur les dendrites proximales, ainsi que par une perturbation du déploiement normal des microtubules au sein des dendrites. Une étude de reconstruction graphique assistée par ordinateur a permis de mettre en évidence la perte de la continuité des microtubules chez des patients (Bodick et al., 1982). Les neurones corticaux des patients souffrant d'un retard mental présentent une densité réduite du nombre d'épines dendritiques, corrélée à une augmentation de leur longueur (Purpura, 1975a, 1975b). Les épines dendritiques semblent donc être immatures et présentent une forme de filopodes dendritiques. Cependant, une étude plus récente contredit ces résultats en montrant que les neurones pyramidaux de certaines zones du cortex présentent au contraire une densité accrue d'épines (Raymond et al., 1996). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par le fait que, dans les années 1970, les différentes pathologies liées au retard mental n'étaient pas distinguées : les études plus anciennes porteraient sur différents retards mentaux, non distingués de l'autisme à cette époque. Il y aurait donc des phénotypes différents suivant la pathologie considérée.

Les retards mentaux et l'autisme sont associés à des mutations génétiques dans des gènes codant pour des protéines présentes au niveau des épines dendritiques. Notamment, plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation des RhoGTPases et des protéines de la PSD présentent des mutations. Par exemple, plusieurs mutations dans le gène codant pour Pak3, un effecteur de Cdc42 – et, dans une moindre mesure, de Rac1 – ont été identifiées chez des patients souffrant de retard mental lié à l'X (Rejeb et al., 2008). L'une de ces mutations diminue significativement la capacité de Pak3 à lier Cdc42, résultant en un défaut d'activation de Pak3 et des processus qu'il contrôle. Par ailleurs, l'expression des formes mutées de Pak3 dans des neurones conduit à différents phénotypes sur les épines dendritiques, notamment une diminution plus ou moins prononcée de leur densité ou une altération de leur morphologie, sans toutefois interférer avec la bonne localisation de ces protéines dans les épines dendritiques (Kreis et al., 2007). En outre, la délétion de Pak3 dans des tranches de neurones d'hippocampe *in vitro* entraîne une

augmentation du nombre d'épines immatures de type filopode, ainsi qu'une diminution du nombre de récepteurs AMPA et de la LTP (Boda et al., 2004). Des mutations dans des gènes codant pour des protéines de la PSD comme Shank2 et Shank3 ont aussi été mises en évidence chez des patients autistes ou atteints de retard mental (Berkel et al., 2010; State, 2010).

I.4.2. Exemple de la schizophrénie

La schizophrénie se développe plus tardivement que l'autisme et les retards mentaux puisqu'elle apparaît chez l'adolescent ou le jeune adulte. Le terme *schizophrénie* a été introduit dans le langage médical au début du 20^{ème} siècle par le psychiatre suisse Eugen Bleuler. Cette maladie affecte le rapport du malade avec la réalité, en provoquant chez lui des hallucinations auditives et des délires paranoïdes (OMS, 1998; HAS, 2007a). Elle se manifeste par un discours déconstruit, accompagné de schémas de pensées désorganisés et d'une psychose chronique. D'après la Haute Autorité de Santé (HAS) française, la prévalence de cette maladie est d'environ 1%, soit 10000 nouveaux cas par an en France (HAS, 2007a, 2007b). La schizophrénie touche indifféremment les hommes et les femmes. Cependant, elle semble apparaître plus tardivement et mieux évoluer chez la femme après traitement (OMS, 2001).

Il existe peu de données sur la morphologie des neurones de patients atteints de schizophrénie. L'hétérogénéité des symptômes psychologiques et l'absence, encore à l'heure actuelle, de phénotypes génétiques ou neurobiologiques clairs (Hyman, 2008) rendent difficile la détection de la maladie et pourraient être l'une des causes de ce manque d'investigation. Des études réalisées depuis le début des années 2000 ont toutefois apporté quelques éclairages sur la morphologie des neurones dans cette pathologie. L'étude de cerveaux humains *post mortem* a permis de mettre en évidence une diminution du nombre de dendrites terminales au niveau de l'arborisation basale des neurones du cortex préfrontal (Kalus et al., 2000). Cette variation de la morphologie des neurones est accompagnée d'une diminution de la densité des épines dendritiques (Glantz et Lewis, 2000; Garey, 2010). À nouveau, des défauts dans l'expression des RhoGTPases et de leurs partenaires ont été identifiés, en lien avec la schizophrénie. Récemment, il a été suggéré que les variations dans la morphologie des neurones corticaux pourraient être directement liées, dans une partie du cortex, à une diminution de l'expression de la RhoGTPase Cdc42, impliquée dans la régulation de l'actine (Ide et Lewis, 2010). Par ailleurs, des mutations non-sens dans le gène codant pour l'effecteur

Pak3 ont été identifiées chez des patients atteints de schizophrénie (Morrow et al., 2008). Enfin, des polymorphismes simple nucléotide (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) associés aux symptômes désorganisés de la schizophrénie ont été mis en évidence dans une des protéines de la famille ORC : ORC3-like, qui semble être impliqué dans le contrôle du cytosquelette lors de l'initiation de la dendritogenèse (Huang et al., 2005; DeRosse et al., 2008) et dans le récepteur d'adhésion spécifique du cerveau BAI3 (DeRosse et al., 2008).

II. BAI3, un RCPG d'adhésion impliqué dans le développement neuronal ?

Il existe, à l'heure actuelle, un grand nombre de protéines exprimées dans le SNC dont la fonction est encore mal connue. C'est le cas de la famille des RCPG d'Adhésion Brain Angiogenesis Inhibitor (BAI), qui sont exprimés dans le SNC dès les premiers jours postnataux.

Dans ce chapitre, nous décrirons brièvement les caractéristiques communes à tous les RCPG et leur classification dans le système GRAFS. Nous centrerons ensuite notre exposé sur les RCPG d'Adhésion, en abordant notamment leurs caractéristiques structurales et leurs fonctions, en particulier dans le SNC. Enfin nous terminerons par une description détaillée des récepteurs BAI, de leur structure et de leurs rôles connus.

II.1. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)

II.1.1. Généralités

Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) constituent une large famille de protéines transmembranaires : plus de 800 gènes codent pour ce type de récepteurs chez l'humain. Ils sont présents chez les bactéries, les champignons, les plantes, ainsi que les proto- et métazoaires (Fredriksson et al., 2003; Schiöth et Fredriksson, 2005). Ces récepteurs, à l'interface entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire, ont pour rôle de convertir des stimuli externes provenant de la liaison d'un ligand en diverses réponses intracellulaires : c'est la transduction du signal.

Les stimuli activant et modulant les RCPG sont de nature très variée : peptides, ions, molécules sensorielles olfactives et gustatives, photons, protéines, etc... Leur liaison entraîne l'activation d'effecteurs intracellulaires produisant différentes cascades de signalisation. Par leur diversité structurale, le grand nombre de ligands et les multiples voies de signalisation qu'ils activent, les RCPG sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la régulation de la pression sanguine, la contraction des muscles lisses ou encore la neurotransmission.

Pour toutes ces raisons, les RCPG sont l'une des cibles majeures des molécules thérapeutiques : plus de la moitié des médicaments actuellement sur le marché ont pour cible un RCPG (Bjarnadóttir et al., 2007a; Bridges et Lindsley, 2008; Rosenbaum et al., 2009).

II.1.2. Structure et classification des RCPG

Les RCPG sont caractérisés par une structure commune de sept hélices hydrophobes transmembranaires connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Le domaine N-terminal de ces récepteurs est extracellulaire et contient des sites de glycosylation ; le domaine C-terminal est intracellulaire et peut parfois présenter un ancrage lipidique à la membrane plasmique (**figure 9**). Les RCPG tiennent leur nom de leur capacité à interagir avec une protéine G cytosolique. Cependant, cette caractéristique n'a pas été démontrée pour la plupart des RCPG et l'appellation « récepteurs à sept domaines transmembranaires » serait dès lors plus appropriée, mais la terminologie RCPG reste la mieux établie et sera donc utilisée dans ce chapitre (Fredriksson et al., 2003; Kristiansen, 2004; Bouvier, 2012).

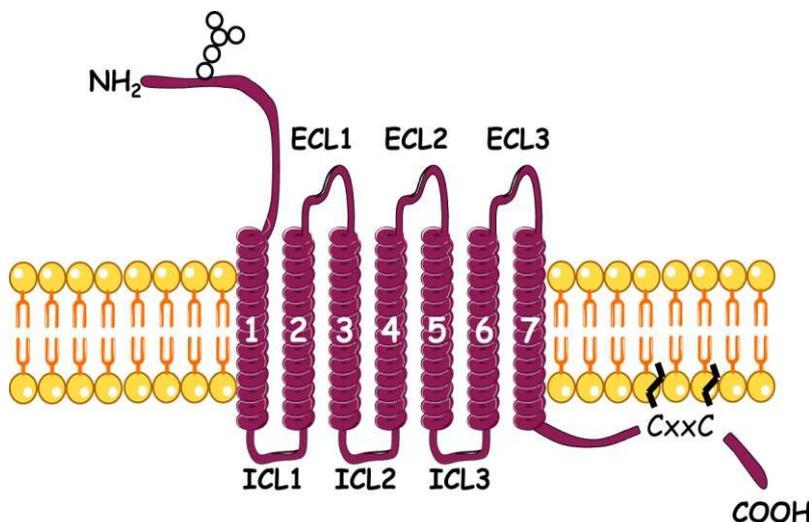


Figure 9 : Représentation schématique des récepteurs couplés aux protéines G.

ECL : boucle extracellulaire
 ICL : boucle intracellulaire
 1-7 : hélices transmembranaires

La grande diversité des RCPG rend difficile une classification prenant en compte tous les aspects structuraux et pharmacologiques de ces récepteurs. Néanmoins, différentes classifications des RCPG ont été décrites au cours des 30 dernières années. Par exemple, la base de données SwissProt propose une classification des RCPG selon la nature de leur(s) ligand(s), tandis que la base de données GPCRDB recoupe des informations relatives au(x) ligand(s) et aux similarités de séquence (Attwood et Findlay, 1994; Kolakowski, 1994; Horn, 2003). Cette méthode, reposant sur l'étude des caractéristiques physiologiques et structurales des RCPG, a permis d'établir une classification à six entrées allant de A à F, recouvrant tous les RCPG chez les vertébrés et les invertébrés et utilisée depuis les années 1990 (Attwood et Findlay, 1994; Kolakowski, 1994; Fredriksson et al., 2003).

Au début des années 2000, une analyse phylogénétique menée sur le génome humain a permis d'établir un nouveau système de classification. Cette classification utilise les distances phylogénétiques entre séquences « neighbour-joining » et divise les RCPG en cinq familles majoritaires : Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/Taste2 et Sécrétine (classification GRAFS, **figure 10** ; Fredriksson et al., 2003). Contrairement aux autres classifications, le système GRAFS ne prend pas en considération la nature des ligands liés par les RCPG et n'intègre donc pas l'aspect pharmacologique.

La famille des récepteurs au **Glutamate** est constituée des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR), des récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA_{BR1} et GABA_{BR2}), du récepteur « calcium-sensing » CASR, et des récepteurs du goût de type 1 (TAS1). Ces récepteurs sont caractérisés par un domaine N-terminal relativement long (environ 600 résidus) qui forme deux lobes distincts séparés par une cavité dénommée « Venus fly trap » dans laquelle se lie le glutamate.

La famille **Rhodopsine** est de loin la plus grande famille de RCPG chez les vertébrés. Elle est divisée en quatre groupes selon la nature du ligand : α , β , γ et δ . Cette famille comporte les récepteurs de la lumière (rhodopsine), les récepteurs adrénergiques, les récepteurs olfactifs, mais aussi des récepteurs d'amines, de nucléotides et de peptides. La majorité des récepteurs de la famille Rhodopsine présente un site de liaison au niveau des domaines transmembranaires – à la différence des autres familles où le site de liaison est situé dans le domaine N-terminal – mais il existe des exceptions, comme notamment les récepteurs aux glycoprotéines (LH, FSH, TSH et LG), où le site de liaison du ligand se trouve dans le domaine N-terminal du récepteur.

Dans la classification GRAFS, l'ancienne classe B est divisée en deux familles : la famille des récepteurs d'**Adhésion** et la famille **Sécrétine**. Le cas des récepteurs d'**Adhésion** sera développé plus en détail dans le paragraphe suivant (cf. § II.2.). Les récepteurs **Sécrétine** comportent un domaine N-terminal de 60 à 80 résidus contenant un grand nombre de cystéines conservées engagées dans des ponts disulfures, importants pour la liaison des ligands. Les ligands de ces récepteurs sont des hormones peptidiques (glucagon, sécrétine, calcitonine, etc...) qui agissent le plus souvent de manière paracrine.

Les récepteurs **Frizzled/Taste2** sont séparés en deux groupes : les récepteurs Frizzled et les récepteurs du goût de type 2 (TAS2). Les récepteurs Frizzled ont pour ligands les glycoprotéines Wnt et sont impliqués dans un grand nombre de processus, notamment durant

le développement embryonnaire des métazoaires, comme le contrôle du devenir cellulaire, la prolifération ou la détermination de la polarité (Fredriksson et al., 2003; Schiöth et Fredriksson, 2005).

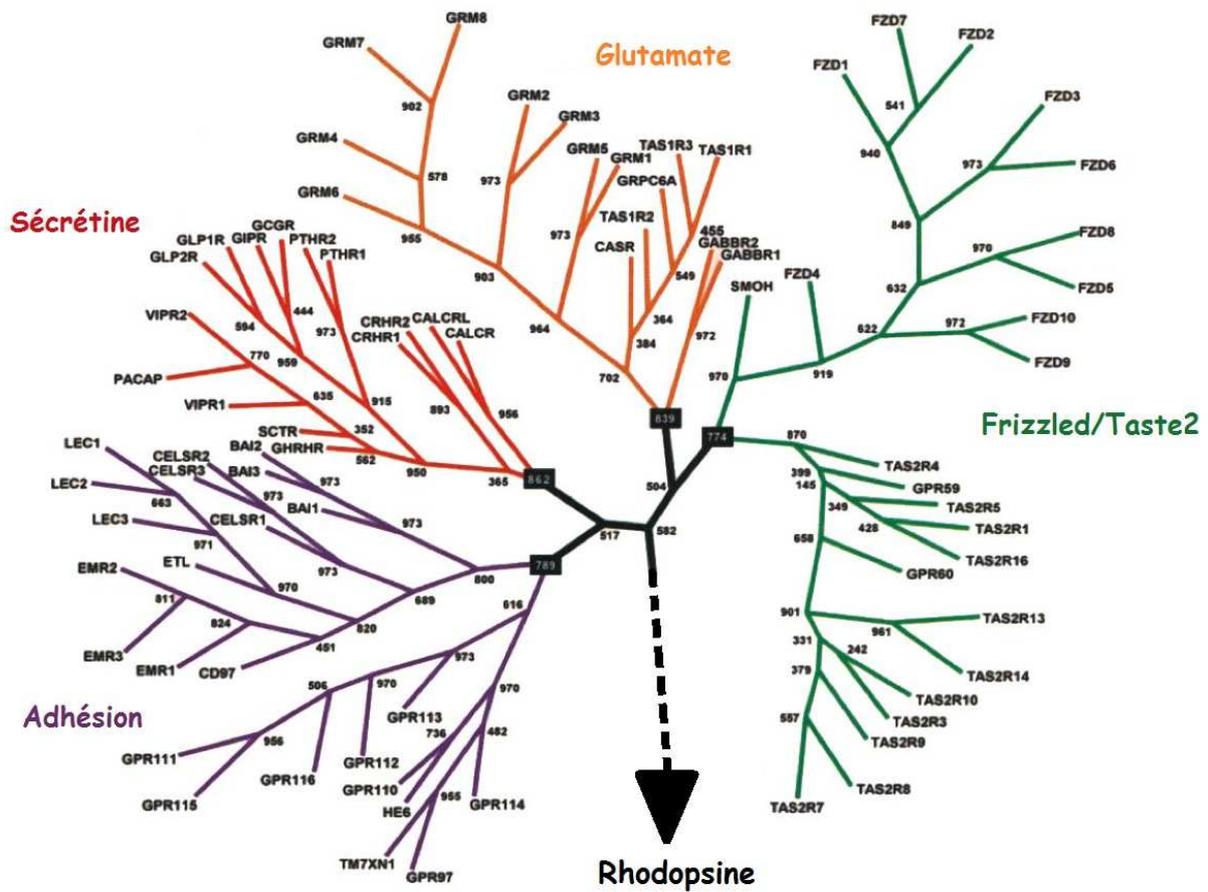


Figure 10 : Classification des RCPG selon le système GRAFS. (Fredriksson et al., 2003)

II.2. La famille des RCPG d'Adhésion

La famille des récepteurs d'**Adhésion** constitue la deuxième plus grande famille de RCPG après la famille Rhodopsine avec 33 membres identifiés chez l'homme, 31 chez la souris et le rat, et environ 90 chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Bjarnadóttir et al., 2004, 2007a; Schiöth et Fredriksson, 2005; Whittaker et al., 2006; Lagerström et Schiöth, 2008). L'étude phylogénétique des domaines transmembranaires des récepteurs d'Adhésion a permis de différencier sept sous-classes. Ces sous-classes reflètent bien les différents domaines fonctionnels présents dans l'extrémité N-terminale des RCPG d'Adhésion (**figure 11**). On y retrouve notamment la sous-classe des récepteurs contenant des répétitions Epidermal Growth Factor (EGF), la sous-classe des récepteurs CELSR, qui comportent des répétitions de type cadhérine, ou encore la sous-classe des récepteurs BAI, comportant des répétitions thrombospondine (ThromboSpondin Repeat, TSR) (Bjarnadóttir et al., 2004, 2007a).

II.2.1. La structure protéique caractéristique des RCPG d'Adhésion

II.2.1.1 *Le domaine N-terminal caractéristique des récepteurs d'Adhésion*

Les RCPG d'Adhésion sont caractérisés par un long domaine N-terminal comportant des motifs fonctionnels (**figure 11**). Ainsi, chez l'humain, 14 types de motifs fonctionnels différents sont retrouvés. On notera par exemple l'existence de domaines de type EGF, des TSR, des motifs riches en répétitions leucine (Leucin-Rich Repeat, LRR), des domaines immunoglobulines (Ig) ou encore des domaines Cadhérine (Yona et al., 2008). La plupart sont connus – dans des protéines non RCPG – pour être impliqués dans des interactions protéine-protéine, protéine-matrice extracellulaire ou cellule-cellule (Bjarnadóttir et al., 2007b). Si, aujourd'hui encore, la plupart des récepteurs d'Adhésion sont orphelins, ceux dont on connaît le ligand semblent interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire ou des ligands présents à la surface des cellules, justifiant ainsi le nom de récepteurs d'Adhésion (Stacey et al., 2003; Park et al., 2007; Lagerström et Schiöth, 2008; Li et al., 2008).

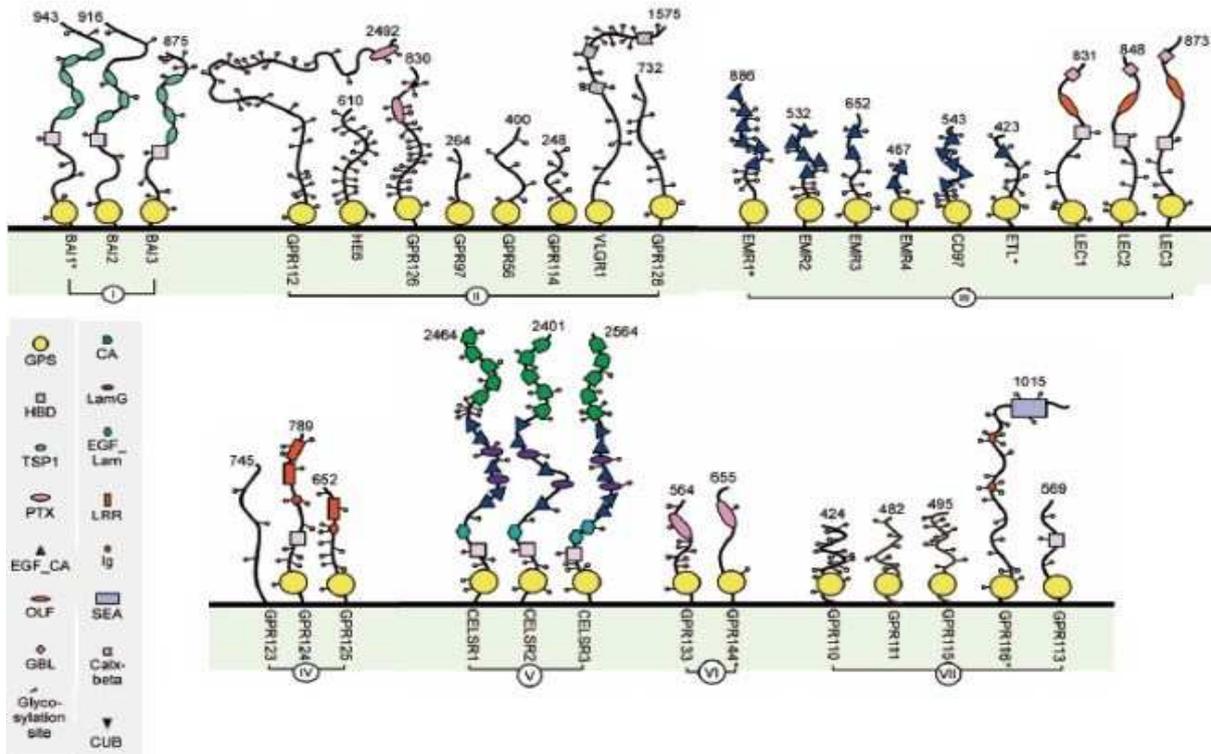


Figure 11 : Schéma des domaines N-terminaux des différents GPCR d'Adhésion et leur groupe d'appartenance. (Bjarnadóttir et al., 2007a).

II.2.1.2 Le site de clivage GPS

Le domaine N-terminal des récepteurs d'Adhésion est relié aux sept domaines transmembranaires via un site de protéolyse (GPCR Proteolysis Site, GPS) juxtaposé au premier domaine transmembranaire. La première description d'une protéolyse du domaine N-terminal d'un RCPG a été faite en 1996 par Gray et ses collaborateurs qui, par des analyses en Western Blot de la protéine CD97, ont montré que le domaine extracellulaire de cette protéine est clivé 15 à 30 minutes après la synthèse du peptide entier, conduisant à la formation de deux sous-unités α (N-terminale) et β (transmembranaire) associées de manière non-covalente (Gray et al., 1996). L'équipe de Petrenko a décrit le site de clivage du récepteur à l' α -latrotoxine indépendant du calcium (Calcium-Independent Receptor of α -Latrotoxine, CIRL) et montré qu'il est constitué d'un motif conservé d'une cinquantaine d'acides aminés, riche en cystéines (Krasnoperov et al., 1997, 1999; Lagerström et Schiöth, 2008; Lin et al., 2010). Cette équipe a montré qu'après le clivage, le récepteur est constitué de deux sous-unités nommées p120 et p85 (en référence à leur masse moléculaire), liées de façon non covalente. p120 présente des domaines caractéristiques des récepteurs d'Adhésion, alors que p85 possède les caractéristiques des RCPG, *i.e.* sept domaines transmembranaires et un domaine

C-terminal cytoplasmique. Ce clivage modifie les propriétés pharmacologiques du récepteur (Krasnoperov et al., 1997, 1999). Ce processus a par la suite été mis en évidence dans un grand nombre de RCPG d'Adhésion, suggérant que le clivage de l'extrémité N-terminale des récepteurs d'Adhésion serait un évènement constitutif, intracellulaire, permettant l'adressage à la membrane du récepteur et son bon fonctionnement (Abe et al., 2002; Kristiansen, 2004). L'observation d'hétérodimères formés à partir de sous-unités α et β provenant de récepteurs distincts et de sous-unités localisées à la membrane indépendamment l'une de l'autre a suggéré l'implication de la protéolyse des RCPG d'Adhésion dans la création de différentes voies de signalisation, dépendant soit de l'une ou de l'autre des sous-unités α et β , soit d'hétérodimères (Silva et al., 2009). Le domaine GPS est précédé d'une région « tige », elle-même souvent précédée d'un domaine de liaison aux hormones (Hormone Binding Domain, HBD). Une récente étude a crystallographié un fragment allant du GPS au HBD (**figure 12A**) des récepteurs d'Adhésion C1RL1 et BAI3 et a révélé l'existence de deux domaines : un de ~ 70 résidus correspondant au HBD, et un autre de ~ 320 résidus englobant la région « tige » et le GPS. Ce deuxième domaine est constitué d'un sous-domaine A en hélices α et d'un sous-domaine B en feuillets β , comprenant le GPS (**figure 12B**). L'expression de formes mutées de C1RL1 a permis aux auteurs de montrer que le GPS seul n'est pas suffisant pour induire une protéolyse. En revanche, le motif de ~ 320 résidus est lui nécessaire et suffisant pour cette fonction. Ils lui ont donné le nom de domaine induisant l'autoprotéolyse des RCPG (GPCR Autoproteolysis INDucing domain, GAIN). Le domaine GAIN semble être un domaine ancien et conservé dans l'évolution (Araç et al., 2012).

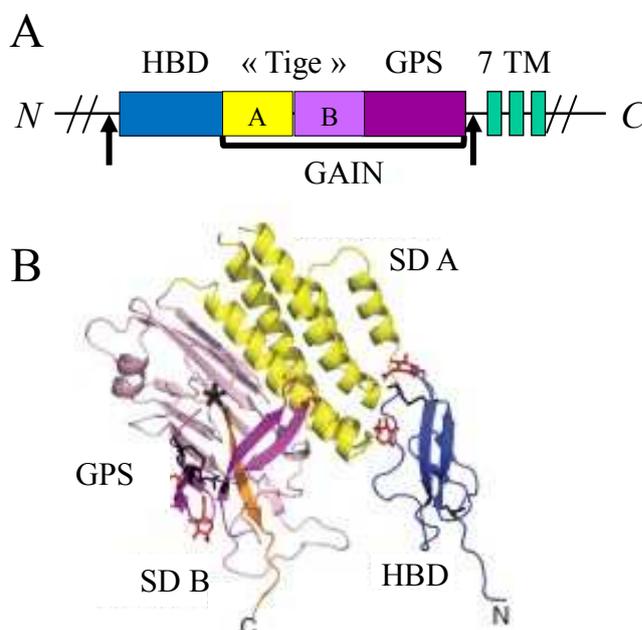


Figure 12 : Le nouveau domaine d'autoprotéolyse GAIN.

A. Représentation schématique du domaine crystallographié (entre les flèches) et du domaine GAIN.

7 TM : sept domaines transmembranaires.

B. Schéma de la structure en crystal des RCPG d'Adhésion (ici C1RL1). SD A, B : sous-domaines A, B (d'après Araç et al., 2012).

II.2.1.3 Les domaines transmembranaires et C-terminal

Les sept domaines transmembranaires des récepteurs d'Adhésion présentent une séquence protéique très différente des domaines transmembranaires des autres familles de RCPG. Seuls trois motifs, le motif EXXXXY localisé dans l'hélice transmembranaire 3 et les motifs W et PALV dans l'hélice transmembranaire 4, sont retrouvés dans les autres familles de RCPG. De plus, leur séquence est peu conservée au sein même de la famille des récepteurs d'Adhésion, puisque seuls 3 acides aminés sont conservés dans les 33 membres de la famille des RCPG d'Adhésion (Bjarnadóttir et al., 2007a).

Le domaine C-terminal des RCPG est impliqué, avec la troisième boucle intracellulaire, dans la liaison aux protéines G. Cependant, si cette interaction est l'une des caractéristiques majeures des RCPG, il existe peu de données décrivant des voies de signalisation via les protéines G pour les récepteurs d'Adhésion. Seuls quelques récepteurs de cette famille ont été copurifiés avec des protéines G, comme GPR56, qui forme un complexe avec la protéine $G\alpha_{q/11}$ au niveau de son domaine intracellulaire (Little et al., 2004), ou encore GPR133, qui a récemment été impliqué dans l'augmentation d'AMPC dans des cellules surexprimant le récepteur, indiquant une interaction avec la protéine $G\alpha_s$ (Bohnekamp et Schöneberg, 2011). Le domaine C-terminal des récepteurs d'Adhésion est aussi impliqué dans leur interaction avec des protéines d'échafaudage, permettant leur localisation dans des structures cellulaires spécifiques. Plusieurs RCPG d'Adhésion possèdent à leur extrémité C-terminale des motifs de liaison au domaine PDZ, un domaine retrouvé dans un grand nombre de protéines postsynaptiques (Bjarnadóttir et al., 2007a). Par exemple, le récepteur CIRL1 est localisé à la membrane postsynaptique grâce à sa liaison aux domaines PDZ des protéines d'échafaudage Shank (Tobaben et al., 2000).

II.2.2. Les variants d'épissage des RCPG d'Adhésion

Les récepteurs d'Adhésion sont caractérisés par une structure génomique complexe, comportant un grand nombre d'exons. La multiplicité des exons permet la génération de différentes isoformes de ces récepteurs, comme l'ont montré Bjarnadóttir et ses collaborateurs par une analyse bioinformatique des séquences d'ARNm et des EST (Expressed Sequence Tag). Certains variants d'épissage pour les récepteurs d'Adhésion sont dépourvus d'un à plusieurs domaines fonctionnels dans la partie N-terminale, suggérant des rôles différents pour ces isoformes. Par ailleurs, 48% des 33 RCPG d'Adhésion produisent au moins un variant d'épissage ne présentant pas les sept domaines transmembranaires. Ces produits ont

été classifiés en variants non fonctionnels car ils sont dès lors difficiles à considérer comme des RCPG classiques. Cependant, des études expérimentales de ces variants seront nécessaires pour déterminer s'ils constituent simplement des « erreurs » de transcription, s'ils jouent des fonctions alternatives ou s'ils sont impliqués dans la régulation de l'expression des récepteurs (Bjarnadóttir et al., 2007b).

II.2.3. Les rôles connus des RCPG d'Adhésion et leurs voies de signalisation

Comme nous l'avons vu plus haut, les RCPG d'Adhésion peuvent être classés en sept groupes selon les analyses phylogénétiques (Bjarnadóttir et al., 2007a). Dans cette partie, nous exposerons les rôles connus des récepteurs de ces différents groupes, en centrant plus particulièrement notre attention sur leurs rôles dans le SNC, dans lequel plus de la moitié d'entre eux sont majoritairement ou exclusivement exprimés.

Le groupe I comprend les récepteurs de la famille des inhibiteurs de l'angiogenèse spécifiques du cerveau (Brain Angiogenesis Inhibitor 1-3, BAI1-3). La structure et les rôles des récepteurs BAI seront détaillés dans le chapitre II.3.

Le groupe II est constitué de huit récepteurs. Parmi eux, le très grand récepteur VLGR1 (Very Large G protein coupled Receptor 1) est exprimé dans le SNC en développement dès E8. Chez l'humain, des mutations dans le gène codant VLGR1 sont associées au syndrome d'Usher, caractérisé par une cécité et une surdité (McMillan et al., 2002). De plus, des expériences de stimulation auditive de souris VLGR1^{-/-} ou présentant une protéine délétée des domaines transmembranaires et intracellulaire ont mis en évidence la susceptibilité de ces animaux pour la surdité et les crises épileptiques audiogènes (McMillan et White, 2004; Yagi et al., 2005, 2009). VLGR1 interagit avec la protéine de l'échafaudage synaptique Whirlin dans les photorécepteurs et les cellules ciliées de la cochlée, suggérant un rôle de ce complexe protéique dans l'adhésion et le développement synaptique (Van Wijk et al., 2006). Chez l'humain, des mutations dans le gène codant pour un autre membre de ce groupe, GPR56, conduisent à une polymicrogyrie frontopariétale bilatérale se traduisant par un retard mental, une ataxie ou un nystagmus (Li et al., 2008; Koirala et al., 2009). Dans le cortex en développement, GPR56 est présent dans les terminaisons apicales des glies radiaires et semble lier des molécules de la matrice extracellulaire. Les souris GPR56^{-/-} présentent des défauts dans l'intégrité de la membrane piaie, associée à un mauvais ancrage des terminaisons radiaires et à une migration ectopique des neurones (Li et al., 2008). Dans le cervelet, GPR56 est exprimé dans les cellules granulaires de la couche granulaire externe rostrale et régule leur

adhésion à la lame basale (Koirala et al., 2009). La fonction de GPR56 semble reposer sur deux protéines G différentes. D'une part, l'interaction de GPR56 avec les tétraspanines CD9 et CD81 permet sa liaison à la protéine $G_{\alpha_{q/11}}$ et la stabilisation de ce complexe pourrait être impliquée dans la prolifération ou la différenciation cellulaire, notamment dans la zone ventriculaire du cerveau en développement (Little et al., 2004). D'autre part, GPR56 interagit avec la protéine $G_{\alpha_{12/13}}$ dans les progéniteurs neuronaux. Cette interaction induirait une cascade de signalisation via la RhoGTPase RhoA permettant d'inhiber la migration de ces progéniteurs (Iguchi et al., 2008). La protéine humaine de l'épididyme HE6 (ou GPR64) est exprimée spécifiquement dans les canaux efférents et le segment initial de l'épididyme impliqués dans la maturation des spermatozoïdes. La délétion du gène codant HE6 entraîne une infertilité mâle liée à une dérégulation de la réabsorption des fluides séminaux. Sa présence au niveau des bordures en brosses et des stéréocils de certains types cellulaires de l'épididyme et son interaction avec le cytosquelette d'actine pourrait jouer un rôle dans ce processus (Davies et al., 2004; Kirchhoff et al., 2008). Enfin, GPR126 semble être impliqué dans le développement cardiovasculaire (Waller-Evans et al., 2010) et la myélinisation des nerfs périphériques (Monk et al., 2011), mais son mode d'action et les voies de signalisation qu'il régule reste inconnus pour le moment. Le rôle des quatre autres récepteurs de ce groupe reste encore à découvrir.

Le groupe III est composé de récepteurs pouvant être classés en deux catégories. Dans la première, les récepteurs EMR1-4, CD97 et ETL possèdent tous un nombre variable de domaines de liaison au calcium et EGF. Ils sont majoritairement exprimés dans les cellules du système immunitaire. EMR4 a été le premier RCPG identifié permettant l'interaction cellulaire entre les cellules myéloïdes et les lymphocytes B (Stacey et al., 2002). EMR3, qui avec EMR2 est absent du génome murin, reconnaît quant à lui un ligand à la surface des macrophages et neutrophiles humains activés (Stacey et al., 2001). Enfin, CD97 est impliqué dans l'inflammation et la migration des leucocytes (Bjarnadóttir et al., 2007a) et une récente étude a montré qu'il forme un hétérodimère avec le récepteur LPAR1 – un RCPG impliqué dans la progression tumorale – et transduit son signal via la protéine $G_{\alpha_{12/13}}$, induisant l'augmentation de l'activation de la RhoGTPase RhoA dans des cellules tumorales de prostate (Ward et al., 2011). Dans la seconde catégorie, les récepteurs C1RL1-3, aussi connus sous le nom de récepteurs LEC1-3 ou latrophilines, présentent dans leur partie N-terminale des domaines de liaison aux hormones, olfactoméline et lectine. C1RL1 et C1RL2 sont exprimés majoritairement dans le SNC où ils sont impliqués dans la réponse à la toxine α -latrotoxine en

induisant le relargage en grande quantité de vésicules présynaptiques de façon indépendante au Ca^{2+} (Südhof, 2001). Leur présence à la membrane postsynaptique et leur liaison aux protéines d'échafaudage Shank suggèrent un rôle physiologique de ces récepteurs dans l'adhésion synaptique (Tobaben et al., 2000).

Le groupe IV est constitué des récepteurs GPR123, GPR124 et GPR125. Le récepteur GPR123 diffère des autres RCPG d'Adhésion par l'absence de GPS et de domaines spécifiques dans son extrémité N-terminale. Aucun rôle n'est connu à l'heure actuelle pour ce récepteur, mais son expression majoritaire dans le SNC et la présence d'un motif de liaison aux domaines PDZ à son extrémité C-terminale suggèrent un rôle synaptique (Lagerström et al., 2007). Le récepteur GPR124 est impliqué dans l'angiogenèse du cerveau en développement où il régule la formation et les propriétés de la barrière hémato-encéphalique (Cullen et al., 2011). Enfin, GPR125 est un marqueur des cellules souches germinales (Seandel et al., 2008). Il est aussi exprimé dans le plexus choroïde où il semble être impliqué dans des processus développementaux qui restent à déterminer. De plus, son expression y est transitoirement augmentée après une lésion cérébrale, suggérant l'implication de GPR125 dans des processus de récupération (Pickering et al., 2008).

Les récepteurs du groupe V sont exprimés dans le SNC en développement suivant différents patrons d'expression. CELSR1 est exprimé dès E14 et restreint à la zone ventriculaire. L'étude de souris *CELSR1^{-/-}* a mis en évidence un rôle de ce récepteur dans la neurulation, puisque ces souris présentent d'importants défauts du tube neural (Curtin et al., 2003). L'expression de CELSR3 est complémentaire de celle de CELSR1 et restreinte à la plaque corticale, alors que CELSR2 est détecté dans le cortex cérébral et la moelle épinière. Ces deux récepteurs sont activés par interaction homophile mais ils jouent des rôles opposés dans le développement neuronal : l'activation de CELSR2 entraîne une cascade de signalisation via la CaMKII et induit la croissance neuritique, tandis que l'activation de CELSR3 génère une cascade de signalisation impliquant la calcineurine et inhibant la croissance des neurites (Shima et al., 2007).

Aucun rôle n'a jusqu'à présent été découvert pour les récepteur du groupe VI (GPR133 et GPR144), ni pour ceux du groupe VII. Il semble toutefois que GPR133 interagisse avec la protéine $G\alpha_s$ et des études génétiques ont mis en évidence l'existence, chez l'humain, de polymorphismes dans le gène de GPR133 en relation avec le contrôle de la taille du corps et du rythme cardiaque (Bohnekamp et Schöneberg, 2011).

Les connaissances actuelles sur les RCPG d'Adhésion suggèrent d'importants rôles d'adhésion et de migration au cours du développement, notamment dans le SNC.

II.3. Les récepteurs BAI

Parmi les RCPG d'Adhésion, les protéines de la famille des récepteurs Brain Angiogenesis Inhibitor (BAI) sont essentiellement localisées dans le cerveau et présentent des caractéristiques suggérant l'implication de ces récepteurs dans le développement d'un réseau neuronal fonctionnel.

II.3.1. La découverte des récepteurs BAI

En 1997, en cherchant des gènes cibles du suppresseur de tumeur p53, l'équipe du Dr. Tokino a mis en évidence le gène *hBAIL* codant pour une protéine de 1584 acides aminés (~175 kDa) dans une banque d'ADNc de cerveau fœtal humain (Nishimori et al., 1997). p53 régule le gène codant pour BAI1, situé sur le chromosome 8q24, en se fixant sur le neuvième intron. La séquence identifiée de hBAI1 code pour sept domaines transmembranaires, des domaines TSR1 dans sa partie extracellulaire, un domaine de liaison aux hormones HBD et un site de protéolyse GPS (**figure 14**). Les domaines TSR1 ayant été impliqués auparavant dans l'inhibition de l'angiogenèse (Tolsma et al., 1993; Chen et al., 2000), le rôle du domaine N-terminal fut testé sur un modèle de néovascularisation de cornée de rat. Les auteurs ont montré que les répétitions TSR1 de cette protéine, au nombre de cinq, inhibent l'angiogenèse dans les cornées. Par ailleurs, des analyses en Northern Blot de tissus humains adultes et fœtaux provenant de différents organes ont mis en évidence que le gène codant pour cette protéine est majoritairement exprimé dans le cerveau ; ils ont donc nommé cette nouvelle protéine humaine « inhibiteur de l'angiogenèse spécifique du cerveau » (human Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1, hBAI1) (Nishimori et al., 1997). La forme murine de BAI1 (mBAI1) présente 94% d'homologie avec la forme humaine, avec une séquence de 1582 acides aminés (Koh et al., 2001). Des analyses en Northern Blot de cerveau de souris à différents âges pré- et post-nataux montrent une augmentation de l'expression de *mBail*, qui atteint un pic à P10, indiquant que *mBail* est fortement exprimé dans le SNC durant le développement (Koh et al., 2001; Kee et al., 2002, 2004). Chez l'adulte, des expériences d'hybridation *in situ* montrent que *mBail* est exprimé dans les couches II à VI du cortex cérébral. Il est aussi fortement exprimé dans le CA1 de l'hippocampe, et plus faiblement dans les CA2 et CA3 et le gyrus denté (Koh et al., 2001; Jones et al., 2009). Dans le cervelet, *mBail* est exprimé dans les noyaux profonds, et les données publiées montrent aussi une forte

expression dans les cellules de Purkinje (Koh et al., 2001), mais ces résultats ne concordent pas avec les données de la base de données Allen Brain Atlas (Jones et al., 2009). Enfin, certains noyaux postérieurs comme le noyau cochléaire ventral ou le noyau hypoglosse présentent un marquage pour l'ARNm de *mBai1* (**figure 13 gauche**). Par ailleurs, une étude sur les gènes exprimés dans l'hippocampe de souris a identifié un second promoteur dans le gène de *mBai1*, codant pour une protéine dépourvue de son domaine N-terminal et exprimé spécifiquement dans cette région du cerveau (Valen et al., 2009).

Quelques temps après la découverte de BAI1, l'équipe du Dr Tokino a mis en évidence deux nouveaux gènes homologues de *hBAI1* : *hBAI2* et *hBAI3*, présents sur les bandes chromosomiques 1p35 et 6q12, respectivement, mais qui ne sont pas régulés par p53 (Shiratsuchi et al., 1997). Les produits de ces gènes présentent des similarités structurales avec *hBAI1* dans leur domaine N-terminal : quatre domaines TSR1 – BAI1 en possède cinq –, un domaine HBD et un motif GPS juxtaposé au premier domaine transmembranaire (**figure 14**). Cependant, l'homologie de séquence entre les trois récepteurs BAI est assez faible (*e.g.* l'homologie de séquence entre les formes murines de BAI1 et BAI3 n'est que de 48,1%), notamment au niveau de la partie intracellulaire des récepteurs, où seules de courtes séquences sont conservées et où l'homologie n'est que de 12% entre *hBAI1* et *hBAI2* ou *hBAI3* (Shiratsuchi et al., 1997; Koh et al., 2001). En revanche, ces trois récepteurs sont bien conservés au cours de l'évolution puisque les formes humaines et murines présentent dans chacun des cas plus de 95% d'homologie de séquence, et leur taille ne varie que de quelques résidus (Koh et al., 2001; Kee et al., 2002, 2004).

L'analyse par Northern Blot a montré une expression très faible de *mBai2* dans différents tissus embryonnaires murins. Mais son expression est ensuite restreinte au cerveau dès les premiers jours postnataux. Les données d'hybridation *in situ* chez l'adulte montre que *mBai2* est fortement exprimé dans les neurones pyramidaux des régions CA1 et CA2 de l'hippocampe, et plus faiblement dans le CA3. L'ARNm de *mBAI2* est aussi détecté dans le gyrus denté, les couches II à VI du cortex cérébral et certains noyaux postérieurs (Kee et al., 2002; Jones et al., 2009). À nouveau, la littérature montre l'expression de *mBai2* dans les cellules de Purkinje (Kee et al., 2002), tandis qu'aucun marquage n'est observé dans les données de l'Allen Brain Atlas (**figure 13 centre** ; Jones et al., 2009). Par ailleurs, *mBai2* présente un patron d'expression temporel similaire à celui de BAI1 avec un pic à P10 (Kee et al., 2002). L'expression de *mBai3* semble, elle, confinée uniquement au cerveau et ne débiter qu'après la naissance. Les résultats de Northern Blot indiquent que *mBai3* atteindrait un pic

d'expression à P1 (Kee et al., 2004), mais ces résultats restent à confirmer. Le patron d'expression spatiale de *mBai3* est proche de celui de *mBai2* : *mBai3* est fortement exprimé dans l'hippocampe (CA1-3) et le gyrus denté. Il est aussi détecté dans le cortex cérébral à l'exception de la couche I et dans certains noyaux postérieurs. Enfin, *mBai3* est fortement exprimé dans les noyaux profonds du cervelet et dans les cellules de Purkinje (**figure 13 droite** ; Kee et al., 2004; Jones et al., 2009).

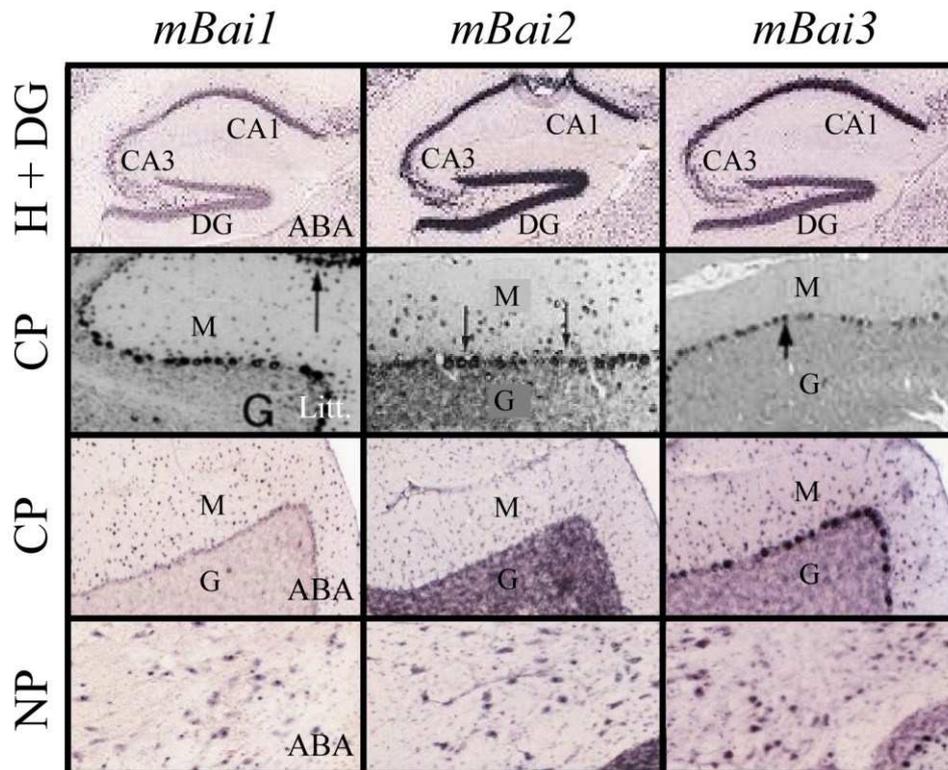


Figure 13 : Expression des récepteurs BAI dans le SNC murin.

Hybridation *in situ* montrant l'expression de *mBai1*, *mBai2* et *mBai3* dans l'hippocampe et le gyrus denté (H + DG) d'après l'Allen Brain Atlas (ABA), dans les cellules de Purkinje (CP) d'après la littérature (Litt.) et l'ABA et dans les noyaux profonds (NP). M : couche moléculaire ; G : couche granulaire interne.

Une divergence notable entre les trois récepteurs BAI est l'existence pour BAI1 et BAI2 de variants d'épissage conduisant à des protéines fonctionnelles déléetées du premier et/ou du deuxième domaine TSR1. Dans le cas de BAI2, des expériences de réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR) après transcription inverse (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR) ont aussi montré l'existence de variants d'épissage déléetés d'une partie de la troisième boucle intracellulaire (Kee et al., 2002). Dans les RCPG, la troisième boucle intracellulaire participe à la liaison de la protéine G (Kristiansen, 2004). Il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée sur l'interaction des récepteurs BAI avec des

protéines G. Néanmoins, l'absence d'une partie de la troisième boucle intracellulaire dans ce variant de BAI2 pourrait empêcher un éventuel couplage à une protéine G et ainsi réguler la signalisation du récepteur BAI2. À l'inverse, l'étude bioinformatique des séquences d'ARNm et de celles de marqueurs de séquences exprimées (EST) du gène de BAI3 n'a pas permis de mettre en évidence l'existence de variants d'épissage conduisant à la traduction de protéines fonctionnelles. Au contraire, cette étude a révélé que lors de l'épissage alternatif, une partie des introns du gène codant pour BAI3 est conservée, donnant ainsi lieu à des transcrits non fonctionnels. Ces transcrits, aussi nommés ARN non codant (ARNnc), semblent jouer divers rôles dans la régulation de l'expression de leur gène d'origine (Turner et Morris, 2010). Ainsi, les ARNnc obtenus pour BAI3 pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression protéique du récepteur (Bjarnadóttir et al., 2007b). Des données expérimentales antérieures, obtenues par RT-PCR sur des extraits de cerveaux murins au cours du développement, ont montré l'existence de variants de BAI3, délétés de la troisième boucle cytoplasmique, qui pourraient produire des protéines fonctionnelles (Kee et al., 2004). Ces résultats contradictoires nécessiteront de nouvelles études pour être confirmés.

II.3.2. La structure des récepteurs BAI

Comme l'ensemble des RCPG d'Adhésion, les récepteurs BAI possèdent un long domaine N-terminal présentant des motifs pouvant leur conférer des propriétés de reconnaissance et d'adhésion, un domaine GPS de protéolyse, sept domaines transmembranaires, et une extrémité C-terminale cytosolique pourvue de motifs conservés (**figure 14**).

II.3.2.1 Les domaines extracellulaires

La séquence extracellulaire des récepteurs BAI est composée de cinq (BAI1) ou quatre (BAI2 et BAI3) domaines TSR1, d'un domaine HBD, dont le rôle dans les RCPG d'Adhésion, et notamment les récepteurs BAI, reste à déterminer, et d'un site de protéolyse GPS juxtaposé au premier domaine transmembranaire. L'analyse bioinformatique montre également la présence d'un domaine CUB dans l'extrémité N-terminale de la séquence humaine de BAI3, mais avec un score beaucoup moins élevé dans la séquence murine. La présence de ce domaine devra donc être vérifiée par des évidences expérimentales.

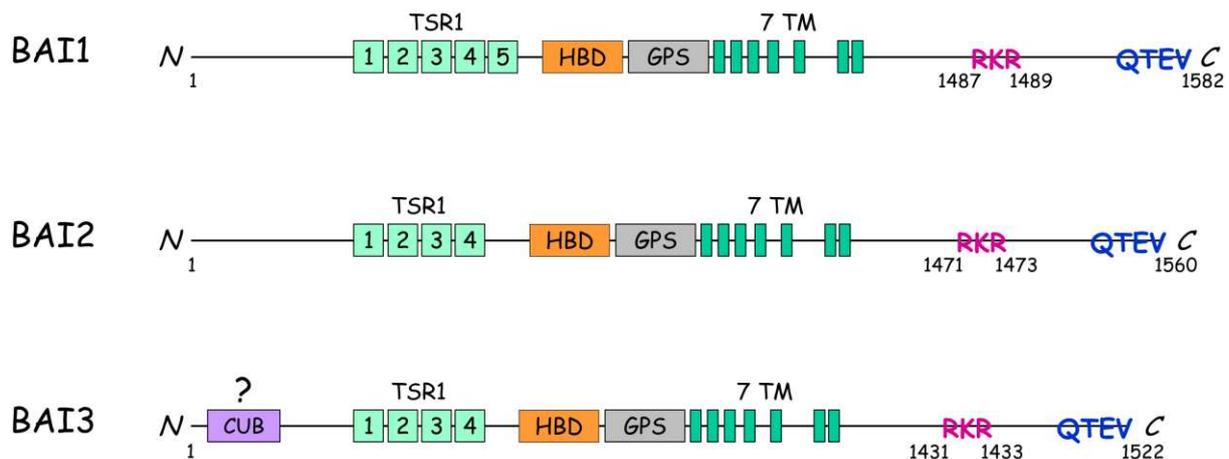


Figure 14 : Représentation schématique des récepteurs BAI1, BAI2 et BAI3.

Les chiffres sous les schémas correspondent au numéro des résidus. TSR1 : ThromboSpondine Repeat domains type 1 ; HBD : Hormon Binding Domain ; GPS : GPCR Proteolysis Site ; 7 TM : sept domaines transmembranaires ; RKR : motif Arginine-Lysine-Arginine ; QTEV : motif Glutamine-Thréonine-Glutamate-Valine.; CUB : domaine C1r/C1s Uegf BMP1

- Les domaines TSR1

Les répétitions thrombospondine de type 1 (ThromboSpondine type 1 Repeats, TSR1) sont des modules protéiques d'une soixantaine d'acides aminés apparus tôt dans l'évolution. Ces modules sont retrouvés dans différents types de protéines, majoritairement exprimées dans le SNC en développement, comme les thrombospondines, certaines sémaphorines, les protéines ADAMTS, Unc5, la F-spondine, etc... La thrombospondine-1, dans laquelle ont été identifiés les TSR1, est impliquée dans de multiples fonctions cellulaires : adhésion, motilité, prolifération, contact entre cellules, agrégation cellulaire et inhibition de l'angiogenèse. Dans le SNC, elle est exprimée et sécrétée par les astrocytes immatures et promeut la formation des synapses (Asch et al., 1986; Christopherson et al., 2005). Pour cela, la thrombospondine-1 interagit avec des protéines de surface comme par exemple le récepteur à la gabapentine $\alpha\delta$ -1 dans les cellules ganglionnaires de la rétine (Eroglu et al., 2009). Par ailleurs, des études réalisées sur des neurones d'hippocampe en culture durant les stades précoces du développement ont montré que la thrombospondine-1 accélère la synaptogenèse des jeunes neurones par un processus encore indéterminé mais qui fait intervenir la neuroligine 1 (Xu et al., 2009). Les protéines Unc5, la F-spondine et son homologue chez *C. elegans* SPON1 ainsi que les sémaphorines 5A et B jouent aussi des rôles importants dans le SNC puisqu'elles sont impliquées dans le guidage axonal, notamment en réponse à des molécules de la matrice

extracellulaire, ainsi que dans le guidage des crêtes neurales (Adams et Tucker, 2000; Tzarfaty-Majar et al., 2001; Killeen et al., 2002; Woo et al., 2008).

Les domaines TSR1 des trois récepteurs BAI présentent des motifs connus pour leur rôle dans des processus d'adhésion et de migration cellulaire (Rich et al., 1990), comme par exemple le motif WSXW ou le motif CSXTCX (**figure 15** ; Kee et al., 2004). Dès lors, la présence de ces domaines dans les récepteurs BAI pourrait être à la base de fonctions dans la reconnaissance de molécules extracellulaires et dans l'adhésion des cellules exprimant l'un ou l'autre BAI.

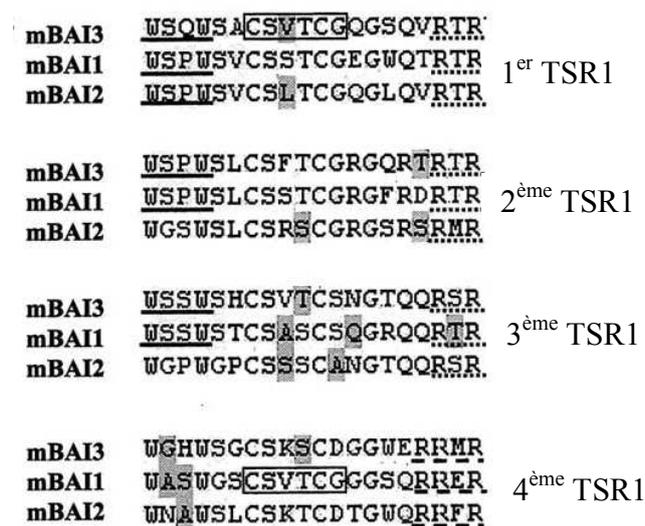


Figure 15 : Alignement des séquences des quatre TSR1 des récepteurs BAI (d'après Kee et al., 2004)

- Le GPS

Les récepteurs BAI possèdent un domaine GPS, et BAI1 et BAI2 subissent la protéolyse au niveau de ce domaine. En effet, des expériences de Western Blot, réalisées sur des lysats de cellules hétérologues exprimant le récepteur BAI1 ainsi que sur le milieu conditionné dans lequel elles avaient été cultivées, ont permis de mettre en évidence la présence d'un fragment de 120 kDa, correspondant au domaine N-terminal clivé au niveau du GPS de BAI1 (Kaur et al., 2005). De façon similaire, un fragment de 80 kDa a été mis en évidence pour BAI2, correspondant au domaine N-terminal du récepteur clivé au niveau du GPS (Okajima et al., 2010). Il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée concernant la protéolyse potentielle de BAI3.

- Le domaine CUB

Le nom du domaine CUB est un acronyme des trois premières protéines dans lesquelles il a été identifié : les protéines humaines du Complément C1r/C1s, l'Uegf d'embryon d'oursin de mer et la protéine BMP1 humaine (Bork et Beckmann, 1993). Le domaine CUB est un motif structurel d'environ 110 acides aminés organisé en feuillets β (Bork et Beckmann, 1993). Très conservé dans l'évolution, ce domaine est retrouvé dans de nombreuses protéines extracellulaires associées à la membrane plasmique et impliquées dans un grand nombre de processus, notamment développementaux, comme la détermination de l'axe dorso-ventral, l'activation des protéines du complément, l'angiogenèse et le guidage axonal, ou encore le fonctionnement des récepteurs aux neurotransmetteurs au niveau de la membrane postsynaptique. Par exemple, la protéine LEV10 de *Caenorhabditis elegans* et la protéine NETO1 régulent respectivement la concentration des récepteurs à l'acétylcholine à la jonction neuromusculaire et celle des sous-unités NR2A des récepteurs NMDA via leur domaine CUB (Ng et al., 2009). Par ailleurs, il a été montré que les domaines CUB présents dans l'extrémité extracellulaire de la neuropiline 1 permettent la liaison à la sémaphorine 3A et jouent un rôle important dans la réponse répulsive à cette protéine lors du guidage axonal (Gu et al., 2002; Neufeld et al., 2002). Enfin, de nombreuses protéines possédant un domaine CUB sont impliquées dans l'adhésion et la motilité cellulaire, notamment lors de la métastatisation. Par exemple, la surexpression et l'hyperphosphorylation de la protéine CUB-Domain Containing Protein (CDCP1) dans diverses tumeurs d'origine épithéliale sont corrélées au développement et la métastatisation des tumeurs (Benes et al., 2011; Seidel et al., 2011).

Au vu de l'incertitude des données bioinformatiques, des données expérimentales seront nécessaire pour démontrer la présence de ce domaine dans les protéines BAI.

II.3.2.2 Les motifs intracellulaires

Deux motifs mis en évidence initialement dans le domaine C-terminal de BAI1 sont conservés dans la famille BAI.

Le motif QTEV (Glutamine-Thréonine-Glutamate-Valine) est un motif conservé de liaison aux domaines PDZ. Ces domaines ont été identifiés pour la première fois dans la protéine postsynaptique PSD95 (PostSynaptique Density 95), dans son homologue chez la *Drosophile* Dlg1 (Disc large tumour suppressor) et dans la protéine de jonction serrée ZO1 (Zonula Occludens 1). Ce sont des domaines d'environ 90 résidus qui agissent comme des

modules d'échafaudage dans les interactions protéine-protéine, notamment au niveau des jonctions serrées et des jonctions synaptiques, en liant de courtes séquences aminoacides au niveau d'une poche hydrophobe (Dev, 2004). L'analyse par cristallographie aux rayons X du troisième domaine PDZ de la PSD95 lié à un ligand peptidique a permis de mettre en évidence une séquence consensus capable de se glisser dans la poche du domaine PDZ. Cette séquence, située dans le domaine C-terminal du ligand, est du type X-T/S-X-V-COO⁻ (Doyle et al., 1996). Par des expériences de double hybride utilisant comme appât la queue cytoplasmique de BAI1, Shiratsushi et ses collaborateurs ont révélé une protéine de 1352 acides aminés contenant cinq domaines PDZ et appartenant à la famille des homologues de guanylate kinase associés à la membrane (Membrane Associated GUanylate Kinase homologue, MAGUK), des protéines communément retrouvées à la densité postsynaptique (PSD) des jonctions neuronales. Cette protéine a été nommée Bai-Associated Protein (BAP1) ou encore Membrane Associated Guanylate kinase Inverted 1 (MAGI1). À l'aide de formes tronquées du récepteur, les auteurs ont montré que le domaine QTEV de BAI1 est bien un motif consensus de type X-T-X-V capable de se lier aux domaines PDZ (Shiratsuchi et al., 1998). Ce résultat a été confirmé quelques années plus tard par la mise en évidence d'une interaction entre le motif QTEV de BAI1 et la protéine postsynaptique PSD95 dans des extraits de cerveaux de rats (Lim et al., 2002). Ce motif est par ailleurs conservé dans BAI2 et BAI3, suggérant que ces récepteurs ont également la capacité de lier des protéines d'échafaudage, et notamment PSD95, au niveau de la jonction synaptique.

Le motif RKR (Arginine-Lysine-Arginine) forme une petite région en hélice- α dans la queue cytoplasmique des trois BAI. Park et ses collaborateurs, en recherchant des partenaires d'ELMO1 par des expériences de double hybride, ont mis en évidence la liaison entre le domaine N-terminal d'ELMO1, une protéine cytoplasmique appartenant à un complexe activateur de Rac1, et le motif RKR situé au niveau des résidus 1487 à 1489 de mBAI1 (Park et al., 2007). Ce motif est conservé dans la queue cytoplasmique de mBAI2 (résidus 1471 à 1473) et de mBAI3 (résidus 1431 à 1433) (Kee et al., 2004), ainsi que dans leurs homologues humains (Shiratsuchi et al., 1997), suggérant l'existence d'un partenariat conservé au cours de l'évolution entre les BAI et la protéine cytosolique ELMO1.

II.3.3. Les rôles connus des récepteurs BAI

II.3.3.1 Les rôles des récepteurs BAI dans la tumorigenèse et l'angiogenèse

Comme nous l'avons vu précédemment, BAI1 a été mis en évidence dans la recherche de gènes cibles du suppresseur de tumeur p53 (Nishimori et al., 1997). Nishimori et ses collaborateurs ont donné le nom d' « Inhibiteurs d'Angiogenèse » à ces récepteurs après avoir démontré la capacité de BAI1 à inhiber la néovascularisation de cornées de rats induite par le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) via ses domaines TSR1 (cf. § II.3.2.1). De fait, des études de tumeurs ou de lignées cellulaires tumorales ont mis en évidence une corrélation inverse existant entre la densité de la vascularisation des tumeurs et l'expression de BAI1 (Fukushima et al., 1998; Nam et al., 2004; Kang et al., 2006). Par exemple, le transfert du gène codant BAI1 dans des lignées cellulaires de carcinomes de reins murins entraîne un arrêt de la croissance tumorale induit par une inhibition de l'angiogenèse (Kudo et al., 2007). L'équipe du Pr. Van Meier a montré la présence dans le milieu de culture de cellules hétérologues exprimant le récepteur d'un fragment soluble de 120 kDa de BAI1, nommé vasculostatine (Vstat120), qui découle de la protéolyse de BAI1 au niveau de son domaine GPS. *In vitro*, Vstat120 inhibe la migration et la prolifération des cellules endothéliales en interagissant avec le domaine extracellulaire CLESH (CD36, LIMP2, EMP Structural Homology) de CD36, une protéine transmembranaire jouant un rôle critique dans la liaison des thrombospondine-1 et -2 aux cellules endothéliales (**figure 16** ; Kaur et al., 2005, 2009). *In vivo*, l'expression de Vstat120 dans des xénogreffes de gliomes chez la souris inhibe l'angiogenèse, conduisant à une diminution de la vascularisation de la tumeur et à l'arrêt de sa croissance (Kaur et al., 2005). Par ailleurs, l'action de BAI1 sur les cellules endothéliales semble aussi emprunter une seconde voie : la liaison de BAI1 aux intégrines $\alpha_v\beta_5$ ou à CD36 à la surface des cellules endothéliales induirait une cascade de signalisation entraînant leur apoptose, empêchant ainsi la formation des vaisseaux sanguins (Koh et al., 2004; Klenotic et al., 2010).

BAI2 a aussi été impliqué dans l'angiogenèse, notamment par la mise en évidence par Northern Blot d'une diminution de son expression une heure après une ischémie (Kee et al., 2002; Jeong et al., 2006). BAI2 semble interagir avec le facteur de transcription GABP (GA-Binding Protein), qui régule négativement l'expression du gène du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelium Growth Factor, VEGF), un facteur pro-angiogénique. Un des effets de la diminution de l'expression de BAI2 serait la diminution de

son interaction avec GABP permettant ainsi l'augmentation du taux d'expression du VEGF et, de fait, l'angiogenèse (Jeong et al., 2006).

Le niveau d'expression de BAI3 – mais pas celui de BAI2 – est diminué dans des lignées de gliomes (Shiratsuchi et al., 1997). De plus, BAI3 est muté de façon significative dans 13% des cancers du poumon non à petites cellules, et dans 5% des adénocarcinomes du poumon (Kan et al., 2010).

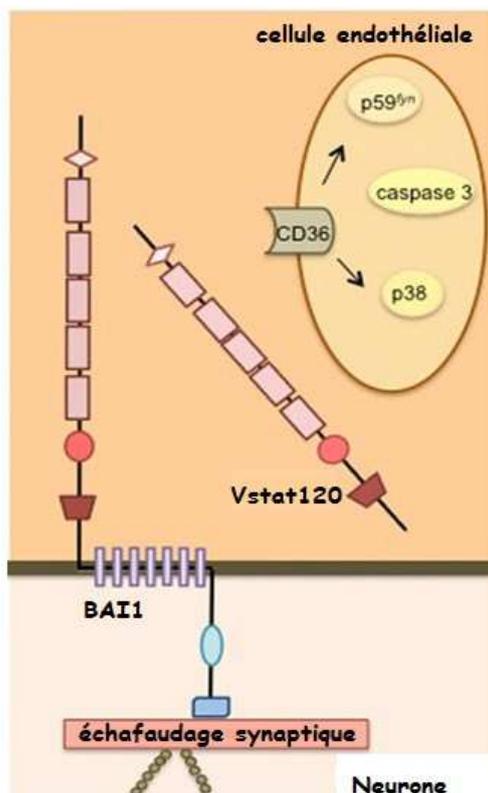


Figure 16 : Illustration de l'action de Vstat120 sur les cellules endothéliales.

BAI1 subit la protéolyse au niveau de son GPS, libérant son extrémité N-terminale, Vstat120, qui inhibe l'angiogenèse en interagissant avec CD36. (Modifié d'après Cork et Van Meir, 2011)

II.3.3.2 Les rôles des récepteurs BAI dans la phagocytose

La phagocytose est un phénomène essentiel puisqu'elle permet à l'organisme de se débarrasser de corps étrangers comme les bactéries ou les cellules surnuméraires produites durant le développement ou chez l'adulte. La phagocytose met en jeu le remodelage du cytosquelette d'actine qui permet la formation d'une structure en forme de « coupe » à la surface de la cellule phagocytaire, permettant l'internalisation des bactéries ou des corps apoptotiques à éliminer.

L'observation de variations morphologiques – la formation de filopodes – sur des cellules COS-7 surexprimant BAI1 a rapidement suggéré l'implication des récepteurs BAI dans la régulation du cytosquelette d'actine (Shiratsuchi et al., 1998). Par ailleurs, la mise en évidence de BAP2 (Bai1-Associated Protein 2, aussi notée BAIAP2/IRSp53) comme partenaire de BAI1 appuie l'hypothèse d'un rôle des BAI dans la régulation du cytosquelette. BAP2/BAIAP2/IRSp53 interagit avec mDia, un régulateur du cytosquelette d'actine, (Oda et al., 1999; Fujiwara et al., 2000) et lie les RhoGTPases activées Rac1 et Cdc42 à des effecteurs en aval comme WAVE2 et le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 (Choi et al., 2005). BAP2/BAIAP2/IRSp53 pourrait donc être un intermédiaire entre BAI1 et le cytosquelette.

Les protéines Dock180, ELMO1 et Rac1, homologues chez les mammifères des protéines CED5, CED12 et CED10 de *Caenorhabditis elegans*, respectivement, sont connus pour leur rôle dans le réarrangement du cytosquelette d'actine lors de la phagocytose de cellules apoptotiques et de la motilité cellulaire (Gumienny et al., 2001; Brugnera et al., 2002; Lu et Ravichandran, 2006). L'équipe du Pr. Ravichandran a récemment cherché à découvrir les partenaires situés en amont du module ELMO1/Dock180/Rac1. Par des expériences de double hybride et d'immunoprécipitation *in vitro*, les chercheurs ont mis en évidence l'interaction entre la partie N-terminale d'ELMO1 et une région en hélice- α constituée d'un motif RKR dans la queue cytoplasmique de BAI1 (Park et al., 2007). À l'aide de la cytométrie en flux, ils ont montré que l'expression de BAI1 à la surface de macrophages en culture augmente l'internalisation de corps apoptotiques. BAI1 reconnaît les phosphatidylsérines exhibées à la surface des cellules apoptotiques via ses TSR1 et active Rac1 par l'intermédiaire du complexe ELMO1/Dock180, conduisant ainsi au remaniement du cytosquelette d'actine et permettant la formation d'une « coupe de phagocytose » (Park et al., 2007). Par la suite, l'équipe du Pr. Ravichandran a démontré que la cascade de signalisation BAI1/ELMO1/Dock180/Rac1 permet la phagocytose des cellules germinales surnuméraires par les cellules de Sertoli dans les testicules de souris (Elliott et al., 2010). Enfin, cette même équipe a montré l'implication des domaines TSR1 de BAI1 dans la reconnaissance et l'internalisation de bactéries à gram négatif. BAI1, surexprimé à la surface de macrophages murins, reconnaît spécifiquement les lipopolysaccharides présents à la surface des bactéries gram négatif, ce qui entraîne l'activation de Rac1 via le complexe ELMO1/Dock180. L'activation de Rac1 sert ici non seulement à l'internalisation de la bactérie liée, mais aussi à la mise en place d'une réponse proinflammatoire par les macrophages (Das et al., 2011).

II.3.3.3 Les rôles des récepteurs BAI dans le SNC

La présence des domaines TSR1 dans l'extrémité N-terminale des récepteurs BAI suggère leur implication dans la reconnaissance de partenaires extracellulaires et dans des processus d'adhésion. De plus, la présence d'un motif de liaison au domaine PDZ, corrélée à l'expression précoce des BAI dans le cerveau, laisse présager un rôle important de ces récepteurs dans le développement du SNC, et notamment dans la mise en place d'un réseau neuronal fonctionnel. Différentes observations renforcent cette hypothèse.

Tout d'abord, quatre des six partenaires cytosoliques de BAI1 présentent des propriétés suggérant une localisation synaptique du récepteur : 1/ **BAP1/MAGI1** fait partie de la famille des protéines MAGUK, communément retrouvées au niveau de la PSD. BAP1 est connue pour réguler la localisation synaptique de diverses protéines telles les molécules transmembranaires sidekicks dans les photorecepteurs (Yamagata et Sanes, 2010) et pourrait donc avoir la même fonction pour le récepteur BAI1 (Shiratsuchi et al., 1998) ; 2/ **PSD95** est une protéine de l'échafaudage postsynaptique appartenant aussi à la famille des MAGUK et qui pourrait jouer un rôle similaire à celui envisagé pour BAP1/MAGI1 (Lim et al., 2002). L'interaction de BAI1 avec ces deux partenaires se fait au niveau du motif QTEV situé à l'extrémité de la queue C-terminale du récepteur. Ce motif est conservé dans BAI2 et BAI3, suggérant que ces deux autres membres de la famille des BAI pourraient aussi interagir avec BAP1/MAGI1 et/ou la PSD95 et être localisés au niveau de la membrane postsynaptique dans le cerveau ; 3/ **BAIPA2/IRSp53/BAP2** est impliqué dans la régulation du cytosquelette d'actine via les RhoGTPases (cf § II.3.2.2.) et cet effet a notamment été corrélé à la régulation de la spinogénèse *in vitro* (Oda et al., 1999; Fujiwara et al., 2000; Choi et al., 2005) ; 4/ **BAP3** est principalement exprimé dans le cerveau et présente des homologies de séquence avec Munc13 et la Synaptotagmine, notamment du fait de la présence de domaines C2. Munc13 et la Synaptotagmine sont des protéines jouant un rôle central dans l'exocytose des vésicules présynaptiques au niveau des synapses glutamatergiques grâce à leurs domaines C2 qui permettent la liaison du calcium et le relargage de neurotransmetteurs (Koch et al., 2000; Fernández-Chacón et al., 2001).

Par la suite, des expériences d'immunomarquage *in vivo* et *in vitro* ont montré la présence de BAI1 dans les neurones (Mori et al., 2002; Sokolowski et al., 2010) et les récepteurs BAI3 et BAI1 ont été identifiés par spectrométrie de masse dans des préparations purifiées de densités postsynaptiques du cortex (Jordan et al., 2004; Peng et al., 2004; Collins

et al., 2006). De plus, l'étude de la composition protéique de la synapse fibre parallèle/cellule de Purkinje du cervelet par une approche conjuguant l'utilisation de souris transgéniques, la purification par affinité et la spectrométrie de masse (SYnaptic Protein profiling approach, SYProt) a identifié les récepteurs BAI2 et BAI3 au niveau de cette synapse (Selimi et al., 2009). La présence des récepteurs BAI au niveau de la PSD et leur expression précoce durant le développement suggèrent un rôle important de ces récepteurs durant la mise en place des connexions synaptiques.

La souris dont le gène codant pour BAI2 a été invalidé (BAI2^{-/-}) est moins anxieuse dans des tests de défaite sociale et de suspension par la queue (Tail Suspension Test, TST), deux tests fréquemment utilisés pour déterminer l'efficacité des antidépresseurs ; elle présente aussi une augmentation de la neurogenèse dans l'hippocampe observée grâce à des marquages avec de la BromodéoxyUridine (5-Bromo-2'-deoxyUridine, BrdU), un nucléoside synthétique analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN nouvellement synthétisé (Okajima et al., 2011). Par ailleurs, une étude de double hybride suggère que BAI2 interagirait avec la protéine d'interaction à la glutaminase (Glutaminase Interacting Protein, GPI), une petite protéine composée quasi exclusivement d'un domaine PDZ et jouant un rôle clé dans l'échafaudage postsynaptique chez les mammifères (Zencir et al., 2011).

Enfin, une étude menée en 2008 sur une cohorte de patients caucasiens atteints de schizophrénie a mis en évidence le lien entre des SNP dans le gène humain de BAI3 et les symptômes désorganisés de la schizophrénie (DeRosse et al., 2008). Or, comme nous l'avons vu dans la partie I. (cf. § I.4.2.), des évidences neuropathologiques indiquent que la schizophrénie serait traduite sur un plan morphologique par une diminution du nombre d'épines dendritiques et de synapses (Penzes et al., 2011). En 2011, Bolliger et ses collaborateurs ont mis en évidence l'interaction des domaines TSR1 de l'extrémité N-terminale de BAI3 avec les protéines C1q-like (C1ql). Alors que le traitement de neurones d'hippocampe en culture avec les protéines C1ql entraîne une diminution de la densité des synapses excitatrices, l'ajout d'un fragment synthétique soluble de BAI3 inhibe cet effet. La mise en évidence des protéines C1ql comme ligands de BAI3 appuie l'hypothèse de l'implication de ce récepteur dans le développement d'un réseau neuronal fonctionnel. En effet, les C1ql appartiennent à la superfamille des protéines du complément. Ces protéines sont connues pour divers rôles importants dans la formation des synapses : la protéine C1q de la cascade classique du complément est exprimée par les neurones postnataux au niveau des jeunes synapses et est impliquée dans l'élimination des synapses surnuméraires (Stevens et

al., 2007). À l'inverse, Cbln1, un autre membre de la superfamille des C1q, est impliqué dans la formation et le maintien des synapses fibres parallèles/cellules de Purkinje dans le cervelet (cf. § III.2.4.3 ; Hirai et al., 2005).

La récente découverte d'un ligand de BAI3 impliqué dans le développement synaptique, ajoutée à l'ensemble des connaissances sur le patron d'expression, la structure et les divers rôles des récepteurs BAI, suggère fortement l'importance de ces récepteurs dans le développement du SNC et notamment dans la mise en place d'un réseau neuronal fonctionnel.

III. Le cortex cérébelleux murin comme modèle d'étude du développement neuronal

Au cours de mes travaux sur l'étude du rôle du récepteur BAI3 dans le développement neuronal, j'ai utilisé deux modèles complémentaires : *in vitro*, les cultures primaires de neurones d'hippocampe m'ont permis d'analyser la fonction du récepteur BAI3 au niveau de la morphologie neuronale ; *in vivo*, le cortex cérébelleux murin a permis une approche plus globale du rôle du récepteur BAI3 dans la mise en place d'un système neuronal bien caractérisé.

Depuis la fin des années 1970, de nombreuses études sur la morphogénèse des neurones et les voies de signalisation impliquées ont mis en évidence les avantages du modèle de la culture primaire de neurones d'hippocampe (Banker et Cowan, 1977, 1979; Peacock et al., 1979). Un grand nombre de mécanismes moléculaires régulant la dendritogenèse et la spinogénèse ont été mis en évidence et étudiés dans ce système (*par exemple* Ahuja et al., 2007; Pinyol et al., 2007; Saneyoshi et al., 2008; Kim et al., 2011; etc...), qui présente l'avantage de donner accès à des neurones à une densité relativement faible pour une analyse fine des variations morphologiques au cours du temps. Par ailleurs, la possibilité d'exprimer des protéines recombinantes dans ces neurones en culture permet d'étudier la localisation de ces protéines ainsi que leur rôle dans la morphogénèse neuronale. Cependant, les cultures primaires de neurones d'hippocampe ne permettent pas de reconstituer tous les processus du développement neuronal.

Le cervelet est une structure simple et homogène située dans la partie postérieure du crâne. Il est impliqué dans le contrôle moteur, où il contribue à la coordination et la synchronisation des gestes, régulant ainsi la précision des mouvements. Il joue aussi un rôle dans certaines fonctions cognitives comme le langage et l'attention. Depuis plus d'un siècle et les travaux initiateurs de Ramón y Cajal, le cortex cérébelleux a fait l'objet d'un grand nombre d'études et l'on connaît aujourd'hui les différents types cellulaires qui le composent, leur connectivité et leur physiologie, faisant de cette structure la partie la mieux connue du SNC. Le neurophysiologiste australien John C. Eccles, prix Nobel de médecine en 1963, dira d'ailleurs du cortex cérébelleux qu' « [Il] présente des conditions particulièrement favorables pour des investigations sur la neurogenèse et la morphogénèse car il est construit d'une manière géométrique simple comme un treillis rectangulaire, et son histologie et la physiologie des neurones le constituant sont mieux comprises que n'importe où ailleurs dans

le système nerveux central [...] » (Eccles, 1970). En particulier, les cellules de Purkinje, seules efférences du cortex cérébelleux, ont une morphologie complexe, avec un arbre dendritique composé de nombreuses ramifications, ce qui en fait l'un des types neuronaux les plus grands du SNC. Ces neurones reçoivent quatre types d'afférences différentes, à des endroits bien définis, et qui semblent reposer chacune sur des mécanismes moléculaires distincts. Les cellules de Purkinje et les innervations caractéristiques qu'elles reçoivent constituent donc l'un des meilleurs modèles *in vivo* pour disséquer l'implication d'une protéine au rôle inconnu tel le récepteur BAI3 dans le développement des neurones et la formation d'un réseau synaptique spécifique et fonctionnel.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons au cortex cérébelleux, en décrivant notamment les types cellulaires le constituant et les fibres afférentes qu'il reçoit. Nous étudierons aussi comment se développent les cellules de Purkinje, les plus gros neurones du SNC, pour obtenir cette morphologie caractéristique, puis nous décrirons dans la dernière partie la mise en place des connexions synaptiques, en focalisant notre exposé sur l'innervation de ces neurones, seules efférences du cortex cérébelleux.

III.1. Le cortex cérébelleux

Durant le développement précoce, le tube neural antérieur est divisé en trois vésicules : le prosencéphale (la plus rostrale), le mésencéphale et le rhombencéphale (la plus caudale). Le cervelet est issu de la partie dorso-latérale du rhombencéphale, qui prolifère et s'infléchit pour former les lèvres rhombiques du métencéphale (Hallonet et Le Douarin, 1993). Ces éléments latéraux se développent vers la ligne médiane et fusionnent dans le sens rostro-caudal pour former un épaissement transversal, la plaque cérébelleuse, qui comble progressivement le toit du 4^{ème} ventricule (Hatten et Heintz, 1995; Wang et Zoghbi, 2001; Sotelo, 2004). L'utilisation du système de chimère caille/poulet dans les années 1990 a permis de démontrer que le cervelet ne provient pas uniquement du métencéphale et qu'une petite partie médiodorsale est issue de la vésicule mésencéphalique caudale (**figure 17** ; Hallonet et al., 1990; Hallonet et Le Douarin, 1993).

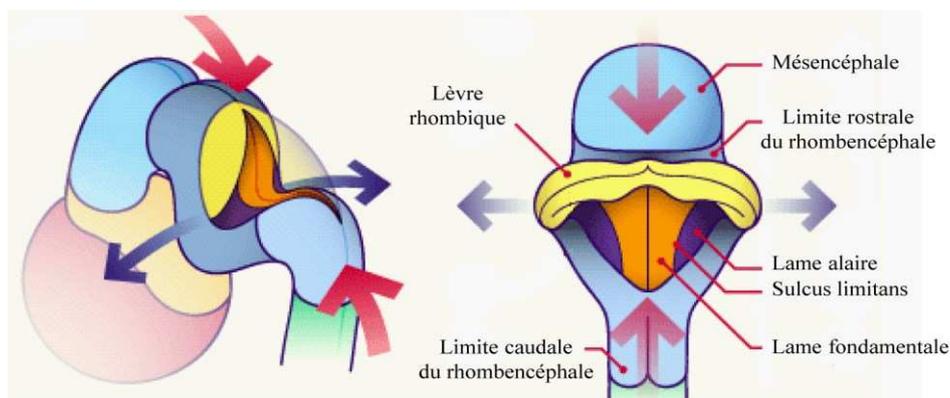


Figure 17 : Représentation schématique de la morphogenèse du cervelet.

Suite à l'augmentation de la courbure pontique (flèches bleues), les lèvres rhombiques, en jaune, sont refoulées en direction rostro-caudale (flèches rouges).

À droite : vue dorsale après la fusion de lèvres rhombiques.

Chez la souris, le développement du cortex cérébelleux débute vers le dixième jour embryonnaire (E10). À la différence des autres régions du SNC, dont les neurones sont issus d'une seule et même zone de prolifération : le neuroépithélium ventriculaire, le cortex cérébelleux émerge de deux zones germinales : 1/ la zone ventriculaire cérébelleuse et 2/ la couche granulaire externe (External Granular Layer, EGL), issue de la moitié rostrale des lèvres rhombiques. La zone ventriculaire, située à la jonction entre le mésencéphale et le métencéphale, donne naissance à la majorité des cellules – glies et neurones – du cortex cérébelleux, alors que l'EGL ne donne naissance qu'aux cellules granulaires (Zhang et Goldman, 1996; Hatten et al., 1997).

III.1.1. Les neurones du cortex cérébelleux

Le cortex cérébelleux, situé sous la surface piaie, est une structure laminée relativement uniforme constituée de trois couches cellulaires : la couche granulaire, surplombée par la couche des cellules de Purkinje, puis la couche moléculaire. Chacune de ces couches est caractérisées par la présence de types neuronaux particuliers (**figure 18** ; *pour revue voir* Ramón y Cajal, 1911; Palay et Chan-Palay, 1974; Ito, 2006)

- **La couche granulaire**, la plus interne du cortex, contient les corps cellulaires des cellules granulaires ou grains, dont le diamètre ne dépasse pas les cinq microns. Ces neurones sont les plus nombreux de tout le cerveau – ils sont évalués à 10^{10} - 10^{11} dans le cortex cérébelleux humain. La couche granulaire comporte aussi des interneurons inhibiteurs, dont les cellules de Golgi qui exercent une inhibition rétrograde sur les cellules granulaires, les cellules de Lugaro, les cellules candélabres, et des interneurons excitateurs : les cellules unipolaires en brosse (Lainé et Axelrad, 1994; Mugnaini et Floris, 1994; Kalinichenko et Okhotin, 2005).
- **La couche des cellules de Purkinje** est une couche monocellulaire contenant les corps cellulaires des cellules de Purkinje et ceux des glios de Bergmann. Les cellules de Purkinje ont un corps cellulaire plutôt arrondi d'une vingtaine de microns de diamètre. Leur axone émerge à la base du soma et plonge dans la couche granulaire avant de rejoindre la substance blanche pour se projeter sur les noyaux profonds ou sur les noyaux vestibulaires où il établit des synapses inhibitrices GABAergiques. L'axone des cellules de Purkinje constitue l'unique voie efférente du cortex cérébelleux. Il donne généralement naissance à des collatérales récurrentes qui se ramifient et innervent les cellules de Purkinje voisines. À l'opposé de l'axone, l'arbre dendritique prend naissance à l'apex du soma et se déploie dans la couche moléculaire dans un seul plan parasagittal sur plusieurs dizaines de microns.
- **La couche moléculaire**, la plus superficielle, contient les corps cellulaires de deux types d'interneurones inhibiteurs : les cellules en panier et les cellules étoilées, qui établissent des synapses GABAergiques sur les cellules de Purkinje. Les cellules en panier, situées dans le tiers inférieur de la couche moléculaire, étendent un axone assez long qui innerve plusieurs cellules de Purkinje – jusqu'à neuf – au niveau de leur soma et du segment initial de leur axone, formant une structure unique nommée *pinceau* (Sotelo, 2008). Les cellules étoilées sont, quant à elles, situées dans les deux tiers supérieurs de la couche moléculaire et projettent leur axone, plus court – notamment pour les plus superficielles –, sur les dendrites distales des

cellules de Purkinje. La couche moléculaire contient également les axones des cellules granulaires. Ils y prennent une trajectoire ascendante en direction de la surface piaie puis forment un « T » dont chacune des branches parcourent plusieurs millimètres parallèlement à la surface piaie, leur donnant le nom de fibres parallèles. Ces dernières établissent des synapses excitatrices glutamatergiques sur les épines dendritiques des dendrites distales des cellules de Purkinje (Miyazaki et al., 2003).

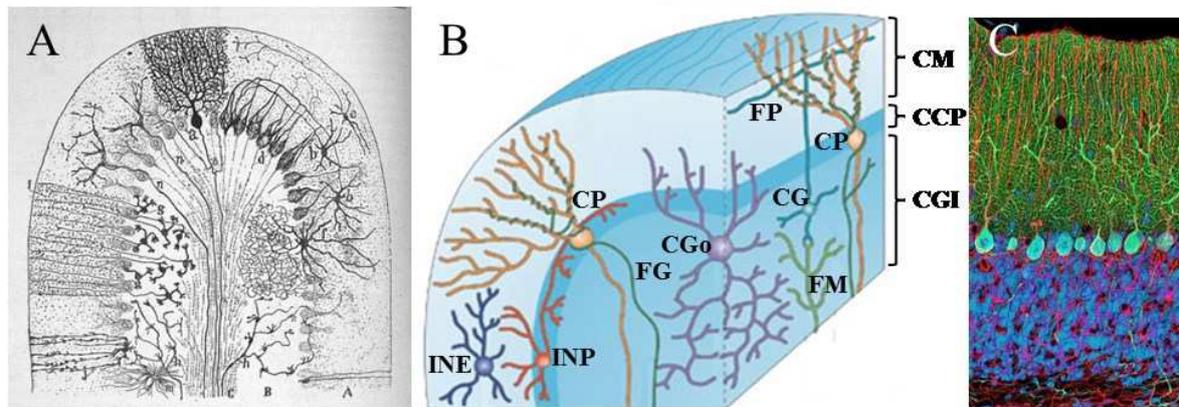


Figure 18 : Cytoarchitecture du cortex cérébelleux.

A. Représentation demi-schématique d'un lobule du cervelet de mammifère présentant la couche moléculaire (A), la couche granulaire (B) et la substance blanche (C) dessinée par Ramón y Cajal (1911) d'après des marquages par la méthode de Golgi.

B. Le cortex cérébelleux est constitué de la couche moléculaire (CM) qui contient les corps cellulaires des interneurons étoilés (INE) et en panier (INP) et l'arbre dendritique des cellules de Purkinje (CP) ; la couche des cellules de Purkinje (CCP) constituée des somas des CP ; et la couche granulaire interne (CGI) constituée des corps cellulaires des cellules de Golgi (CGo) et des cellules granulaires (CG). Les cellules de Purkinje reçoivent des afférences inhibitrices des interneurons étoilés et en panier, et des afférences excitatrices des fibres grimpantes (FG) et des fibres parallèles (FP) qui transmettent la signalisation provenant des fibres moussues (FM) (*adapté de Apps et Garwicz, 2005*).

C. Image en microscopie confocale du cortex cérébelleux représentant les cellules de Purkinje (vert), les glias (rouge) et les noyaux (bleu) (*d'après Schoonover, 2010*).

III.1.2. Les fibres afférentes

Le cortex cérébelleux reçoit trois types d'afférences qui proviennent principalement de régions extracérébelleuses :

- **Les fibres moussues** constituent une population hétérogène de fibres afférentes prenant leur origine dans différents noyaux de la moelle épinière, du tronc cérébral et des noyaux profonds (Palay et Chan-Palay, 1974; Sotelo, 2004; Pijpers et al., 2006). Elles transportent des informations depuis la périphérie et le cortex cérébral. Lorsqu'elles sont issues de régions

extracérébelleuses, les fibres moussues transitent par les pédoncules cérébelleux puis traversent la substance blanche avant de se projeter dans la couche granulaire où elles se terminent en synapses sur les dendrites des cellules granulaires au niveau de structures complexes nommées glomérules (**figure 17B**). La majorité des fibres moussues sont excitatrices et libèrent du glutamate, mais celles qui sont issues des noyaux profonds sont inhibitrices et libèrent du GABA (Kandel et al., 2000).

- **Les fibres grimpantes** sont des ramifications des axones olivaires issus des noyaux de l'olive inférieure dans le tronc cérébral. Ces axones transitent vers le cortex cérébelleux via le pédoncule cérébelleux inférieur et se ramifient de nombreuses fois, notamment dans la substance blanche, pour former des collatérales – les fibres grimpantes – qui établissent des synapses glutamatergiques sur les cellules de Purkinje (**figure 17B**). Chaque cellule de Purkinje n'est innervée que par une seule fibre grimpante qui s'enroule autour de son soma et de ses dendrites proximales, à la manière du « *lierre sur les arbres* », comme l'a noté Ramón y Cajal dans ses observations, pour y établir entre 250 et 300 synapses. Cette relation 1 : 1 est obtenue par la sélection d'une seule fibre grimpante parmi les trois à cinq qui innervent la cellule de Purkinje durant le développement postnatal (cf. § III.2.4.2). À l'inverse, un neurone olivaire contacte plusieurs cellules de Purkinje dans un plan parasagittal étroit grâce aux nombreuses fibres grimpantes qu'il émet. Ces fibres transmettent des informations somatosensorielles et visuelles, ainsi que des informations provenant du cortex cérébral.

- **Les fibres monoaminergiques** présentes dans le cortex cérébelleux sont de deux types : les fibres noradrénergiques et les fibres sérotoninergiques. Elles ne semblent pas transporter d'information au cortex cérébelleux, mais plutôt moduler son niveau d'activité et son mode de fonctionnement (Ito, 2006). Les fibres noradrénergiques proviennent du locus coeruleus et se projettent via le pédoncule cérébelleux supérieur dans le cortex cérébelleux où elles forment des contacts non jonctionnels au niveau des cellules granulaires, des cellules en panier, des cellules étoilées et surtout des cellules de Purkinje. La noradrénaline semble donc exercer sa fonction modulatrice sur les circuits cérébelleux par libération paracrine (Hokfelt et Fuxe, 1969; Abbott et Sotelo, 2000). Des fibres sérotoninergiques provenant des noyaux du raphé ont aussi été mises en évidence dans le cortex cérébelleux. Ces fibres, très fines et variqueuses, transitent par le pédoncule cérébelleux médian et innervent de façon diffuse les noyaux profonds et le cortex cérébelleux, où elles joueraient un rôle modulateur dans la transmission nerveuse entre les interneurons inhibiteurs et les cellules de Purkinje (Hokfelt et Fuxe, 1969; Takeuchi et al., 1982).

III.2. La cellule de Purkinje, un pivot du cortex cérébelleux

Les cellules de Purkinje sont issues de la zone ventriculaire, qui leur donne naissance entre E11 et E13. Elles migrent ensuite le long des fibres de la glie radiaire vers la plaque cérébelleuse où elles s'accumulent sur plusieurs couches et s'organisent en paquets jusqu'au début du développement postnatal (Hatten et Heintz, 1995; Hatten et al., 1997). Peu après la naissance, les paquets se dispersent et les cellules de Purkinje forment une couche monocellulaire.

III.2.1. Différentiation morphologique des cellules de Purkinje

Les cellules de Purkinje sont les plus gros neurones du système nerveux central. Ces cellules, mises en évidence pour la première fois au cours du 19^{ème} siècle par l'anatomiste tchèque Jan Purkyně, sont remarquables par leur forme, que Ramón y Cajal comparait en 1911 à des arbres taillés en espalier (Ramón y Cajal, 1911).

Depuis les travaux de Ramón y Cajal, de nombreuses études ont permis de décrire la différenciation des cellules de Purkinje durant le développement. Notamment, à l'aide de traçages à la peroxydase de Raifort (Horse Radish Peroxydase, HRP) et de la microscopie électronique, Armengol et Sotelo (1991) ont décrit plusieurs stades du développement précoce des cellules de Purkinje de rat *ex vivo* (**figure 19**).

Comme beaucoup de neurones postmitotiques, les cellules de Purkinje acquièrent une morphologie bipolaire facilitant leur migration jusqu'au cortex cérébelleux, entre E14 et E17. Dès E14, elles commencent à exprimer la calbindine (CaBP), une protéine de liaison du calcium, qui est un marqueur moléculaire spécifique des cellules de Purkinje dans le cervelet (Wang et Zoghbi, 2001). Arrivées dans le cortex cérébelleux, les cellules de Purkinje commencent à développer leur axone en direction des noyaux profonds et vestibulaires (Eisenman et al., 1991). Dès E18, elles présentent une morphologie polarisée et développent un long prolongement dendritique (Ramón y Cajal, 1911). Par la suite, elles élaborent des prolongements latéraux émergeant du long prolongement dendritique : elles sont alors au stade « **fusiforme complexe** ». De petites dendrites somatiques s'étendent dans toutes les directions alors que le long prolongement dendritique primaire régresse pour atteindre le stade non polarisé de « **cellule étoilée avec des dendrites non orientées** » (Armengol et Sotelo, 1991). Aux alentours de P5, les cellules de Purkinje présentent des dendrites régressives et atrophiques. Ce stade correspond au début de l'alignement des cellules de Purkinje sur une

seule couche et à la disparition des dendrites basales (Armengol et Sotelo, 1991). Le développement morphologique périnatal des cellules de Purkinje est caractérisé par une importante désynchronisation se traduisant par la présence de neurones aux différents stades dans le cervelet à un âge donné (Armengol et Sotelo, 1991; Sotelo, 2004).

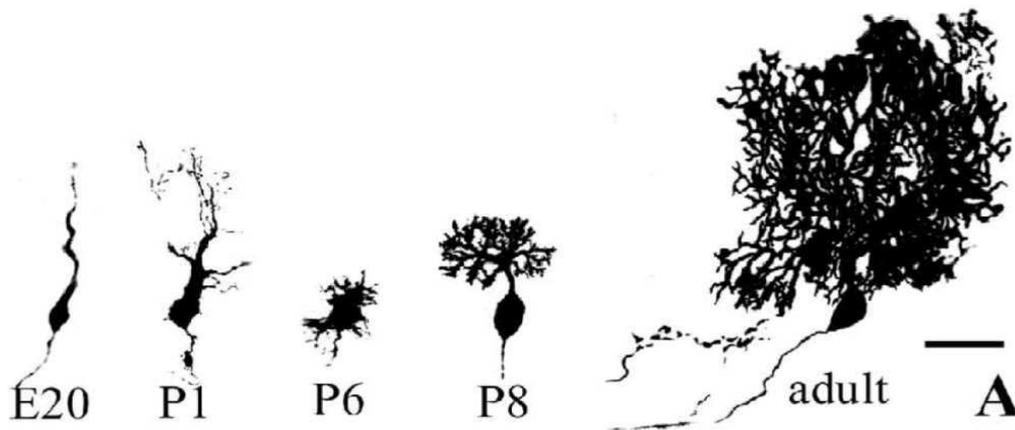


Figure 19 : Différentiation morphologique des cellules de Purkinje.

Chez le rongeur, le remodelage dendritique des cellules de Purkinje est continu de la fin de leur migration vers E18 jusqu'à plusieurs semaines après la naissance (Armengol et Sotelo, 1991).

E20 et P1 : stade « fusiforme complexe » ; P6 : stade de « cellule étoilée avec des dendrites non orientées » ; P8 : stade « d'orientation et d'aplanissement de l'arbre dendritique ».

De la fin de la première semaine postnatale jusqu'à la quatrième semaine environ, le développement des cellules de Purkinje, caractérisé par une élongation dendritique rapide et une synaptogenèse intense, est induit par l'extension de l'axone des cellules granulaires qui forme les premiers contacts sur leurs dendrites. Durant ce stade, dit stade « **d'orientation et d'aplanissement de l'arbre dendritique** » (Ramón y Cajal, 1911), les dendrites croissent et se ramifient rapidement, permettant la génération de l'arborisation dendritique caractéristique des cellules de Purkinje adultes (Hendelman et Aggerwal, 1980).

III.2.2. Les mécanismes moléculaires de la dendritogenèse des cellules de Purkinje

Les premières étapes de la dendritogenèse des cellules de Purkinje sont contrôlées par des facteurs intrinsèques. Des expériences d'infection lentivirale avec un ADNc codant pour le facteur de transcription ROR α sur des tranches de cervelet en culture ont montré que ce récepteur nucléaire joue un rôle important dans la régression des dendrites primitives (Boukhtouche et al., 2006). Des expériences similaires utilisant, cette fois, des ARNi, ont permis de mettre en évidence un autre acteur du développement précoce des cellules de

Purkinje : SCLIP (SCG10-like protein). Cette protéine appartient à la famille des phosphoprotéines stathmines, connues pour leur capacité à séquestrer les monomères de tubuline et à contrôler la dynamique des microtubules. La régulation négative de l'expression de SCLIP par l'expression d'ARNi dans les cellules de Purkinje entraîne une rétraction des dendrites primitives (Poulain et al., 2008). Par ailleurs, les Spectrines, des protéines de haut poids moléculaire composées de deux hétérodimères d' α et de β spectrines (Baines, 2010), forment des complexes quaternaires avec les protéines 4.1, ankyrine et aducine et lient ainsi l'actine pour former un échafaudage sous la membrane plasmique. Ces réseaux semblent être impliqués dans l'élaboration correcte de l'arbre dendritique complexe des cellules de Purkinje. Notamment, la spectrine β -III, localisée dans le soma, les dendrites et les épines des cellules de Purkinje, est nécessaire au développement de ces neurones puisque les souris spectrine β -III^{-/-} présentent d'importantes variations de la morphologie des cellules de Purkinje. Les cellules de Purkinje β -III^{-/-} ont un arbre dendritique simplifié, avec une perte des dendrites distales, un affinement du diamètre de ces dendrites et surtout une perte de leur morphologie plate dans la plan coronal, se traduisant par un nombre important de protrusions dendritiques dans ce plan, comparées aux cellules sauvages (Gao et al., 2011). Ces données confirment ainsi l'importance de l'organisation du cytosquelette d'actine à la périphérie des dendrites.

Le développement dendritique des cellules de Purkinje est aussi contrôlé par certaines hormones. En effet, durant les premiers jours après la naissance, les cellules de Purkinje constituent un site majeur de synthèse des neurostéroïdes dans le SNC : elles synthétisent de la progestérone et des œstradiols à partir du cholestérol. Ces neurostéroïdes régulent la croissance dendritique (Sakamoto et al., 2001, 2003; Tsutsui, 2008), notamment en induisant l'expression de facteurs neurotrophiques comme le BDNF (Haraguchi et al., 2011), qui semble agir indirectement sur la croissance dendritique des cellules de Purkinje en promouvant la survie des cellules granulaires (Hirai et Launey, 2000) et leur interaction avec les cellules de Purkinje (Schwartz et al., 1997; Furutani et al., 2006). Enfin, les hormones thyroïdiennes ont aussi été mises en évidence dans la régulation de la dendritogenèse des cellules de Purkinje. Chez l'homme, la déficience en hormones thyroïdiennes entraîne un retard mental sévère, se traduisant au niveau cellulaire par des anomalies du développement des neurones et notamment des cellules de Purkinje (Vincent et al., 1982). Ainsi, l'hormone triiodothyronine (T3) joue un rôle important dans le développement des dendrites des cellules

de Purkinje en se fixant sur le récepteur TR α 1 exprimé dans ces neurones (Kimura-Kuroda et al., 2002; Heuer et Mason, 2003).

Enfin, la mise en place des premières connexions synaptiques sur les cellules de Purkinje entraîne des variations morphologiques des neurones, régulées en partie par des facteurs extrinsèques. En effet, chez des souris mutantes possédant un cervelet agranulaire, les cellules de Purkinje se développent correctement jusqu'à P7 mais présentent, chez l'adulte, une morphologie atrophiée, avec un nombre réduit d'embranchements (Bradley et Berry, 1978). Par ailleurs, il a été montré qu'en culture, les cellules de Purkinje croissent jusqu'à l'émergence, à la fin de la première semaine, d'une activité électrique qui conduit à l'arrêt de la croissance et à l'initiation des branchements. Le blocage de l'activité électrique par l'application de tétradotoxine empêche la formation des branchements et promeut, au contraire, la croissance dendritique (Schilling et al., 1991). D'autre part, l'application de glutamate associé à du NGF sur des cellules de Purkinje en culture induit une augmentation de la taille de ces neurones et l'élaboration de neurites (Cohen-Cory et al., 1991). Le facteur de libération de la corticotropine (Corticotropine-Releasing Factor, CRF) est un peptide neuromodulateur qui augmente l'effet du glutamate en agissant via des RCPG : les CRF-R (Bishop, 1990; King et Bishop, 2002). Des tranches de cervelet en culture exposées 12 heures par jour au CRF présentent des cellules de Purkinje avec une arborisation dendritique plus complexe et plus étendue. En revanche, l'exposition constante au CRF inhibe la croissance dendritique (Swinny et al., 2004). L'activation des récepteurs AMPA/kainates et mGluR est aussi impliqué dans le développement de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje. En effet, le blocage de ces récepteurs dans des cellules de Purkinje en culture induit une diminution du nombre d'embranchements (Hirai et Launey, 2000). En aval de ces récepteurs, l'activation de la CaMKII entraîne la phosphorylation de la stathmine, inhibant ainsi son action de séquestration des monomères de tubuline et de dépolymérisation des microtubules (Grenningloh et al., 2004; Ohkawa et al., 2007). Ainsi, l'activation de la CaMKII par l'activité synaptique induit indirectement la croissance des dendrites (Tanaka et al., 2006; Ohkawa et al., 2007). La PKC γ , une sérine/thréonine kinase impliquée dans la transduction du signal lors d'une LTP, joue également un rôle dans le contrôle de la dendritogenèse des cellules de Purkinje par l'activité synaptique. En effet, les souris PKC γ ^{-/-} présentent des dysfonctionnements moteurs et une perte de la coordination des mouvements (*i.e.* ataxie). Au niveau cellulaire, l'absence de PKC γ ou son inhibition entraîne une complexification de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje, avec notamment une augmentation du nombre

d'embranchements. À l'inverse, l'activation de cette kinase par des agonistes induit une inhibition de la différenciation dendritique (Metzger et Kapfhammer, 2000; Schrenk et al., 2002).

III.2.3. La spinogénèse des cellules de Purkinje

Le développement des épines dendritiques des cellules de Purkinje semble dépendre de deux processus différents selon leur localisation et, de fait, le type d'afférence excitatrice reçue. Tout d'abord, l'observation des souris mutantes *weaver* et *reeler*, dont la caractéristique commune est le développement de cellules de Purkinje en l'absence de cellules granulaires, a permis de mettre en évidence que, malgré des défauts importants dans le développement de leur arborisation dendritique, ces neurones présentent une densité d'épines dendritiques normale dans la partie distale, indiquant l'existence de processus autonomes pour la spinogénèse dans cette zone (Rakic et Sidman, 1973; Mariani et al., 1977). De plus, ces épines, libres de terminaisons présynaptiques, présentent des récepteurs spécifiques de la synapse fibres parallèles/cellules de Purkinje comme le récepteur ionotropique GluR δ 2 ou le récepteur métabotrope mGluR1 (Ryo et al., 1993; Takayama et al., 1997). À l'inverse, les épines situées dans la partie proximale de l'arborisation des cellules de Purkinje semblent être régulées par l'activité des fibres grimpantes. En effet, l'analyse de cellules de Purkinje dépourvues de fibre grimpante a montré une augmentation de la densité d'épines proximales et une modification de leur morphologie (Sotelo et al., 1975). De plus, des expériences de blocage de l'activité synaptique excitatrice *in vivo* ont confirmé le rôle des fibres grimpantes dans le contrôle de la densité des épines dendritiques proximales (Bravin et al., 1999). L'étude de souris délétées de la sous-unité α 1 du récepteur GABA_A (α 1^{0/0}) a par ailleurs suggéré le rôle des synapses inhibitrices dans la formation des épines dendritiques des cellules de Purkinje. En effet, chez les souris α 1^{0/0}, ces neurones présentent des synapses hétérologues composées d'une terminaison présynaptique inhibitrice et d'une épine postsynaptique pourvue d'une PSD caractéristique des synapses excitatrices. Ces épines présentent à leur surface des récepteurs GluR δ 2, confirmant le développement autonome des épines distales ; mais elles sont en revanche dépourvues de sous-unité GluR2/3 des récepteurs de type AMPA (Fritschy et al., 2006). Par la suite, des travaux réalisés sur des neurones d'hippocampe en culture ont étayé l'hypothèse du rôle des synapses inhibitrices sur le développement des épines. En effet, l'expression d'une forme mutée de la sous-unité β 3 du récepteur GABA_A dans ces neurones induit une diminution du nombre d'épines matures et une augmentation du nombre de filopodes à la surface des dendrites (Jacob et al., 2009). Le développement des épines

dendritiques des cellules de Purkinje est aussi régulé par les neurostéroïdes. En effet, l'injection intracérébelleuse d'œstradiol ou de progestérone chez des rats nouveau-nés entraîne une augmentation du nombre d'épines dendritiques. Notamment, l'injection de progestérone induit l'apparition d'épines sur l'axone des cellules de Purkinje (Sakamoto et al., 2001, 2003; Tsutsui, 2008). De même, la protéine d'interaction à l'actine spectrine β -III est impliquée dans la formation des épines dendritiques sur les cellules de Purkinje, puisque les souris β -III^{-/-} présentent une réduction de 80% de la densité des épines à la surface de ces neurones, comparées aux souris sauvages (Gao et al., 2011).

III.2.4. La mise en place des connexions synaptiques des cellules de Purkinje

Dans cette partie, nous centrerons notre attention sur l'innervation des cellules de Purkinje, seuls neurones du cortex cérébelleux émetteurs de signaux vers l'extérieur du cervelet.

III.2.4.1 Innervations inhibitrices des cellules de Purkinje par les interneurones

Les progéniteurs des interneurones de la couche moléculaire – *i.e.* les cellules étoilées et les cellules en panier – naissent dans la zone ventriculaire durant les quinze premiers jours après la naissance (P1-P15) (Hallonet et al., 1990; Zhang et Goldman, 1996). Ils migrent dans le cortex cérébelleux sous la forme de cellules unipolaires jusqu'à leur arrivée dans la couche moléculaire (Zhang et Goldman, 1996). Une série de transformations morphologiques durant les troisième et quatrième semaines permet ensuite la formation d'interneurones matures : les cellules étoilées et les cellules en panier (Zhang et Goldman, 1996; Ango et al., 2008). Cependant, si ces deux types d'interneurones semblent provenir d'un pool commun de progéniteurs, leur localisation dans la couche moléculaire, les domaines subcellulaires des cellules de Purkinje qu'ils innervent ainsi que les mécanismes moléculaires régulant leur synaptogenèse diffèrent.

- Les cellules en panier innervent les cellules de Purkinje sur le segment initial de l'axone

Les cellules en panier rejoignent la couche moléculaire environ un jour avant les cellules étoilées et sont considérées comme étant les premières fibres GABAergiques à contacter les cellules de Purkinje (Ango et al., 2004; Sotelo, 2008). L'étude de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein, GFP) sous le contrôle du promoteur de l'enzyme de synthèse du GABA, la décarboxylase de l'acide glutamique (Glutamic Acid Decarboxylase, GAD67), a permis à Ango et ses collaborateurs

d'observer que les cellules en panier traversent la couche des cellules de Purkinje entre P7 et P9. Dès P8, elles commencent à étendre leurs axones horizontalement, au-dessus de cette dernière (Ango et al., 2004). Les cellules en panier étendent ensuite des branches descendantes qui forment leurs premiers contacts synaptiques sur le corps cellulaire des cellules de Purkinje. Les axones forment alors des boutons *en passant* sur le soma et la base de l'axone des cellules de Purkinje (Ango et al., 2004; Sotelo, 2008). Entre P9 et P15, les interneurones en panier développent de multiples branches qui entourent le segment initial de l'axone (Axon Initial Segment, AIS) des cellules de Purkinje, formant une structure que Ramón y Cajal avait dénommée *pinceau* (**figure 20** ; Ramón y Cajal, 1911; Ango et al., 2004; Sotelo, 2008).

Le guidage des axones des cellules en panier vers celui des cellules de Purkinje est contrôlé par un gradient de concentration d'un variant d'épissage de la neurofascine (NF186). La neurofascine est une glycoprotéine située à la surface cellulaire et impliquée dans des interactions axone-axone *in vitro* (Rathjen et al., 1987). Elle émane de l'AIS vers le soma et les dendrites durant le processus de guidage (Ango et al., 2004) et est recrutée à la membrane des cellules de Purkinje par une liaison de haute affinité avec l'ankyrineG, un adaptateur membranaire, et son partenaire intracellulaire, la spectrine $\beta 4$ (Ango et al., 2004). L'ankyrineG est restreinte à l'AIS des cellules de Purkinje, suggérant l'existence de deux formes de NF186 : une forme se liant et une forme ne se liant pas à l'ankyrineG.

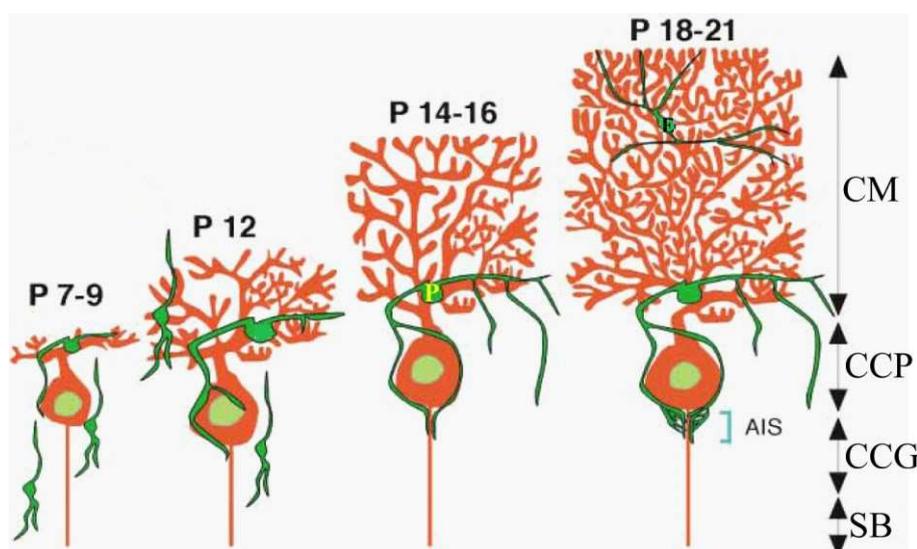


Figure 20 : Mise en place de l'innervation inhibitrice des interneurones en panier. Schéma représentant l'arrivée dans la couche moléculaire (CM) des interneurones et la formation de la synapse en pinceau des cellules en panier (P) sur le segment initial de l'axone

(AIS) des cellules de Purkinje. Une cellule étoilée (E) est aussi représentée à P18-21 (*d'après* Ango et al., 2004).

- Les cellules étoilées contactent les dendrites des cellules de Purkinje à l'aide des glies de Bergmann

Les cellules étoilées pénètrent dans la couche moléculaire après les interneurons en panier, entre P8 et P14 (Zhang et Goldman, 1996; Ango et al., 2008), et se répartissent dans sa moitié supérieure (Palay et Chan-Palay, 1974). Ce sont d'ailleurs les seuls neurones ayant leur soma dans le tiers distal de la couche moléculaire (Ramón y Cajal, 1911; Palay et Chan-Palay, 1974). Au moment de leur entrée dans la couche moléculaire, les cellules étoilées ont une forme bipolaire et étendent des neurites horizontales (*i.e.* parallèles à la surface piaie). Entre P16 et P18, elles développent des collatérales ascendantes et descendantes qui innervent des segments de dendrites de cellules de Purkinje, sans pour autant croître autour comme le font les fibres grimpantes (cf. § III.2.4.2). Une étude a montré que ces collatérales forment des contacts de type *en passant* le long des cellules de Purkinje, guidées par les glies de Bergmann qui s'enroulent autour des dendrites des cellules de Purkinje (**figure 21** ; Ango et al., 2008).

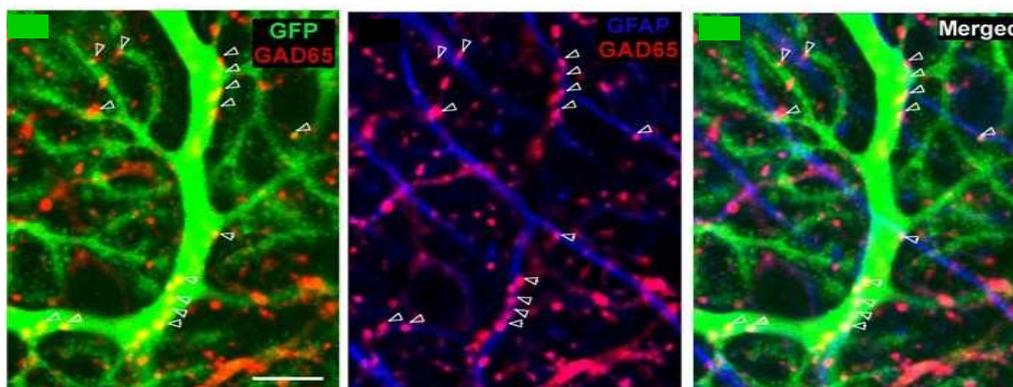


Figure 21 : Les glies de Bergmann servent de support aux axones des interneurons étoilés.

Les synapses en passant des cellules étoilées (rouge) sur la cellule de Purkinje (verte) sont guidées par les glies de Bergmann (bleues) (*d'après* Ango et al., 2008).

Ce guidage est contrôlé par une protéine de la famille des immunoglobulines d'adhésion cellulaire de type L1 : Close Homologue of L1 (CHL1) (Ango et al., 2008). En effet, CHL1, connue pour induire la croissance des neurites *in vitro* via des interactions hétéro- et homophiliques (Huang et al., 2007), est fortement exprimée dans les glies de Bergmann et dans les interneurons étoilés durant le développement de leur axone. L'étude de souris dont

le gène codant pour CHL1 a été invalidé spécifiquement dans les glies de Bergmann a révélé que la présence de cette protéine dans les fibres gliales contribue au développement de l'innervation synaptique des cellules étoilées sur les cellules de Purkinje (Ango et al., 2008). Toutefois, la comparaison du phénotype de ces animaux avec celui de souris CHL1^{-/-} semble indiquer que l'expression de CHL1 dans les autres types cellulaires, et notamment dans les cellules étoilées, joue aussi un rôle important dans ce processus. Cela suggère une possible interaction homophile des CHL1 présentes à la surface des glies et des interneurons qui permettrait ainsi le guidage des axones de ces derniers (Huang et al., 2007; Ango et al., 2008).

III.2.4.2 Innervations excitatrices des cellules de Purkinje

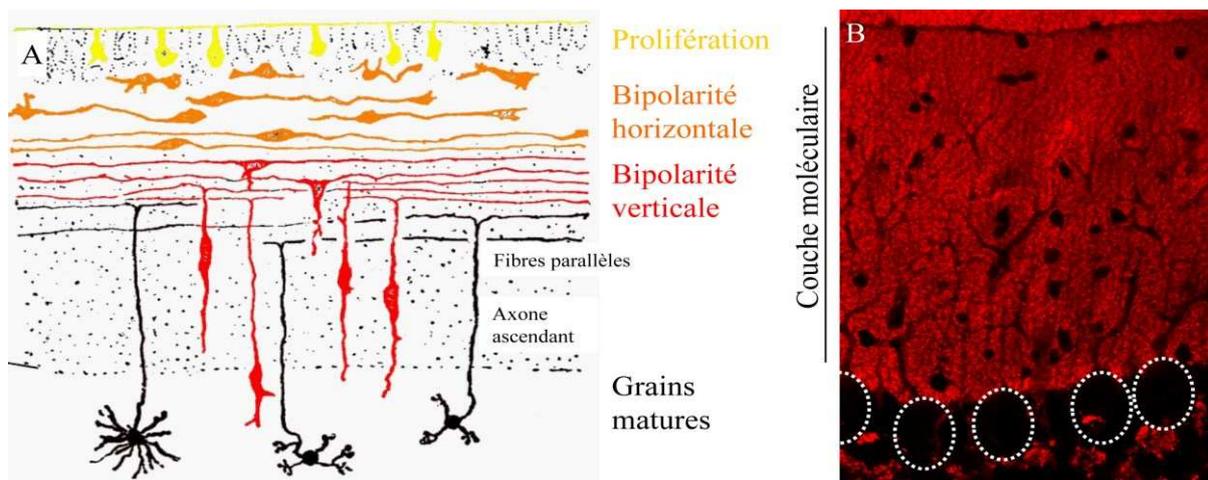
Les cellules de Purkinje reçoivent, sur deux compartiments dendritiques différents, deux types d'afférences excitatrices distinctes par leur origine neuronale, leur mode de connexion et la robustesse de leurs synapses.

- Innervation des cellules de Purkinje par la voie fibres moussues - fibres parallèles

Les fibres moussues, issues des nerfs périphériques, de la moelle épinière ou encore du tronc cérébral, transfèrent une grande quantité d'informations motrices et sensorielles aux cellules de Purkinje par le relai des cellules granulaires (Mason et Gregory, 1984; Hatten et Heintz, 1995; Watanabe, 2008).

Les cellules granulaires sont les seuls neurones issus de l'EGL (Hallonet et al., 1990; Hallonet et Le Douarin, 1993). À partir d'E10, les progéniteurs des lèvres rhombiques commencent à proliférer. Ces précurseurs des grains en division « ruissèlent » rostralement pour recouvrir la zone superficielle de l'ébauche cérébelleuse et y établir une zone germinale déplacée : la couche granulaire externe (EGL). À E15, la majeure partie du cervelet est recouverte. La prolifération continue des cellules de l'EGL génère un pool important de précurseurs. L'EGL passe alors d'une couche monocellulaire à une couche de 7 à 8 cellules d'épaisseur. Durant la période périnatale, l'EGL se divise en deux zones : une zone externe de prolifération, et une zone interne prémigratoire. Les progéniteurs postmitotiques des grains s'enfoncent dans la zone prémigratoire où ils commencent leur différenciation (**figure 22**). Là, les grains entrent dans la **Phase de la bipolarité horizontale** (Ramón y Cajal, 1911) et commencent à étendre des processus horizontaux, parallèles à la surface piaie en développement, ce qui entraîne un aplatissement du corps cellulaire orienté selon l'extension des processus. Les cellules granulaires continuent leur développement lors de deux autres

phases décrites par Ramón y Cajal : la **Phase bipolaire verticale**, durant laquelle les grains développent une large protrusion verticale qui « s'arrime » aux fibres radiales des glies de Bergmann et commencent à migrer dans la couche moléculaire. Le corps cellulaire des grains migre le long des glies de Bergmann grâce à l'expression de la glycoprotéine neuronale astrotactine, qui présente des répétitions EGF et des domaines fibronectine de type III dont le rôle dans l'adhésion cellulaire est bien connu (Hatten, 1990). Les deux processus horizontaux restent, eux, dans la couche moléculaire et sont reliés au soma des cellules granulaires par un prolongement vertical, leur donnant la forme caractéristique d'un « T ». Cette structure forme les fibres parallèles. Dès P6, les fibres parallèles forment des synapses fonctionnelles sur les cellules de Purkinje en développement (Scelfo et Strata, 2005). Durant cette phase, les fibres moussues s'étendent jusque dans la couche moléculaire en développement pour venir contacter les grains en migration (Mason et Gregory, 1984; Hatten et Heintz, 1995). Et la **Phase des grains profonds ou jeunes** : les grains terminent leur migration en passant la couche des cellules de Purkinje pour atteindre leur destination finale, la couche granulaire interne. La protrusion verticale développée au début de la migration disparaît progressivement, et le soma, redevenu rond, se couvre de fines et longues dendrites qui



viennent entourer les terminaisons axonales des fibres moussues au niveau de structures nommées glomérules (Ramón y Cajal, 1911).

Figure 22 : Développement des grains et innervation des cellules de Purkinje.

A. Les grains prolifèrent dans l'EGL externe puis s'enfoncent dans l'EGL interne et développent des neurites horizontaux lors de la phase de « bipolarité horizontale ». Ils migrent ensuite le long des glies de Bergmann durant la phase de « bipolarité verticale » pour arriver dans la couche granulaire interne (*d'après* Ramón y Cajal, 1911).

B. Les synapses formées par les fibres parallèles sur les cellules de Purkinje (soma délimité par les pointillés blancs) sont marquées avec un anticorps dirigé contre le transporteur vésiculaire du glutamate 1 (VGluT1).

Les fibres parallèles continuent de croître dans la couche moléculaire pour atteindre quatre à six millimètres de long chez l'adulte (d'un bout à l'autre de la barre horizontale du T), perpendiculairement au plan des cellules de Purkinje (Palay et Chan-Palay, 1974; Ito, 2006; Watanabe, 2008). Dans leur trajet, les fibres parallèles traversent l'arbre dendritique de près de 450 cellules de Purkinje, mais elles ne forment que très peu de synapses – parfois une seule – sur chacun d'entre eux, au niveau des épines dendritiques des dendrites distales (Ito, 2006). Dès lors, la « robustesse » des contacts réalisés par chacune des fibres parallèles contactant une cellule de Purkinje est faible : 50 cellules granulaires activées simultanément sont requises pour générer un potentiel d'action (Palay et Chan-Palay, 1974; Watanabe et Kano, 2011). Cependant, chez l'adulte, une cellule de Purkinje peut être contactée par près de 2.10^5 fibres parallèles, soit 90% des synapses reçues par ces neurones (Sotelo, 1990).

- Innervation des cellules de Purkinje par les fibres grimpanes

Le développement des fibres grimpanes, qui prolongent les axones des neurones de l'olive inférieure dans le cortex cérébelleux, est concomitant avec le développement du cortex cérébelleux. Comme les cellules de Purkinje, les neurones de l'olive inférieure sont générés au niveau de l'épithélium germinatif ventriculaire du tube neural entre E12 et E13 et migrent ensuite vers la partie ventrale du bulbe (Bourrat et Sotelo, 1988, 1991). Durant leur migration, les neurones olivaires développent leurs axones qui croissent au travers de la plaque du plancher en direction de l'hémicervelet contralatéral (Bourrat et Sotelo, 1988). Dès E17, les axones olivaires envahissent la plaque cérébelleuse et s'organisent en faisceaux distribués en bandes parasagittales (Chedotal et Sotelo, 1992, 1993; Wassef et al., 1992). Les premiers contacts entre les fibres grimpanes et les cellules de Purkinje apparaissent dès la fin de l'embryogenèse (E19) sur les prolongements dendritiques primaires des cellules de Purkinje au stade fusiforme complexe (cf. § III.2.1.) (Morara et al., 2001). Ce stade, qui s'étend de E19 à P5 est appelé « **stade rampant** » (Chedotal et Sotelo, 1993).

Après la naissance, ces premières interactions sont remaniées lors de trois stades développementaux majeurs : le **Stade du nid péricellulaire**, à partir de P5, lors duquel les dendrites somatiques des cellules de Purkinje régressent ; les fibres grimpanes s'enroulent alors autour de leur soma et forment des synapses sur des protrusions périsomatiques. Les cellules de Purkinje, qui ont une morphologie étoilée (Armengol et Sotelo, 1991), reçoivent à ce moment des innervations provenant de plusieurs fibres grimpanes. Cette multi-innervation

atteint un pic à P5 avec une moyenne de 3,5 fibres grimpantes par cellules de Purkinje (Mariani et Changeux, 1981a, 1981b) ; le **Stade capuchon** : vers P8-P9, les terminaisons des fibres grimpantes se transloquent sur la partie apicale du soma et terminent sur le tronc principal de l'arbre dendritique en formation des cellules de Purkinje (Ramón y Cajal, 1911). La multi-innervation régresse alors de 50% ; le **Stade de jeune fibre grimpante** : entre P10 et P15, les protrusions somatiques disparaissent totalement de la surface des cellules de Purkinje. Les terminaisons des fibres grimpantes quittent donc définitivement le soma pour « grimper » le long des branches principales de l'arbre dendritique et s'y stabiliser (**figure 23**). La relation 1 : 1 retrouvée chez l'adulte est atteinte à ce stade (Mariani et Changeux, 1981a, 1981b).

Les cellules de Purkinje sont donc mono-innervées par les fibres grimpantes chez l'adulte. Mais, à la différence des fibres parallèles qui forment très peu de synapses sur chaque neurone cible, les fibres grimpantes réalisent 250 à 300 contacts synaptiques le long de l'arbre dendritique proximal de la cellule de Purkinje innervée. La connexion entre les fibres grimpantes et les cellules de Purkinje constitue dès lors l'une des connexions excitatrices les plus robustes du SNC, et l'activation des cellules de Purkinje par les fibres grimpantes, suivie de l'activation par les fibres parallèles, entraîne une dépression à long terme (Long-Term Depression, LTD), une forme de plasticité synaptique que l'on pense être à la base de l'apprentissage moteur dans le cervelet (Watanabe, 2008). Cependant, de récents travaux remettent en question l'implication de la LTD des fibres parallèles dans ce processus (Schonewille et al., 2011). Le développement des fibres grimpantes et leur translocation du soma vers les dendrites proximales des cellules de Purkinje est concomitant avec l'arrivée des axones des cellules en panier à ce niveau (Sotelo, 2008). Des études réalisées chez la souris ont récemment permis à Ichikawa et ses collaborateurs de mettre en évidence un changement graduel entre P12 et P20 de l'innervation somatique des cellules de Purkinje, qui présentent 63% de synapses glutamatergiques (fibres grimpantes) à P12, 6% à P15 et moins de 1% à P20, alors que les synapses GABAergiques (cellules en panier) atteignent 88% de l'innervation totale du soma à P20 (Ichikawa et al., 2011).

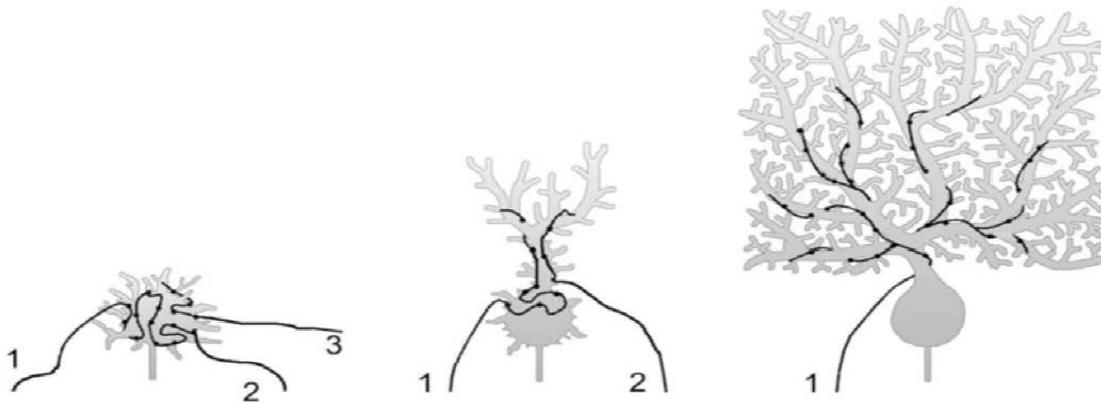


Figure 23 : Représentation schématique de la mise en place de l'innervation des fibres grimpantes sur les cellules de Purkinje.

La synaptogenèse fibres grimpantes/cellules de Purkinje est caractérisée par une multi-innervation transitoire et la translocation des terminaisons des fibres grimpantes du soma vers l'arbre dendritique en développement des cellules de Purkinje (*d'après* Letellier et al., 2007).

III.2.4.3 Compétition pour le territoire d'innervation entre les fibres parallèles et les fibres grimpantes

La distribution des fibres parallèles et des fibres grimpantes sur des régions distinctes de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje (*i.e.* les épines dendritiques distales et proximales, respectivement) résulte d'une compétition entre ces deux afférences excitatrices qui débute dès le développement et est maintenue chez l'adulte (Sotelo, 1990; Scelfo et Strata, 2005; Watanabe, 2008). Cette compétition a été mise en évidence à la fin des années 1970 par l'étude électrophysiologique de la mise en place de la mono-innervation des cellules de Purkinje par les fibres grimpantes sur les souris mutantes agranulaires *weaver* et *reeler*. Ces études ont montré que les cellules de Purkinje, privées de leur innervation par les fibres parallèles, conservent une multi-innervation par les fibres grimpantes (Crepel et Mariani, 1976; Mariani et al., 1977; Crepel et al., 1981; Sotelo, 1990). Notamment, Crepel et ses collaborateurs ont montré que la régression de la multi-innervation par les fibres grimpantes accélère à partir de P8 et du développement des synapses fibres parallèles/cellules de Purkinje (Crepel et al., 1981), et une étude électrophysiologique plus récente suggère qu'il n'existerait pas de régression « fibres parallèles-indépendante » (Scelfo et Strata, 2005).

L'existence de mécanismes moléculaires alimentant la compétition entre les fibres parallèles et les fibres grimpantes pour leur territoire d'innervation sur les cellules de Purkinje a été mise en évidence par les travaux du Pr. Watanabe et de ses collaborateurs. En effet, deux

phénotypes majeurs reflétant cette compétition ont été observés chez des souris génétiquement modifiées – invalidées – pour des molécules impliquées dans la synaptogenèse et le fonctionnement des synapses des fibres parallèles et grimpantes (Watanabe, 2008; Watanabe et Kano, 2011).

Le premier phénotype est caractérisé par la présence, dans la partie distale de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje, de nombreuses épines dépourvues de terminaisons présynaptiques, indiquant un défaut dans la formation des synapses fibres parallèles/cellules de Purkinje (Guastavino et al., 1990; Ichikawa et al., 2002; Miyazaki et al., 2010). Ce déficit d'innervation se traduit par une augmentation du territoire d'innervation des fibres grimpantes vers la surface piaie (Ichikawa et al., 2002; Miyazaki et al., 2010). Ce phénotype a été observé chez les souris invalidées pour le gène codant le récepteur **GluR δ 2** – et les mutants naturels *hotfoot* – et celles invalidées pour le gène codant la **cérébelline 1** (Cbln1 ; **figure 25 gauche**). Le récepteur GluR δ 2 est un membre de la famille des récepteurs ionotropiques au glutamate spécifiquement exprimé dans les cellules de Purkinje, et localisé dans les épines contactant les fibres parallèles chez l'adulte. GluR δ 2 ne fonctionnerait pas comme un canal ionique glutamate-dépendant (Hirai et al., 2005), mais il joue un rôle important dans la formation et le maintien des synapses fibres parallèles/cellules de Purkinje (Takeuchi et al., 2005). La Cbln1 est une protéine soluble appartenant à la superfamille des protéines du complément C1q. Elle joue un rôle essentiel dans la mise en place de synapses fibres parallèles/cellules de Purkinje fonctionnelles (Hirai et al., 2005) en agissant comme ligand du récepteur postsynaptique GluR δ 2 (Matsuda et al., 2010; Matsuda et Yuzaki, 2010). De plus, une récente étude utilisant un modèle artificiel de formation de synapses *in vitro* a montré que la Cbln1 sert d'intermédiaire dans un complexe synaptique bidirectionnel formé par le récepteur postsynaptique GluR δ 2 et la protéine présynaptique neurexine 1 β (NRX1 β) pourvue de l'insert d'épissage 4 (Matsuda et Yuzaki, 2011). Les NRX sont des molécules d'adhésion transynaptiques bien caractérisées. Elles sont constituées d'une longue sous-unité α et d'une sous-unité β courte présentant différents variants d'épissage (*pour revue voir* Craig et Kang, 2007; Südhof, 2008). Le complexe NRX1 β /Cbln1/GluR δ 2 ainsi formé, dont chaque partenaire peut être régulé à plusieurs niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, pourrait jouer un rôle important dans les variations structurelles des synapses fibres parallèles/cellules de Purkinje observées lors de l'activité synaptique (Matsuda et Yuzaki, 2011).

Le second phénotype est inverse du premier : les dendrites proximales des cellules de Purkinje présentent une densité anormalement élevée d'épines, majoritairement innervées par les fibres parallèles, indiquant une extension du territoire d'innervation de ces dernières vers la partie basale de la couche moléculaire (Miyazaki et al., 2004). Parallèlement, le territoire d'innervation des fibres grimpantes est diminué et la multi-innervation est conservée chez l'adulte (Miyazaki et al., 2004; Hashimoto et al., 2011). Ce phénotype est retrouvé dans les souris délétées de la partie du gène codant pour la sous-unité $\alpha 1A$ ($\alpha 1A^{-/-}$) du canal calcique voltage-dépendant **Ca_v2.1** (**figure 25 droite** ; Miyazaki et al., 2004; Hashimoto et al., 2011). Ce canal est particulièrement abondant dans les cellules de Purkinje (Stea et al., 1994), où il permet l'entrée de Ca^{2+} à la suite des fortes dépolarisations provoquées par l'activité des fibres grimpantes (Kano et al., 1992). Ce phénotype est aussi induit par la délétion du gène codant pour la kinase d'adhésion focale **FAK** (Focal Adhesion Kinase) spécifiquement dans les cellules de Purkinje (**figure 25 droite** ; Watanabe et al., 2008). Cette protéine tyrosine kinase, présente dans plusieurs types cellulaires dans le cortex cérébelleux (*i.e.* cellules de Purkinje, glies de Bergmann, terminaisons axonales des fibres parallèles et des fibres grimpantes), est impliquée dans la morphogenèse dendritique, le branchement axonal et la formation des synapses.

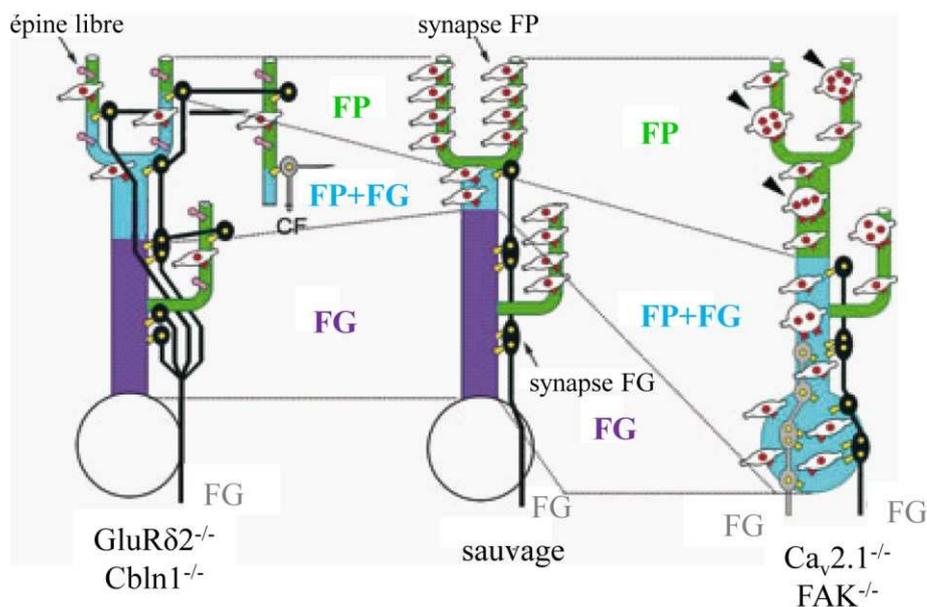


Figure 24 : Schéma résumant les mécanismes moléculaires alimentant la compétition synaptique entre les fibres parallèles et les fibres grimpantes pour leur territoire d'innervation sur les cellules de Purkinje.

(d'après Miyazaki et Watanabe, 2011).

Objectifs de la thèse

La dendritogenèse et la spinogenèse sont des étapes clés dans le développement du cerveau et la mise en place d'un réseau neuronal fonctionnel. Des défauts dans les processus contrôlant ces deux étapes peuvent engendrer des malformations neuronales impliquées dans l'apparition de maladies neurodéveloppementales comme l'autisme ou la schizophrénie. La dendritogenèse et la spinogenèse sont régulées par un grand nombre de mécanismes moléculaires dont la majeure partie permet la réorganisation du cytosquelette d'actine contrôlée par les RhoGTPases. Les protéines du complexe ELMO1/Dock180 activateur de Rac1 ont récemment été impliquées dans ces mécanismes, mais les protéines transmembranaires et extracellulaires en amont de ce GEF non conventionnel restent à l'heure actuelle peu connues.

Les RCPG constituent l'une des plus grandes familles de récepteurs transmembranaires, et leur implication dans un très grand panel de processus physiologiques fait de ces récepteurs l'une des cibles majeures des molécules thérapeutiques commercialisées et en développement. Parmi eux, les RCPG d'Adhésion forment un ensemble de 33 récepteurs caractérisés par un long domaine N-terminal pourvu de motifs impliqués dans des processus d'adhésion et de reconnaissance. La plupart des RCPG d'Adhésion sont exprimés dans le SNC et certains d'entre eux ont été impliqués dans son développement. Les récepteurs BAI, appartenant à la famille des RCPG d'Adhésion, ont, au départ, été identifiés pour leurs rôles dans l'angiogenèse et la tumorigenèse. Cependant, ces récepteurs présentent de nombreuses caractéristiques suggérant un rôle important dans le développement du SNC.

Tout d'abord, les récepteurs BAI sont fortement exprimés dans le cerveau dès les premiers jours après la naissance. Des expériences d'hybridation *in situ* ont notamment montré que le récepteur BAI3 est fortement exprimé dans l'hippocampe et les cellules de Purkinje. Bien qu'ils aient été identifiés dans des préparations de densités postsynaptiques, il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée sur la localisation protéique de ces récepteurs dans le cerveau, et notamment leur localisation subcellulaire dans les neurones. **Le premier objectif de ma thèse a donc été de déterminer l'expression protéique du récepteur BAI3 dans le cerveau et sa répartition dans les neurones.**

Par ailleurs, des SNP dans le gène codant BAI3 ont été liés à certains symptômes de la schizophrénie. Cette maladie neurodéveloppementale est caractérisée, du point de vue

cellulaire, par une malformation des neurones et une diminution de la densité des épines dendritiques, suggérant des défauts dans les mécanismes moléculaires régulant la dendritogenèse et la spinogenèse chez les patients atteints. De plus, une interaction du récepteur BAI3 avec les protéines solubles C1ql de la famille des protéines du complément a récemment été mise en évidence, et suggère l'implication du récepteur BAI3 dans la synaptogenèse. **Le deuxième objectif de ma thèse a consisté à déterminer le rôle du récepteur BAI3 dans le développement des neurones et dans la formation d'un réseau neuronal fonctionnel.**

Enfin, la RhoGTPase Rac1 joue un rôle déterminant dans le développement des neurones en régulant le cytosquelette d'actine au cours de la dendritogenèse et de la spinogenèse. Des études ont montré que le récepteur BAI1 régule Rac1 via le complexe ELMO1/Dock180 dans des processus de phagocytose. Pour cela, ELMO1 interagit avec le motif RKR présent dans la queue cytoplasmique du récepteur et conservé dans BAI3. **Le troisième objectif de ma thèse a donc été de déterminer la voie de signalisation du récepteur BAI3, et plus particulièrement de vérifier la possibilité qu'il interagisse aussi avec ELMO1 et régule Rac1.**

Résultats expérimentaux

I. Le RCPG d'Adhésion BAI3 régule la morphogenèse des neurones via la voie de signalisation ELMO1/Dock180/Rac1 *in vitro*

Dans cette première étude, nous nous sommes intéressées à la fonction du récepteur BAI3 à l'échelle cellulaire. Nous avons utilisé des modèles de cellules hétérologues et de neurones en culture afin de déterminer la localisation subcellulaire, le rôle et la voie de signalisation de BAI3.

Dans un premier temps, nous avons étudié la localisation du récepteur BAI3 sauvage dans des cellules hétérologues transfectées. Nos résultats montrent que la protéine BAI3 est localisée dans des protrusions cellulaires riches en actine, comme les filopodes et les lamellipodes. Dans des neurones d'hippocampe en culture transfectés, nous avons observé à 5 jours de culture *in vitro* (DIV5) la localisation de BAI3 au niveau membranaire le long des dendrites en croissance. Dans ces neurones, BAI3 est également colocalisé avec le cytosquelette d'actine révélé par de la phalloïdine fluorescente.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le rôle du récepteur BAI3 au cours du développement neuronal précoce en quantifiant les effets de la surexpression du récepteur BAI3 sauvage sur l'arborisation dendritique des neurones d'hippocampe. Nos résultats montrent une augmentation de la longueur totale des dendrites et du nombre de dendrites distales, et donc un rôle pour le RCPG d'Adhésion BAI3 dans la morphogenèse dendritique *in vitro*.

Afin de déterminer la voie de signalisation du récepteur BAI3, nous avons réalisé des expériences biochimiques et morphométriques *in vitro* sur des cellules hétérologues. Nous avons montré que BAI3 interagit avec la protéine cytoplasmique ELMO1 au niveau du motif RKR situé dans la queue cytoplasmique du récepteur. Cette interaction pourrait réguler l'activité des RhoGTPases puisque l'expression du récepteur BAI3 sauvage dans les cellules hétérologues modifie leur capacité d'étalement. En parallèle, nous avons mis en évidence l'expression de la protéine ELMO1 dès P3 dans les cellules de Purkinje, suggérant ainsi une possible interaction des deux partenaires *in vivo*.

Enfin, pour analyser le rôle de l'interaction BAI3/ELMO1 dans le contrôle de la morphogenèse dendritique, nous avons généré des formes modifiées de BAI3 au niveau de sa

queue C-terminale. L'une de ces formes est mutée au niveau du motif RKR, qui a été remplacé par AAA (BAI3-WT-A) afin d'empêcher la liaison d'ELMO1. Deux autres formes sont couplées à la GFP : l'une est une forme entière de BAI3 avec une GFP insérée dans sa queue C-terminale (BAI3-FLT) ; dans la seconde, la GFP remplace la queue cytoplasmique du récepteur (BAI3-EMT ; **figure 25**). Des expériences biochimiques et immunocytochimiques dans des cellules hétérologues ont permis de confirmer l'abolition de l'interaction d'ELMO1 avec BAI3 pour les constructions BAI3-WT-A et BAI3-EMT, et une diminution de cette interaction pour BAI3-FLT. L'expression de l'une ou l'autre de ces constructions dans des neurones d'hippocampe en culture et dans des cellules hétérologues diminue ou abolit les effets observés avec BAI3-WT sur la morphogenèse dendritique.

Les résultats obtenus au cours de notre étude démontrent pour la première fois le rôle du récepteur BAI3 dans la régulation de la morphogenèse dendritique des neurones *in vitro*, en partie via son interaction avec la protéine cytoplasmique ELMO1. ELMO1 appartient au complexe ELMO1/Dock180 activateur de la RhoGTPase Rac1. Les expériences d'étalement cellulaire et la forte colocalisation de la protéine BAI3 avec le cytosquelette d'actine suggèrent une nouvelle voie de signalisation BAI3/ELMO1/Dock180/Rac1 capable de réguler le cytosquelette d'actine et ainsi la morphogenèse dendritique.

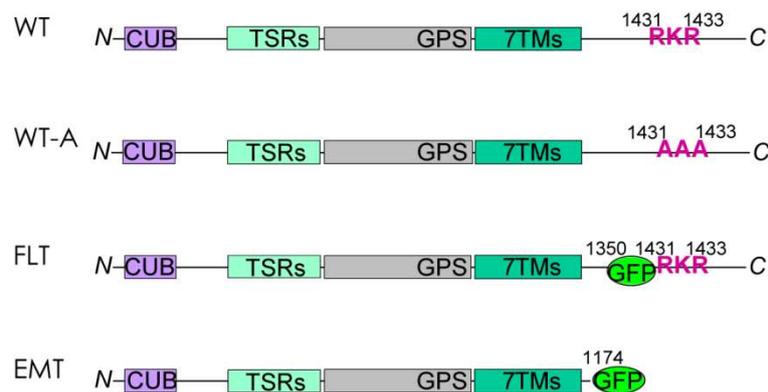


Figure 25 : Schéma des différentes constructions de BAI3.

I.1. Article en préparation

The adhesion-GPCR BAI3, a candidate gene for schizophrenia, regulates dendrite morphogenesis in neurons.

Lanoué V.^{1,2,3,4}, Usardi, A.^{1,2,3}, Sigoillot S.^{1,2,3}, Talleur M.^{1,2,3}, Mariani J.⁴, Heintz N.⁵, Selimi F.^{1,2,3}

1. Collège de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Paris, F-75005, France;
2. CNRS, UMR 7241, Paris, F-75005, France;
3. INSERM, U1050, Paris, F-75005, France;
4. UMR7102, UPMC, CNRS, 75005 Paris, France ;
5. Lab. For Molecular Biology, The Rockefeller University, NY, USA

Abstract and keywords

Adhesion-GPCRs are a poorly studied subgroup of the family of G Protein-coupled receptors, which play roles in diverse biological functions and are major targets for therapeutic interventions. The Brain Angiogenesis Inhibitor family (BAI) of adhesion-GPCRs is highly expressed in the central nervous system, but its function is not understood. Using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches, we show that the BAI3 receptor controls dendrite morphogenesis in neurons. We also show that this role involves the binding of BAI3 to ELMO1, a critical regulator of the RhoGTPase Rac1. Thus, activation of the BAI3 signaling pathway could lead to direct reorganization of the actin cytoskeleton. Given the importance of the regulation of the actin cytoskeleton through RhoGTPases in several psychiatric disorders and the link between SNPs in the *Bai3* gene and some symptoms of schizophrenia, our study sheds light on the participation of BAI proteins in these brain diseases and on its cellular and molecular basis.

Adhesion GPCR; dendrite; morphogenesis; ELMO1; BAI3; Purkinje cell

Introduction

The increased complexity of behaviors that appeared during evolution has been correlated with an increased molecular complexity of upstream signaling membrane proteins ¹. Genetic studies have linked mutations and copy number variations in genes coding for these upstream synaptic signaling pathways with many psychiatric and neurodevelopmental diseases, such as autism and schizophrenia. Deciphering these signaling pathways and how they regulate the formation of a functional neuronal network in mammals will thus help understand their contribution to brain diseases.

The Brain Angiogenesis Inhibitor (BAI) family is part of the poorly understood family of adhesion-G protein coupled receptors². Adhesion-GPCRs are unique in that they contain very long extracellular domain with multiple modules potentially conferring adhesive and recognition properties. The few studies that have been interested in those adhesion-GPCRs have shown their role in physiology, including in the central nervous system, and pathology. For example, CELSR3 is crucial for the normal development of a functional neuronal network, since its deficiency leads to abnormal neuronal migration, defects in tract development and reduced dendritic development ^{1, 3-5}. Bilateral frontoparietal polymicrogyria, a human brain malformation, is caused by mutations in the adhesion-GPCR GPR56 and is due to deficits in neuronal migration ⁶. The BAI proteins are highly expressed in the brain and have been identified at post-synaptic densities in the forebrain ⁷ and in the cerebellum ⁸. These proteins have several structural features that suggest their potential involvement in the development of functional neuronal networks: their extracellular domain contains several thrombospondin type 1 repeats (TSR1) domains that could provide adhesive and recognition properties. A PDZ binding domain in their C-terminus could enable their association with synaptic scaffolding proteins such as PSD95. Sequence analysis shows that this subfamily of adhesion-GPCRs has homologs only in vertebrates (cf. supplementary figure 1) and that these homologs are extremely well conserved (79% identity between the *Danio rerio* and *Homo sapiens* protein sequences). The BAI proteins may thus have important functions in controlling the development of complex cognitive abilities that are specific to vertebrates. This is highlighted by the fact that BAI proteins could contribute to behaviors defective in psychiatric disorders : SNPs in the *Bai3* gene have been associated with disorganized symptoms of schizophrenia ^{9, 10} and with addiction ¹¹ and the *Bai2* knockout mouse has an anti-depressant phenotype ¹².

The regulation of dendrite morphogenesis in neurons is key to the formation of functional neuronal networks and is deficient in several neurodevelopmental disorders such as autism, Fragile X syndrome or schizophrenia¹³⁻¹⁶. This process involves stabilization of dynamic filopodia arising from interstitial dendritic branching through regulation of the actin cytoskeleton¹⁷, in particular via the modulation of RhoGTPases^{18, 19}. Direct interference with the activity of Rac1 or GTP exchange factors, which promote the activity of RhoGTPases such as Tiam1, betaPIX and kalirin, the Elmo1/dock180 complex, leads to defects in dendrite morphogenesis²⁰⁻²². However, which upstream pathways coordinate RhoGTPases activation by integrating extracellular cues during dendrite morphogenesis is not well understood. The BAI1 receptor regulates phagocytosis through the modulation of the ELMO1/Dock180/Rac1 signaling pathway²³. BAI1 interacts with ELMO1 through a motif conserved in BAI2 and BAI3, opening the possibility that the control of the small GTPase Rac1 through the ELMO1/Dock180 module is a general feature of the BAI receptors and might be important for their role in the central nervous system. Here we show that the BAI3 protein promotes dendritic complexity and growth in neurons, partially through its interaction with ELMO1.

Materials and methods

Hippocampal neuron culture and image analysis

Hippocampal cultures were prepared from E18 Swiss mouse embryos as previously published with minor modifications²⁴. Neurons were transfected at DIV3 using Lipofectamine-2000 (Invitrogen, #11668019) according to the manufacturer's protocol and fixed after 48 hours. Neurons were imaged using a Leica SP5 confocal microscope at 20X. Dendrites were analyzed using the NeuronJ plugin of ImageJ.

Immunocytochemistry, immunohistochemistry and antibodies

Actin staining was performed on fixed cells using 100 nM phalloïdine-TRITC (Sigma). For immunohistochemistry, thirty micrometers cerebellar sections were obtained from 4% paraformaldehyde perfused mice using a freezing microtome. Immunohistochemistry for ELMO1 was performed using the TSA amplification kit (Perkin Elmer #NEL74). Antibodies used were: anti-ELMO1, 1/1000 (Abcam, #ab2239); anti-BAI3, 1/500 (Sigma, #HPA015963); anti-GFP, 1/100 (Abcam, #6556); anti-CaBP, 1/5000 (Swant, #300); anti-myc, 1/500 (Sigma, #M4439).

Co-immunoprecipitation

Transfected cells were lysed in 1% (v/v) Triton-X100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl and 2 mM EDTA supplemented with protease inhibitors (SIGMA #P8340) and phosphatase inhibitors (SIGMA #P2850) 30 min at 4°C. After a 15 min centrifugation (10000 g, 4°C), the supernatant was incubated for 1h at 4°C with a GFP antibody (Abcam, #6556) cross-linked to Dynabeads-Protein G (Invitrogen #100.03D). Affinity-purified samples were run on a NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) in NuPAGE MOPS SDS running buffer (Invitrogen) for immunoblot analysis.

Cell spreading assay

Transfected HEK-293H cells were incubated for 30 min in 2.5 μ M Cell Tracker (Invitrogen) diluted in DMEM, washed for 30 min in DMEM/10% FBS, and mechanically detached in DMEM/10% FBS. After 30 min of recovery, cells were plated at a concentration of 5×10^4 cells/ml on coverslips coated with 10 μ g.mL⁻¹ fibronectin. Cells were fixed after 5 or 30 min of spreading and imaged under epifluorescence at 20X magnification with a Qicam camera. Quantification of cell surface area using ImageJ was performed by an investigator blind to the condition. N= 6 experiments, n = ~600-900 cells per condition.

Results

The adhesion-GPCR BAI3 modulates dendrite morphogenesis in neurons

The BAI1 receptor has been shown to regulate Rac1, a major modulator of actin function and dendritic and spine morphogenesis. Using immunofluorescence, the transfected BAI3 receptor is clearly detected at the membrane of HEK-293H cells, with a high concentration in cell protrusions such as filopodia and lamellipodia. These structures are highly enriched in actin microfilaments (F-actin) that can be detected by phalloïdin-TRITC staining (figure 1A b). Using this marker, we could visualize an important colocalization of BAI3 with F-actin in HEK-293H cells (figure 1A). Similarly, in DIV5 transfected hippocampal neurons, the BAI3 protein was detected on the membrane, in particular in dendrites and in protrusions (figure 1B), and colocalized with actin-rich structures (figure 1C). Thus the subcellular localization of the BAI3 receptor is consistent with a potential role in the regulation of the actin cytoskeleton and dendrite morphogenesis.

We tested this hypothesis using overexpression of the BAI3 protein in cultured hippocampal neurons, a classical model for the study of signaling pathways controlling dendrite morphogenesis. We analyzed the number of dendrites per neuron, the total dendritic length per neuron and the dendritic complexity after 5 days in vitro (DIV5) using high resolution confocal microscopy and the NeuronJ plugin of ImageJ. Overexpression of the BAI3 protein results in a 55% increase in the total dendritic length per neuron when compared to GFP-expressing neurons, as well as in a significant increase in the number of tertiary (or higher) branches per neuron (figure 2). Our data also shows a slight, albeit not significant, increase in the total number of dendrites per neuron. Thus the BAI3 receptor promotes dendritic growth and complexity in cultured hippocampal neurons.

BAI3 interacts with ELMO1, a regulator of Rac1 activity

Next we were interested in determining the signaling pathway used by the BAI3 receptor to control dendrite morphogenesis. The BAI1 receptor interacts with the N-terminal part of ELMO1, through an RKR motif present in its cytoplasmic tail¹. This RKR motif is conserved throughout the BAI family. To test whether BAI3 also binds ELMO1 through the same motif, we performed co-immunoprecipitation experiments using extracts of HEK-293H cells co-transfected with several tagged mutants of BAI3 and ELMO1 (figure 3). Using an anti-GFP antibody, we were able to affinity-purify the wild-type form of BAI3 from cells expressing ELMO1-GFP, but not from cells expressing soluble GFP, showing the specific interaction of

BAI3 with ELMO1 (figure 3A). This result was further confirmed by performing the reverse experiment in which we affinity-purified different GFP-tagged forms of the BAI3 receptor and checked for the copurification of ELMO1-myc (figure 3B). ELMO1-myc was co-immunopurified with the cytoplasmic tail of BAI3 (SCT), but not with the mutant BAI3 receptor lacking the whole cytoplasmic domain (EMT). The interaction was however reduced when using the full-length BAI3 with a GFP inserted in its cytoplasmic tail (FLT). This could be due to a hindrance created by the GFP, which is inserted close to the RKR motif (figure 3B). The interaction between ELMO1 and BAI3 was also prevented by mutagenesis of the RKR motif in the BAI3 protein (BAI3-WT-A, figure 3A). Overall, these results show that ELMO1 interacts with the RKR motif located in the cytoplasmic tail of the BAI3 receptor.

Since BAI3 is localized in actin-rich protrusions, we analyzed the colocalization of BAI3 with ELMO1 in filopodia of transfected HEK-293H cells (figure 3C). All the BAI3 constructs analyzed (wild-type BAI3, EMT lacking the cytoplasmic tail or BAI3-WT-A with a mutated RKR motif) were detected in filopodia. We found that 90% of the filopodia in cells expressing the wild-type BAI3 receptor also contained ELMO1. This percentage of colocalization decreased to 60% for cells expressing the WT-A BAI3 receptor and to only 30% for EMT. These results show that the cytoplasmic tail of BAI3 is essential for the colocalization of BAI3 with ELMO1 in filopodia and that the interaction of ELMO1 with BAI3 through the RKR motif is partially responsible for this recruitment of ELMO1 in actin-rich filopodia.

The BAI3/ELMO1 interaction is involved in the regulation of dendrite morphogenesis

The expression of the ELMO1 protein has been shown in cultured hippocampal neurons *in vitro*²². In accordance with our results obtained in HEK-293H cells, we detected partial colocalization of the BAI3 receptor with ELMO1-myc in transfected DIV5 hippocampal neurons (figure 4C). *In vivo*, Katoh and colleagues have shown by *in situ* hybridization that ELMO1 is expressed in neurons from different regions of the mouse brain²⁵. In particular, it is expressed in Purkinje cells from post-natal day 3 (P3). Double immunolabeling of mouse cerebellar sections using an antibody against the endogenous ELMO1 protein and an antibody against calbindin, a Purkinje cell marker (figure 4), showed the presence of ELMO1 in the dendritic arbor of Purkinje cells starting at P3 (figure 4A). More particularly it was strongly detected at the growing tips of dendrites at this stage. By P10, it was filling the whole Purkinje cell dendritic arborization. This pattern is consistent with a potential role in the morphogenesis of Purkinje cell dendritic arborization, which is extensively reorganized

between P0 and P15 in the mouse cerebellum. To test whether the interaction between BAI3 and ELMO1 was important for BAI3's function during neuronal development, we transfected hippocampal neurons with BAI3 mutant constructs deficient for ELMO1 interaction (BAI3-WT-A, BAI3-EMT or BAI3-FLT, cf. figure 3). As shown in figure 2, all these mutations abolished the ability of BAI3 to promote dendritic complexity but only partially reduced its ability to promote dendritic growth. Thus BAI3's function as a regulator of dendrite morphogenesis is at least partially due to its ability to interact with ELMO1, but also involves signaling pathways associated with domains other than the C-terminus of BAI3.

Modulation of Rac1 activity by the BAI3/ELMO1 pathway in neurons

ELMO1 is part of the guanylate exchange factor (GEF) ELMO1/Dock180 of Rac1²⁶ and BAI1 has been shown to regulate Rac1 activity through its binding to the ELMO1/Dock180 module²³. The modulation of dendritic morphogenesis mediated by BAI3 could thus be a result of the regulation of Rac1 activity. We tested this hypothesis using a classical *in vitro* assay, the cell spreading assay (Kato et Negishi, 2003). Transfected HEK-293H cells were plated on fibronectin and imaged at different time points to measure their spreading (figure 5). As expected, after 30 minutes, control cells expressing GFP have already spread (figure 5). BAI3 expressing cells showed a clear 27% reduction in their spreading at 30 minutes when compared to control cells ($140 \pm 3 \mu\text{m}^2$ versus $192 \pm 5 \mu\text{m}^2$ respectively, ***: $p < 0.001$). This reduction in spreading was already significant at 5 minutes (WT: $118 \pm 3 \mu\text{m}^2$; GFP: $139 \pm 6 \mu\text{m}^2$, **: $p < 0.01$). Deletion of the cytoplasmic tail in BAI3 totally abolished this effect at both time points (30 minutes: EMT: $208 \pm 7 \mu\text{m}^2$, GFP: $192 \pm 5 \mu\text{m}^2$, $p > 0.05$), showing that BAI3's ability to inhibit cell spreading depends on intracellular binding partners. This was also the case for the FLT mutant showing that GFP insertion in the cytoplasmic tail has an important effect on BAI3's ability for intracellular signaling. However, the effect was only partially abolished by the mutation of the RKR motif, showing that ELMO1 is not the only intracellular partner involved in this signaling pathway (30 minutes: BAI3-WT-A: $166 \pm 4 \mu\text{m}^2$, BAI3-WT: $140 \pm 3 \mu\text{m}^2$, ***: $p < 0.001$). Thus over-expression of the BAI3 receptor inhibits cell spreading through its cytoplasmic tail, suggesting that BAI3 signaling can indeed modulate Rac1 activation.

Discussion

The brain is composed of thousands of different types of neurons that differ drastically in their morphology, in particular in the shape and complexity of their dendritic arborization. This morphology underlies functional differences between neurons, in particular how they integrate signals coming from different inputs. Its proper development is thus essential for the normal function of the central nervous system. Deficits in this process have been correlated to neurodevelopmental disorders such as schizophrenia. We have now provided evidence for a new signaling pathway regulating dendrite morphogenesis involving a member of the poorly studied adhesion GPCR family, the Brain Angiogenesis Inhibitor receptor BAI3. This receptor promotes dendritic growth and complexity partially through its interaction with ELMO1 and modulation of the actin cytoskeleton.

The regulation of dendrite morphogenesis involves integration of extracellular signals and intrinsic molecular programs in order to control the growth and branching of the actin cytoskeleton. The BAI receptors constitute a new regulator of this process that can sense extracellular signals and signal in the cell through their interaction with effectors such as ELMO1. Another family of adhesion GPCRs, the CELSR proteins, has been shown to play a role in this process through regulation of intracellular calcium signaling. Knockdown of CELSR2 in organotypic cultures in pyramidal neurons and Purkinje cells induces a simplification of their dendritic arbor²⁷, whereas CELSR3 has an opposite role³. This role is conserved since the *Drosophila* homolog, Flamingo, is also involved in neuronal morphogenesis and more particularly in regulating dendritic field through repulsion²⁸. Given our results, it seems that control of neuronal morphogenesis could be a property of many adhesion-GPCRs. Given the diversity of domains found in the extracellular part of adhesion-GPCRs, an attractive hypothesis is that each type of adhesion-GPCR might regulate the morphology of a particular neuronal population and thus contributes to the diversity of shape, and of function, in the vertebrate nervous system.

What is the signaling pathway of BAI3 during regulation of neuronal morphogenesis? Our results show that its interaction with the protein ELMO1 is partially involved in this process, in particular in the regulation of dendritic complexity. Previous results have shown that BAI1 can activate Rac1 and regulates phagocytosis through an interaction with ELMO1²³. Regulation of RhoGTPases is essential for driving changes in the actin cytoskeleton and cell morphogenesis during development. Moreover modifying Rac1 activity in neurons is known

to induce changes in dendrite morphogenesis²⁰. Hence BAI3's interaction with ELMO1 constitutes a direct pathway linking extracellular cues and intracellular modification of the actin cytoskeleton during neuronal development. It will be of interest to analyze the role of other potential intracellular partners of BAI3. In particular, IRSp53/BAIAP2 was originally identified as a partner for BAI1²⁹, and has since been shown to regulate actin morphogenesis through binding of small RhoGTPases and the WAVE complex³⁰. Small G protein binding, although yet to be demonstrated for BAI proteins, could also play an important role through binding of the 3rd intracytoplasmic loop. Extracellularly, binding of the secreted protein C1q11 has recently been shown to promote synapse elimination *in vitro*, but no effect was demonstrated on dendrite morphogenesis³¹. These results were obtained in more mature hippocampal neurons and, taken together with our data, suggest that the function of BAI proteins in the regulation of dendrite morphogenesis is critical at earlier stages of neuron development. Alternatively other ligands of BAI3 might be critical for this function.

Several candidate genes linked with neurodevelopmental disorders are proteins regulating neuronal morphogenesis³². For example, mutations in Shank3 associated with autism induce defects in spine morphogenesis and in actin polymerization. Neuregulin 1 mutation at valine 321, previously linked to schizophrenia, has been shown to prevent neuregulin's control of dendritic growth and complexity³². SNPs in the *Bai3* gene have been associated with certain symptoms of schizophrenia¹⁰ and the *Bai2* knockout mouse has anti-depressive phenotype¹². Our present study suggests the involvement of BAI proteins in those psychiatric disorders through regulation of dendrite morphogenesis and highlights their potential as therapeutic targets.

Acknowledgements

We would like to thank R. Schwartzman and S. Bolte at the IFR83 imaging facility (UPMC, Paris, France) and J. Teillon at the CIRB imaging facility (Collège de France, Paris, France). We would like to thank J. Bakouche and V. Gautheron for help with cloning and mouse colonies. This work was supported by grants from the CNRS (PEPS, PICS), ATIP-AVENIR, Association syndrome de Rett, UPMC (Emergence). VL was supported by a grant from the UPMC, AU by UPMC and AVENIR, SS by NERF and MT by FRM.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Emes, R. D. *et al.* Evolutionary expansion and anatomical specialization of synapse proteome complexity. *Nat. Neurosci.* **11**, 799–806 (2008).
2. Shima, Y. *et al.* Opposing roles in neurite growth control by two seven-pass transmembrane cadherins. *Nat. Neurosci.* **10**, 963–969 (2007).
3. Lagerström, M. C. & Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 339–357 (2008).
4. Zhou, L. *et al.* Early forebrain wiring: genetic dissection using conditional Celsr3 mutant mice. *Science* **320**, 946–949 (2008).
5. Luo, R. *et al.* G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 12925–12930 (2011).
6. Collins, M. O. *et al.* Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J. Neurochem.* **97 Suppl 1**, 16–23 (2006).
7. Selimi, F., Cristea, I., Heller, E. & Chait, B. Proteomic studies of a single CNS synapse type: the parallel fiber/purkinje cell synapse. *PLoS Biol.* (2009).
8. DeRosse, P. *et al.* The genetics of symptom-based phenotypes: toward a molecular classification of schizophrenia. *Schizophr Bull* **34**, 1047–1053 (2008).
9. Liu, Q.-R. *et al.* Addiction molecular genetics: 639,401 SNP whole genome association identifies many cell adhesion genes. *Am. J. Med. Genet.* **141B**, 918–925
10. Okajima, D., Kudo, G. & Yokota, H. Antidepressant-like behavior in brain-specific angiogenesis inhibitor 2-deficient mice. *J Physiol Sci* **61**, 47–54 (2010).
11. Cahill, M. E. *et al.* Control of interneuron dendritic growth through NRG1/erbB4-mediated kalirin-7 disinhibition. *Mol. Psychiatry* **17**, 99–107 (2011).
12. Scotto-Lomassese, S. *et al.* Fragile X mental retardation protein regulates new neuron differentiation in the adult olfactory bulb. *J. Neurosci.* **31**, 2205–2215 (2011).
13. Kalus, P., Müller, T. J., Zuschratter, W. & Senitz, D. The dendritic architecture of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenic patients. *Neuroreport* **11**, 3621–3625 (2000).
14. Raymond, G. V., Bauman, M. L. & Kemper, T. L. Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathol.* **91**, 117–119 (1996).
15. Cerri, C. *et al.* Activation of Rho GTPases triggers structural remodeling and functional plasticity in the adult rat visual cortex. *J. Neurosci.* **31**, 15163–15172 (2011).
16. Van Aelst, L. & Cline, H. T. Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Current Opinion in Neurobiology* **14**, 297–304 (2004).
17. Luo, L. *et al.* Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* **379**, 837–840 (1996).
18. Hayashi-Takagi, A. *et al.* Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat. Neurosci.* **13**, 327–332 (2010).
19. Kim, J.-Y., Oh, M. H., Bernard, L. P., Macara, I. G. & Zhang, H. The RhoG/ELMO1/Dock180 signaling module is required for spine morphogenesis in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **286**, 37615–37624 (2011).

20. Park, D. *et al.* BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* **450**, 430–434 (2007).
21. Katoh, H., Fujimoto, S., Ishida, C., Ishikawa, Y. & Negishi, M. Differential distribution of ELMO1 and ELMO2 mRNAs in the developing mouse brain. *Brain Res.* **1073-1074**, 103–108 (2006).
22. Katoh, H. & Negishi, M. RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* **424**, 461–464 (2003).
23. Shima, Y., Kengaku, M., Hirano, T., Takeichi, M. & Uemura, T. Regulation of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin. *Dev. Cell* **7**, 205–216 (2004).
24. Gao, F.-B., Kohwi, M., Brenman, J. E., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Control of Dendritic Field Formation in *Drosophila*. *Neuron* **28**, 91–101 (2000).
25. K, O. *et al.* Identification of BAIAP2 (BAI-associated protein 2), a novel human homologue of hamster IRSp53, whose SH3 domain interacts with the cytoplasmic domain of BAI1. *Cytogenet Cell Genet.* **84**, 75–82 (1999).
26. Abou-Kheir, W., Isaac, B., Yamaguchi, H. & Cox, D. Membrane targeting of WAVE2 is not sufficient for WAVE2-dependent actin polymerization: a role for IRSp53 in mediating the interaction between Rac and WAVE2. *Journal of Cell Science* **121**, 379–390 (2008).
27. Bolliger, M. F., Martinelli, D. C. & Sudhof, T. C. The cell-adhesion G protein-coupled receptor BAI3 is a high-affinity receptor for C1q-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 2534–2539 (2011).
28. Chen, Y., Hancock, M. L., Role, L. W. & Talmage, D. A. Intramembranous valine linked to schizophrenia is required for neuregulin 1 regulation of the morphological development of cortical neurons. *J. Neurosci.* **30**, 9199–9208 (2010).

Figure legends

Figure 1: The BAI3 receptor is localized in dendrites in actin-rich structures.

A. In HEK-293H cells, transfected wild-type BAI3 (WT, a) colocalizes with F-actin (labeled with phalloidin-TRITC, b) in cell protrusions such as lamellipodia (arrows) and filopodia (arrowheads). Scale bar: 10 μ m.

B. DIV5 hippocampal neurons were imaged after transfection with mCherry (b) and wild-type BAI3 and stained with an anti-BAI3 antibody (a). The BAI3 protein is detected in dendrites and protrusions of neurons. Scale bar: 10 μ m

C. DIV5 hippocampal neurons were imaged after transfection with BAI3 (a) and phalloidin-TRITC (b) staining to label F-actin. Clear colocalization is observed, in particular in dendritic protrusions (arrows). Scale bar: 5 μ m.

Figure 2: BAI3 promotes dendritic growth and complexity *in vitro*

A. The number of dendrites (a), their length (b) and the complexity of dendritic arborization per neuron (c) was quantified on DIV5 hippocampal neurons transfected at DIV3 with mCherry and either a GFP control construct, wild-type BAI3 or BAI3 mutants (WT-A, EMT or FLT). N= 4 experiments, n= 30 neurons per construct; a, b: One-way ANOVA, Tukey's *posthoc* test; c: Two-way ANOVA, Bonferroni *posthoc* test; *: p<0.05, **: p<0.01.

B. Representative images of the morphology of transfected neurons. Scale bar: 50 μ m

Figure 3: BAI3 directly interacts with ELMO1, a critical regulator of Rac1 signaling.

A. Top: Schematic representation of the BAI3 constructs. WT is the wild-type form of BAI3. WT-A is a mutated form of BAI3 in which the RKR motif was replaced by AAA. Bottom: **ELMO1-GFP interacts with BAI3-WT but not with WT-A.** Cell lysates from HEK-293H coexpressing GFP-tagged form of wild-type ELMO1 (ELMO1-GFP) and either BAI3-WT or WT-A were used for co-immunoprecipitation experiments using an anti-GFP antibody (IP GFP). Affinity-purified proteins were detected by immunoblot analysis with anti-GFP and anti-BAI3 antibodies. Control experiments were performed in parallel on HEK-293H cells coexpressing a soluble GFP and BAI3-WT. TCL: Total Cell Lysate.

B. Top : Schematic representation of the GFP-tagged BAI3 constructs. Bottom: **BAI3-FLT and BAI3-SCT, but not BAI3-EMT, interact with ELMO1-myc.** Cell lysates from HEK-

293H coexpressing one of the GFP-tagged BAI3 constructs and a myc-tagged form of wild-type ELMO1 (ELMO1-myc) were used for co-immunoprecipitation experiments using an anti-GFP antibody (IP GFP). Affinity-purified proteins were detected by immunoblot analysis with anti-GFP and anti-myc antibodies. Control experiments were performed in parallel on HEK-293H cells coexpressing soluble GFP and ELMO1-myc. TCL: Total Cell Lysate.

C. BAI3-WT, but not BAI3-WT-A and not BAI3-EMT, colocalizes with ELMO1-myc in transfected cells.

Left panel: a-i: HEK-293H cells were transiently transfected with either WT, WT-A or EMT constructs and ELMO1-myc. WT and WT-A forms of BAI3 were detected by immunolabeling with an antibody against the N-terminus of the receptor (a, d), and ELMO1-myc was labeled with an anti-myc antibody (b, e, h). Arrows point filopodia colabelled for BAI3 and ELMO1, and asterisks show filopodia missing ELMO1. Scale bar: 10 μm .

Right panel: The histogram presents a quantification of the colocalization of BAI3 with ELMO1-myc in filopodia. N= 4 experiments, 40 cells per condition. One-way ANOVA, Tukey's *posthoc* test; **: $p < 0.01$.

Figure 4: ELMO1 is localized in dendrites of developing neurons

A. ELMO1 is present in dendritic arborization of Purkinje cells *in vivo*. Cerebellar sections from wild-type mice were immunolabelled for the endogenous ELMO1 protein (a, d) and for calbindin (CaBP), a marker of Purkinje cells (b, e). ELMO1 is detected as early as P3 in the molecular layer of the cerebellum, in particular in the growing PC dendrites (a-c). At P10, ELMO1 is more diffused in all PC dendrites (d-f). Scale bar: 50 μm .

B. BAI3-WT (a) and ELMO1-myc (b) immunolocalization in transfected DIV5 hippocampal neurons shows the presence of ELMO1 in dendrites and protrusions, and partial colocalization with BAI3 (arrows). Scale bar: 5 μm

Figure 5: BAI3 regulates cell spreading partially through the ELMO1 pathway

Left panel: Example of HEK293 cell shapes after 5 or 30 minutes of spreading on fibronectin. Scale bar: 20 μm .

Right panel: Quantification of cell surface area at different times of spreading. BAI3-WT transfected cells spread significantly less than GFP-control cells, an effect already detected at five minutes. This effect is dependent on the presence of the cytoplasmic tail or its proper function (no effect with the EMT or FLT constructs compared to GFP-control cells), and

partially on the RKR motif, which binds ELMO1 (significant increase of the surface area of the WT-A mutant expressing cells compared to WT-cells). n=6 experiments; One-way ANOVA, Dunn's *posthoc* test; **: p<0.01, ***: p<0.001, compared to GFP-control cells; ###: p<0.001, compared to BAI3-WT cells, mean ± SEM.

Supplemental figure 1: Phylogenetic analysis of the BAI3 protein in vertebrates using ClustalW

Figures

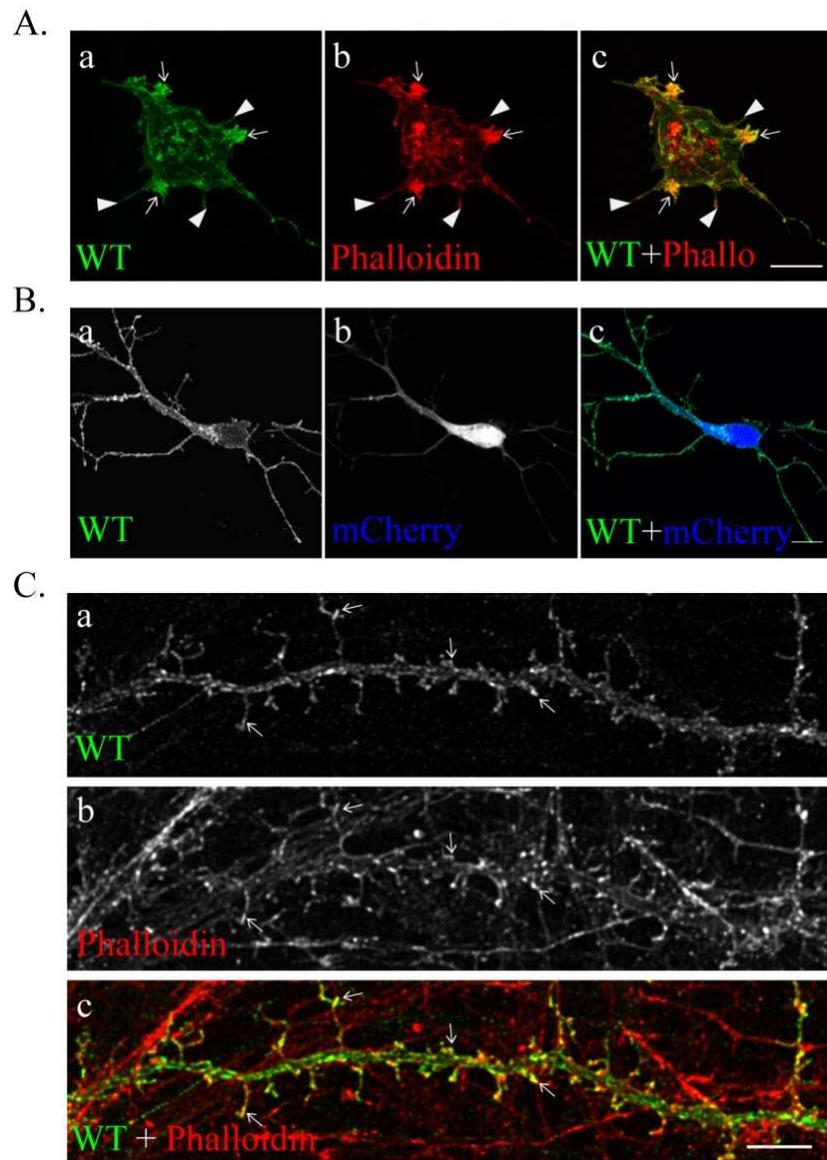


Figure 1

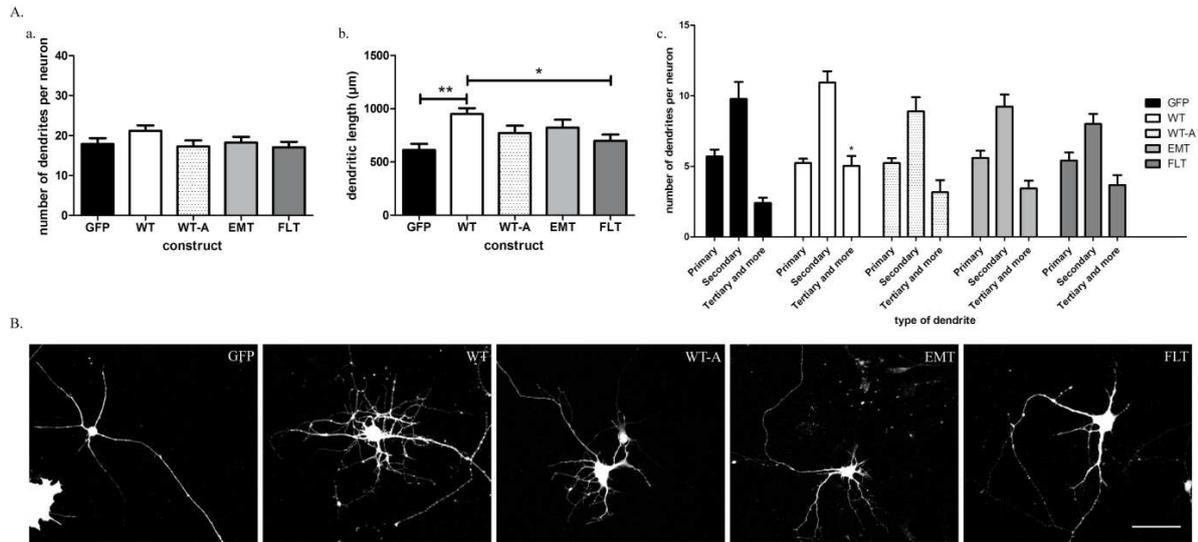


Figure 2

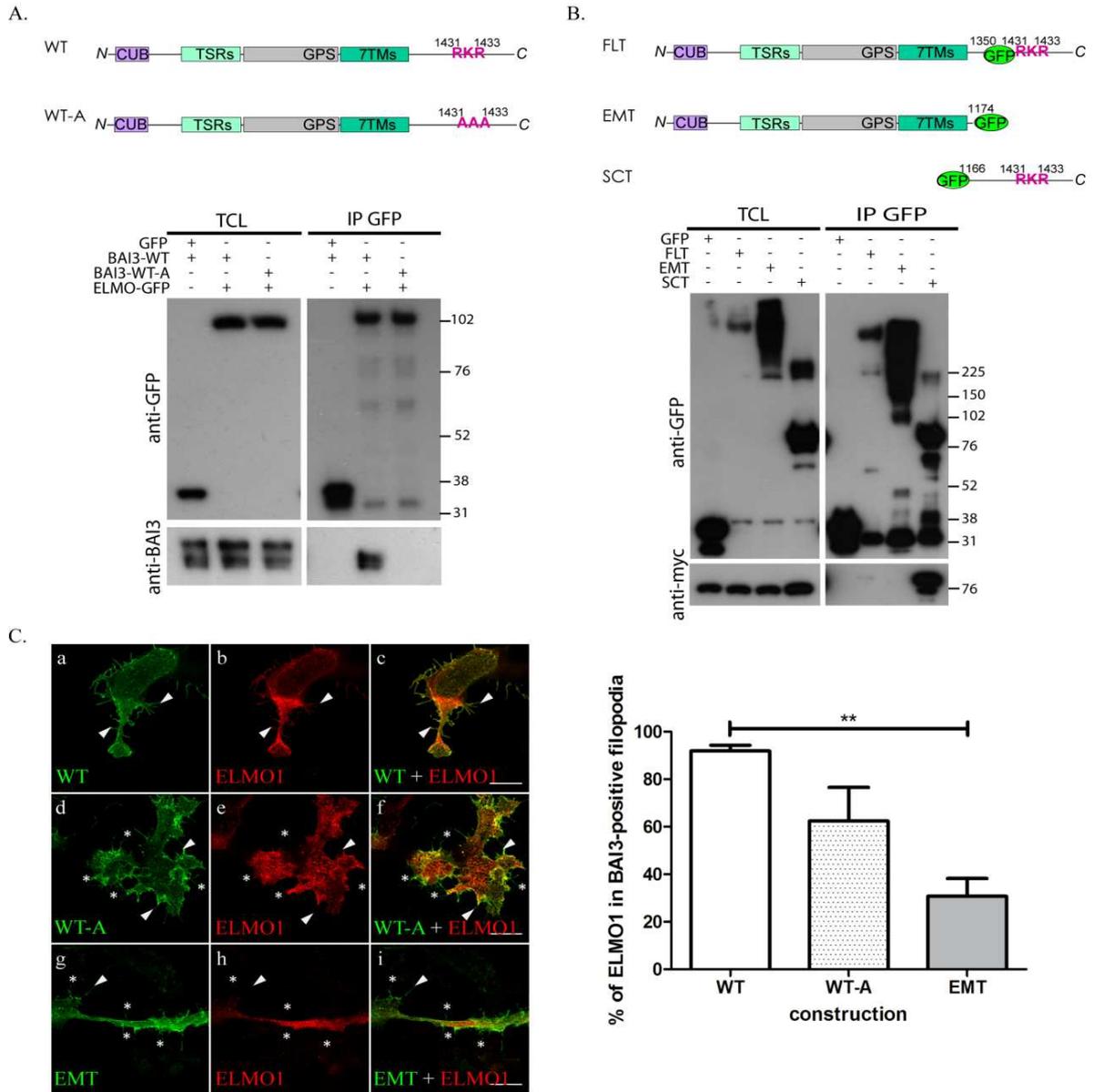


Figure 3

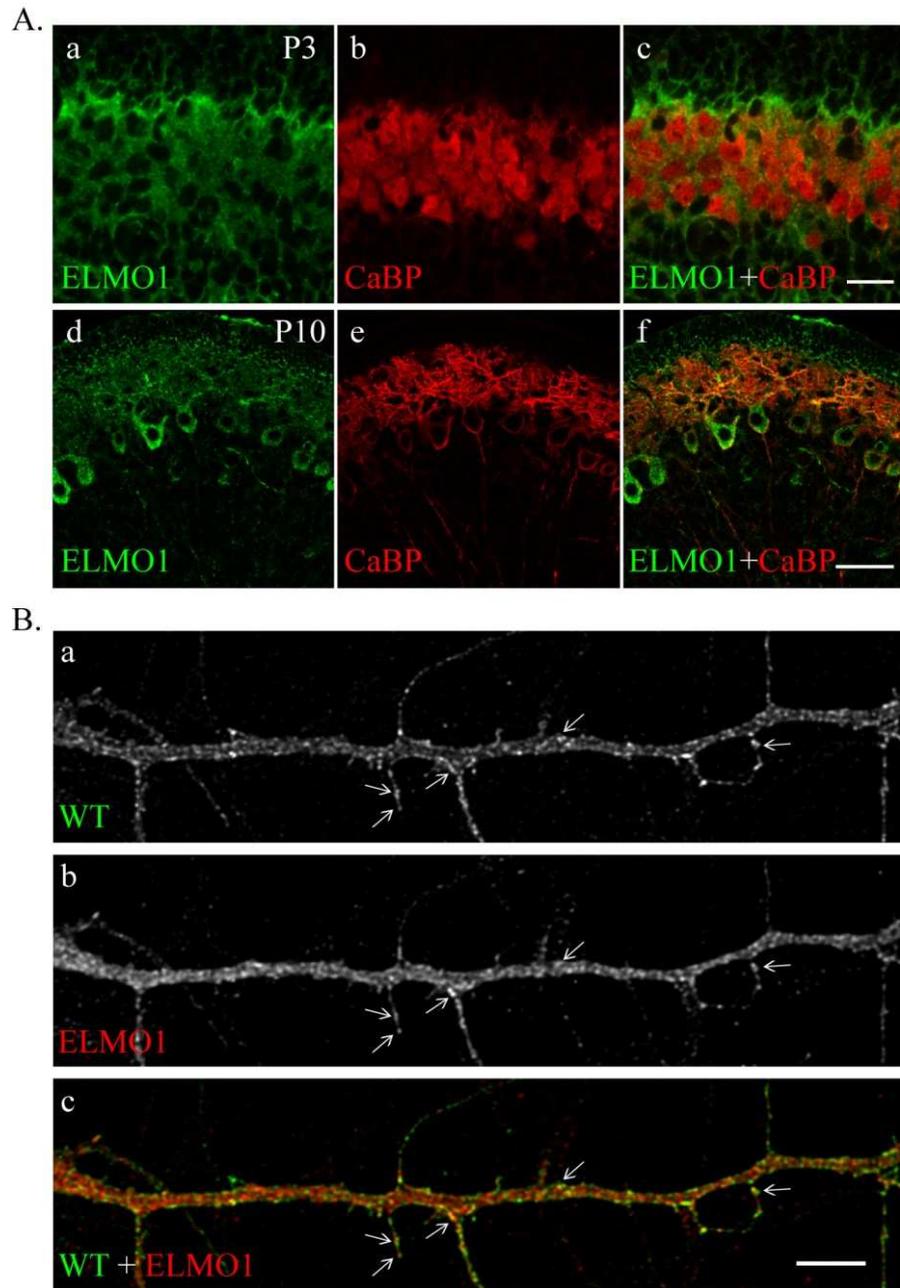


Figure 4

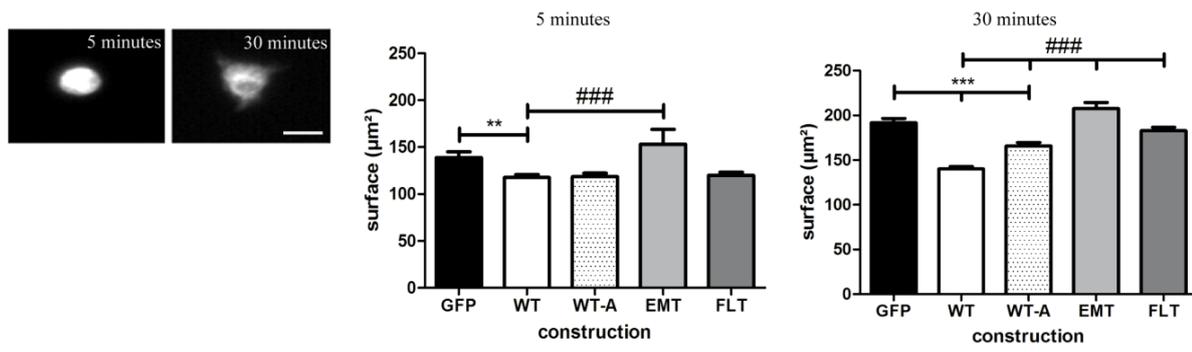
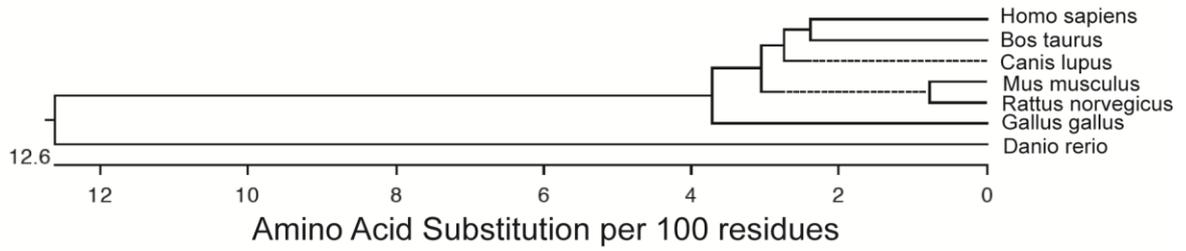


Figure 5



Percent Identity

		1	2	3	4	5	6	7		
Divergence	1		98.3	98.0	94.9	98.6	95.4	79.0	1	Homo sapiens
	2	1.7		98.5	94.7	98.1	94.8	79.4	2	Mus musculus
	3	2.0	1.5		94.3	97.6	94.3	79.0	3	Rattus norvegicus
	4	5.3	5.5	6.0		95.1	91.9	79.4	4	Gallus gallus
	5	1.5	1.9	2.5	5.1		95.4	79.5	5	Canis lupus
	6	4.8	5.4	5.9	8.6	4.8		76.8	6	Bos taurus
	7	24.7	24.1	24.7	24.1	24.0	27.8		7	Danio rerio
		1	2	3	4	5	6	7		

Supplemental Figure 1

II. Rôle du récepteur BAI3 dans le développement des épines dendritiques *in vitro*

Nos résultats ont permis de décrire l'implication du récepteur BAI3 dans la régulation de la dendritogenèse, potentiellement via la modulation de Rac1 et du cytosquelette d'actine. Ces modulations sont également importantes pour la régulation de la morphogenèse des épines dendritiques. La protéine BAI3 ayant été identifiée dans les densités postsynaptiques (Jordan et al., 2004; Peng et al., 2004; Selimi et al., 2009), nous avons analysé si elle pouvait jouer un rôle dans la spinogenèse en utilisant à nouveau le modèle *in vitro* de culture primaire de neurones d'hippocampe.

II.1. Dans les neurones matures, BAI3 est localisé dans les épines dendritiques

BAI3 a été identifié par des expériences biochimiques comme constituant de la densité postsynaptique (Jordan et al., 2004; Selimi et al., 2009). La PSD est située dans la tête des épines dendritiques et est composée d'un grand nombre de protéines formant un échafaudage moléculaire sous la membrane plasmique (Sheng et Hoogenraad, 2007). Afin de confirmer la localisation du récepteur BAI3 dans les épines dendritiques et notamment au niveau de la PSD, nous avons coexprimé dans des neurones d'hippocampe à DIV18 la forme sauvage du récepteur BAI3 et la protéine fluorescente soluble mCherry (**figure 26A** milieu). La détection de BAI3 à DIV20 par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-BAI3 (**figure 26A haut**) montre un marquage intense dans les épines à la surface des dendrites. Un co-immunomarquage dans ces neurones de BAI3 et de PSD95, une protéine importante de l'échafaudage postsynaptique, a permis de détecter une colocalisation partielle (**figure 26B**). Ces résultats confirment donc que BAI3 est présent dans les épines dendritiques des neurones matures, et qu'une partie du récepteur est située au niveau de la densité postsynaptique.

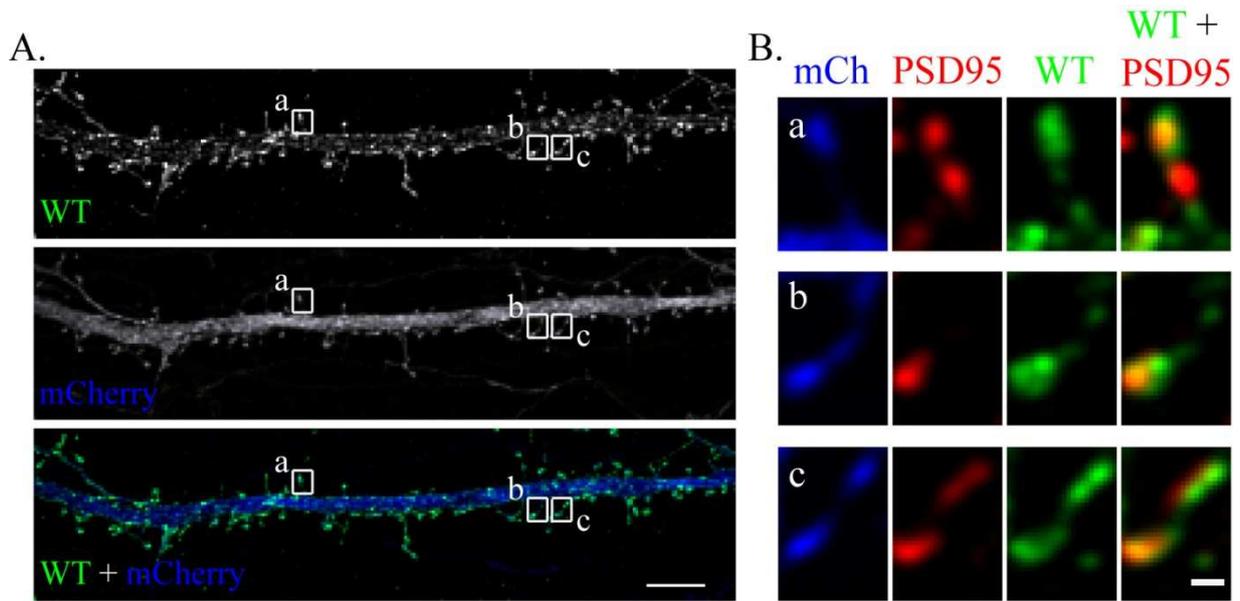


Figure 26 : BAI3 est localisé dans les épines dendritiques matures *in vitro*.

Des neurones d'hippocampe en culture ont été cotransfectés à DIV18 avec une construction codant pour la protéine BAI3 sauvage (WT) et une construction codant pour la protéine fluorescente mCherry (mCh) puis fixés à DIV20.

A. Images de microscopie confocale révélant la localisation du récepteur BAI3 (anticorps anti-BAI3, vert) dans les épines dendritiques. Barre d'échelle : 5 μm .

B. Agrandissements des régions a-c montrant la co-localisation partielle de BAI3 avec le marqueur postsynaptique PSD95 (anticorps anti-PSD95, rouge). Barre d'échelle : 0,5 μm .

II.2. La surexpression de BAI3 dans les neurones d'hippocampe matures n'influe ni sur la densité ni sur la morphologie des épines dendritiques

Pour déterminer si BAI3 est aussi impliqué dans la morphogenèse des épines dendritiques, nous avons étudié l'effet de l'expression de la forme sauvage ou de l'une des formes modifiées au niveau de la queue cytoplasmique de BAI3 (cf. Résultats § I.) sur la densité et la morphologie des épines dendritiques. Pour cela, des neurones d'hippocampe en culture à DIV18 ont été cotransfectés avec mCherry, pour observer la morphologie des épines, et BAI3-WT, -WT-A, -EMT ou -FLT, ou une GFP soluble comme contrôle. Des segments de dendrites de 60 μm de long (**figure 27A**) ont été analysés à l'aide de la microscopie confocale à forte résolution et du logiciel NeuronStudio. Nous avons quantifié la densité des épines (**figure 27B haut**), leur longueur moyenne de la base du coup au haut de la tête (**figure 27B milieu**), ainsi que le diamètre moyen de la tête de ces épines (**figure 27B bas**). Aucune variation statistiquement significative n'a été observée pour ces paramètres, quelle que soit la construction exprimée. Ces résultats indiquent que la modification de la régulation de la voie de signalisation BAI3 dans des neurones matures n'a pas d'effet sur la morphogenèse des épines dendritiques.

II.3. Conclusion et perspectives

Dans cette seconde étude, nous avons montré que BAI3 est présent dans les épines dendritiques des neurones d'hippocampe *in vitro*, notamment au niveau de la PSD, en accord avec les données de la littérature qui ont identifié le récepteur BAI3 dans cette structure. Notre étude montre également que la surexpression du récepteur BAI3 sauvage, ou de ses formes modifiées, dans des neurones matures n'a pas d'effet sur la densité ou la morphologie des épines dendritiques. De nouvelles expériences devront être réalisées pour exprimer ces différentes constructions plus tôt et plus longtemps durant le développement des neurones d'hippocampes en culture pour conclure définitivement sur un éventuel rôle du récepteur BAI3 dans la spinogenèse.

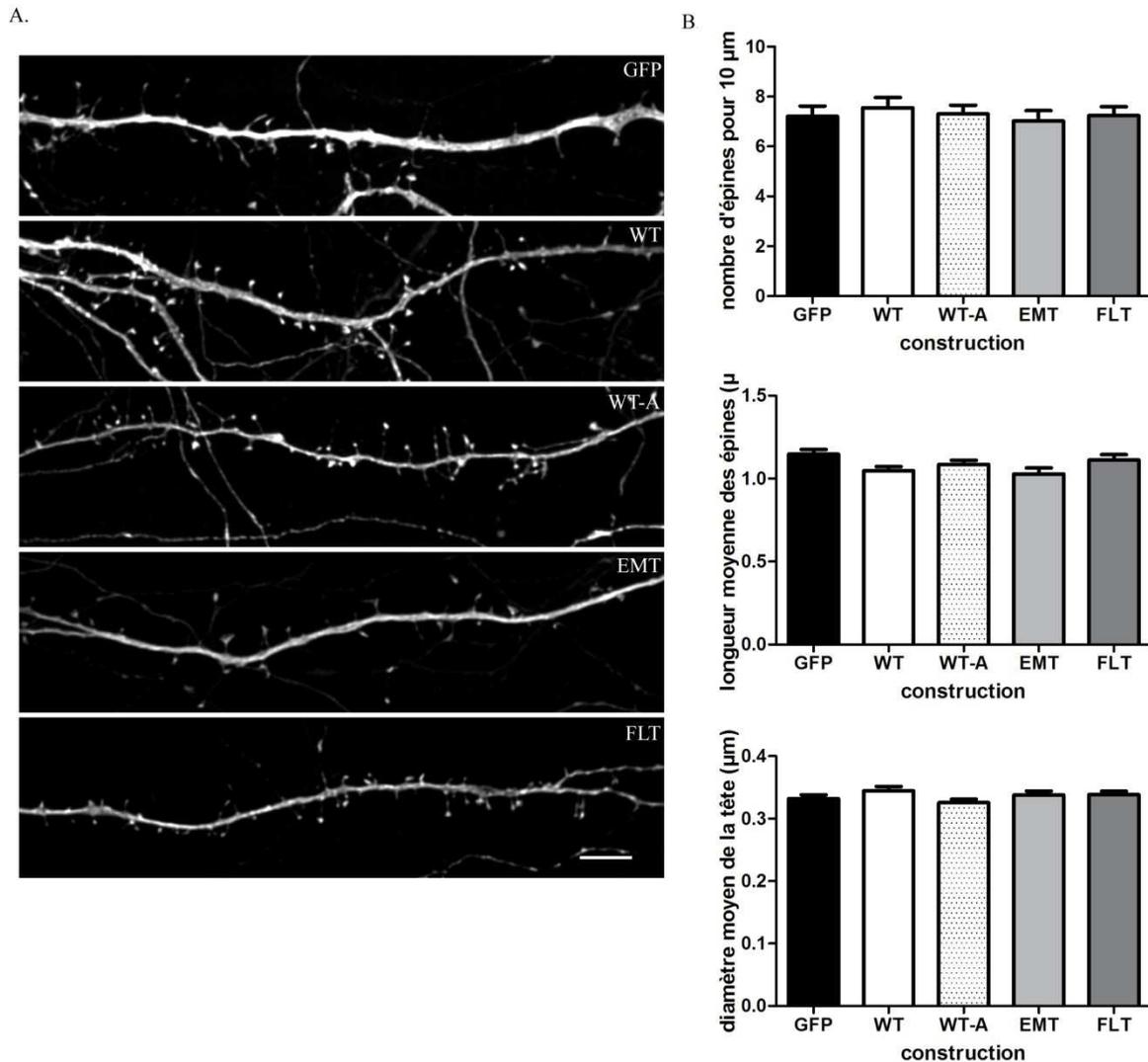


Figure 27 : La modulation de BAI3 dans les neurones matures n'influence pas la densité ni la morphologie des épines dendritiques.

Des neurones d'hippocampe en cultures à DIV18 ont été cotransfectés avec une construction mCherry et différentes constructions de BAI3 ou une GFP soluble comme contrôle, puis analysés à DIV20.

A. Illustration des épines dendritiques sur des segments de dendrites secondaires de 60 μm de neurones d'hippocampe cotransfectés avec mCherry et les différentes constructions BAI3. Barre d'échelle : 5 μm .

B. Quantification du nombre d'épines pour 10 μm de dendrite (haut) et mesure de leur longueur (milieu) et du diamètre moyen de leur tête (bas) à l'aide du logiciel NeuronStudio. $p > 0,05$; one-way ANOVA, test *post hoc* de Tukey; $n = 45$ neurones par construction, de 5 expériences indépendantes.

III. Étude *in vivo* de la localisation et du rôle du récepteur BAI3

Nos résultats obtenus *in vitro* suggèrent un rôle de BAI3 dans le développement neuronal, en particulier lors du développement dendritique. Nous avons voulu confirmer ce rôle *in vivo*, en utilisant comme modèle d'étude les cellules de Purkinje du cervelet, qui, comme nous l'avons vu, expriment à la fois la protéine BAI3 mais aussi son partenaire potentiel ELMO1.

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* montrent que la surexpression du récepteur BAI3 entraîne des modifications de la morphogenèse des neurones d'hippocampe en culture. En revanche, l'expression de formes modifiées de BAI3 au niveau du domaine cytoplasmique diminue ou abolit cet effet (cf. Résultats § I.). Afin de caractériser les fonctions du récepteur BAI3 *in vivo*, notre équipe a généré deux lignées de souris transgéniques exprimant des constructions codant pour des formes modifiées de BAI3. Les constructions ont été placées sous le contrôle du promoteur L7-PCP2 spécifique des cellules de Purkinje dans le cervelet (**figure 28A** ; Smeyne et al., 1995; Zhang et al., 2001).

La première lignée exprime la forme tronquée BAI3-Soluble Cytoplasmique Tagged (BAI3-SCT), constituée uniquement de la queue cytoplasmique du récepteur fusionnée à une GFP (**figure 28Ba**). *In vitro*, BAI3-SCT est capable d'interagir avec le partenaire cytoplasmique ELMO1 de BAI3 (cf. Résultats § I) : son expression pourrait donc empêcher la signalisation du récepteur endogène en titrant les protéines ELMO1 disponibles. La seconde lignée exprime la forme BAI3-Full Length Tagged (BAI3-FLT) entière de BAI3 avec une insertion GFP dans sa queue C-terminale (**figure 28Ca**). Nos résultats de coimmunoprécipitation suggèrent une réduction de la capacité de BAI3 à lier ELMO1 due à cette insertion de la GFP, ainsi qu'une diminution de sa capacité à réguler la complexité de l'arbre dendritique dans les neurones d'hippocampe en culture (cf. Résultats § I.). La surexpression de BAI3-FLT dans les cellules de Purkinje pourrait donc également interférer avec la fonction du récepteur BAI3 endogène en jouant un rôle de dominant-négatif.

Nous avons analysé les effets de l'expression de ces récepteurs mutés sur la morphologie et la synaptogenèse des cellules de Purkinje. En parallèle, des expériences de purification par affinité sur des extraits de cervelets des souris transgéniques ont été effectuées afin de valider l'interaction entre BAI3 et ELMO1 *in vivo*.

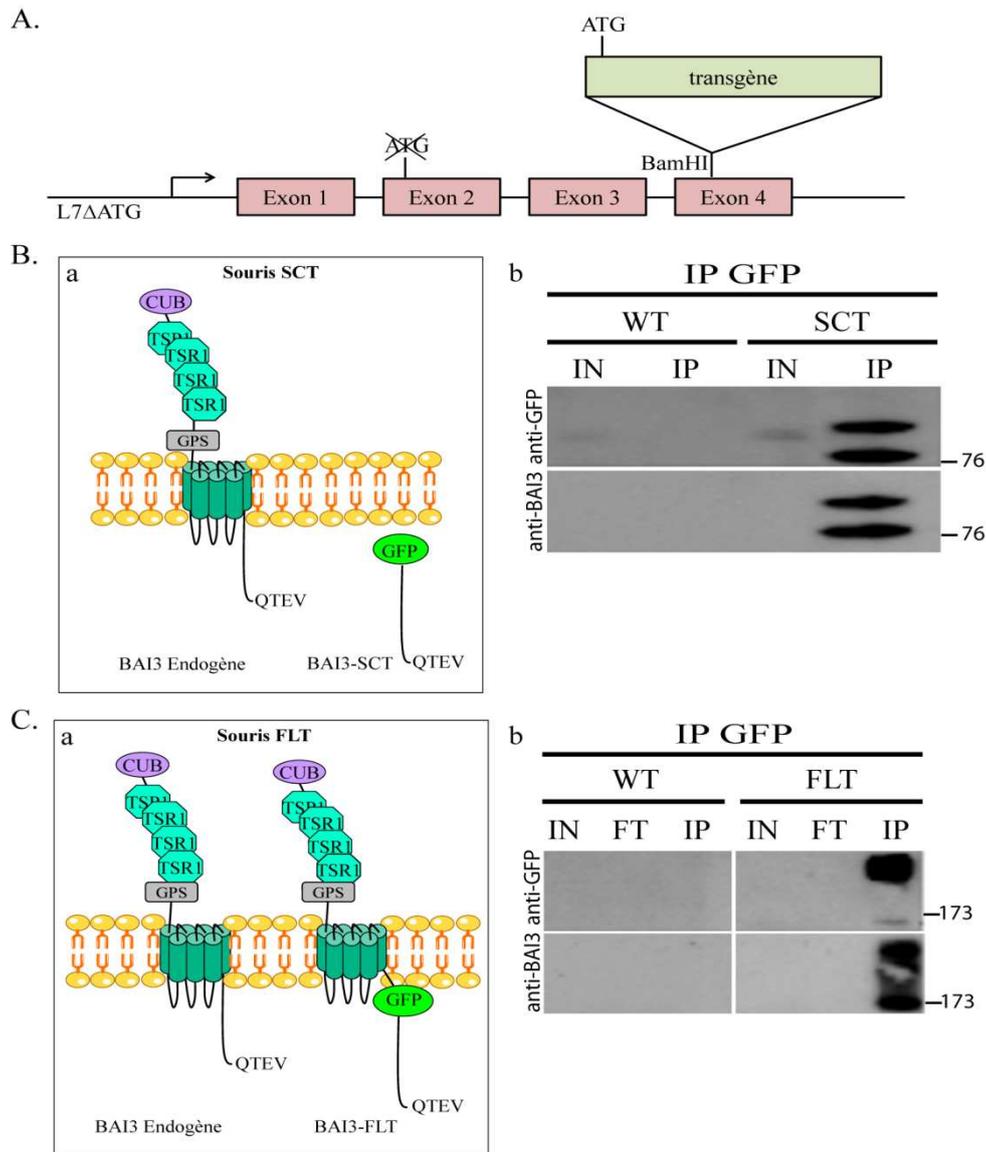


Figure 28 : Les formes modifiées de BAI3 sont exprimées dans le cervelet des souris transgéniques SCT et FLT.

A. Représentation schématique du transgène utilisé pour la production des souris SCT et FLT. Les constructions SCT et FLT ont été placées sous le contrôle du promoteur L7-PCP2, spécifique des cellules de Purkinje dans le cervelet.

B. Souris transgéniques SCT. **a.** Représentation schématique des formes de BAI3 exprimées dans les souris SCT : à gauche, le récepteur endogène et à droite, la forme modifiée BAI3-SCT. **b.** Des extraits de cervelet de souris sauvages (WT) et transgéniques (SCT) ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-GFP et les protéines purifiées ont été révélées par des analyses en Western Blot à l'aide d'anticorps anti-GFP (haut) et anti-BAI3 (bas).

C. Souris transgéniques FLT. **a.** Représentation schématique des formes de BAI3 exprimées dans les souris FLT : à gauche, le récepteur endogène et à droite, la forme modifiée BAI3-FLT. **b.** Des extraits de cervelet de souris sauvages (WT) et transgéniques (FLT) ont été analysés comme décrit ci-dessus.

CUB : domaine C1r/C1s Uegf BMP1 ; TSR1 : ThromboSpondine Repeat domains type 1 ; GPS : GPCR Proteolysis Site ; QTEV : motif Glutamine-Thréonine-Glutamate-Valine ; IN : INPUT, extrait total de cervelet solubilisé ; FT : Flow Through, fraction non immunoprécipitée ; IP : protéines immunoprécipitées.

III.1. Localisation du récepteur BAI3 *in vivo*

III.1.1. Localisation du récepteur BAI3 endogène

Le gène *mBai3* est majoritairement exprimé dans le cerveau, et plus particulièrement dans l'hippocampe et le cervelet (Shiratsuchi et al., 1997; Kee et al., 2004). Bien que la protéine ait été identifiée au niveau des PSD, et notamment à la synapse fibres parallèles/cellules de Purkinje (Jordan et al., 2004; Selimi et al., 2009), il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée histologique sur la distribution du récepteur BAI3 dans le cerveau ni sur sa localisation subcellulaire précise dans les neurones. Afin de caractériser la distribution du récepteur BAI3 dans le cerveau murin, nous avons réalisé des immunomarquages sur des coupes parasagittales de cerveaux de souris en testant un grand nombre d'anticorps commerciaux (**figure 29C**).

En utilisant l'anticorps ab13308 (reconnaissant la 3^{ème} boucle cytoplasmique de BAI3, Abcam) associé à une détection par un anticorps couplé à la HRP et la tyramide-FITC (amplification simple, **figure 29Da**), nous avons obtenu un marquage spécifique, absent des contrôles sans anticorps primaire, nous permettant de localiser à faible grossissement le récepteur BAI3 dans le cerveau (**figure 29A**). Nous avons observé que le récepteur BAI3 est fortement exprimé dans le cervelet : dans les cellules de Purkinje, la couche moléculaire (**Aa**) et les noyaux profonds du cervelet (**Ab**). La protéine BAI3 est également exprimée dans le reste du cerveau comme par exemple dans certains noyaux postérieurs (**Ac**) et la couche 5 de l'aire rétrospléniale dorsale (**Ad**). Cependant, l'arrêt de la production de cet anticorps en juillet 2008 nous a empêchées de poursuivre l'analyse de la localisation subcellulaire de BAI3 à l'aide de co-immunomarquages.

Nous avons ensuite utilisé un anticorps reconnaissant le même épitope de BAI3 produit par une autre source commerciale, l'anticorps IMG-71620. Pour obtenir un marquage avec cet anticorps, nous avons dû réaliser une étape d'amplification supplémentaire à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la biotine, la streptavidine-HRP et la tyramide-Cy3 (amplification double, **figure 29Db**). Nous avons utilisé cette technique pour réaliser des immunomarquages de la protéine BAI3 sur des coupes de cervelet de souris L7-GFP. Les souris L7-GFP expriment la GFP soluble sous le contrôle du promoteur L7-PCP2 spécifique des cellules de Purkinje dans le cervelet (Zhang et al., 2001). Nous avons pu observer un marquage de la couche moléculaire du cervelet avec l'anticorps anti-BAI3, absent des coupes contrôles sans anticorps primaire. Cependant, malgré les améliorations apportées au protocole

au cours de cette étude, un bruit de fond observable en absence d'anticorps primaire (**figure 29Be**) n'a pu être diminué de manière suffisante pour avoir un rapport signal/bruit correct (**figure 29Bb**). La présence d'un marquage dans la couche moléculaire du cervelet confirme toutefois les résultats obtenus avec l'anticorps précédent.

L'ensemble des résultats obtenus avec ces deux anticorps montre pour la première fois la localisation du récepteur BAI3 endogène dans le cerveau murin, et plus particulièrement dans la couche moléculaire du cervelet dans laquelle se trouve l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje.

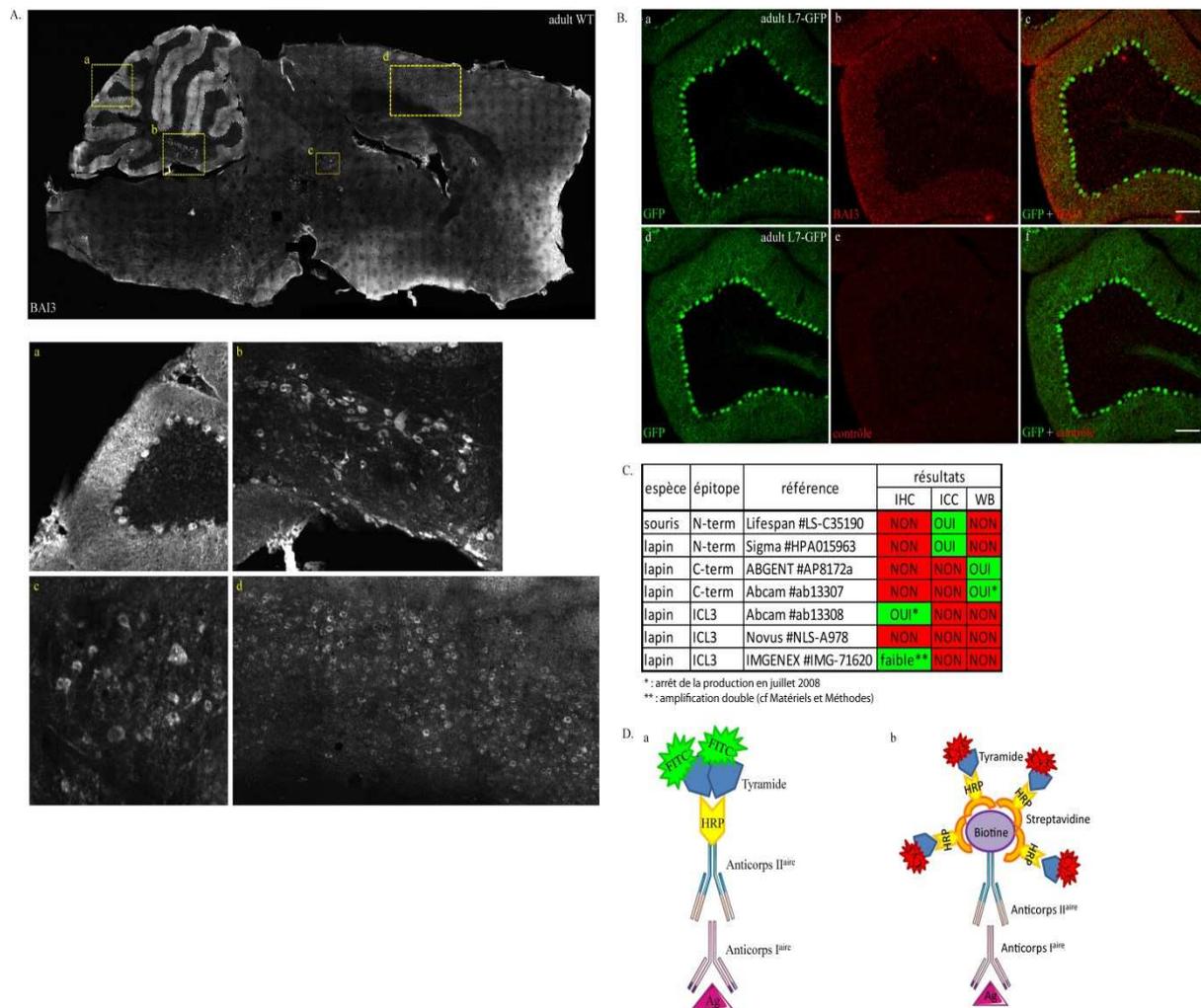


Figure 29 : Expression du récepteur BAI3 endogène dans le cerveau de souris.

A. Mosaïque d'une coupe parasagittale d'un cerveau entier de souris sauvage (WT) adulte marquée avec un anticorps reconnaissant la 3^{ème} boucle cytoplasmique du récepteur BAI3 endogène (Abcam). Le récepteur BAI3 est détecté dans la couche moléculaire (a) et les noyaux profonds (b) du cervelet, dans certains noyaux postérieurs (c) ainsi que dans la couche 5 de l'aire retrospléniale dorsale (d). a-d : agrandissements des zones a-d encadrées.

B. L'immunomarquage de coupes parasagittales de cervelet de souris L7-GFP (exprimant la GFP soluble sous le contrôle du promoteur L7-PCP2 spécifique des cellules de Purkinje ; a, d) avec un anticorps anti-BAI3 dirigé contre la 3^{ème} boucle cytoplasmique (Imgenex) montre un marquage spécifique de la couche moléculaire (b) absent de coupes contrôles qui n'ont pas été incubées avec l'anticorps anti-BAI3 (e). Barre d'échelle : 100 μ m.

C. Tableau des différents anticorps anti-BAI3 testés indiquant l'espèce de production, l'épitope reconnu, la référence et les résultats obtenus. IHC : Immunohistochimie ; ICC : Immunocytochimie ; WB : Western Blot.

D. Techniques d'amplifications utilisées pour les immunomarquages. **a.** amplification simple. L'anticorps secondaire est couplé à une peroxydase de Raifort (HRP) qui active et catalyse le dépôt de molécules de tyramide couplées à un fluorophore. **b.** amplification double. L'anticorps secondaire est couplé à une biotine qui lie avec une très forte affinité des tétramères de streptavidine associés à des HRP. Les HRP catalysent l'activation et le dépôt de tyramide associé à un fluorophore. Ag : antigène.

III.1.2. Localisation des protéines de fusion SCT et FLT *in vivo* : l'extrémité C-terminale de BAI3 pourrait permettre l'adressage du récepteur à la PSD

Pour chacune des lignées transgéniques, nous avons obtenu un fondateur. L'expression des protéines BAI3-SCT et -FLT dans ces lignées a d'abord été vérifiée sur des extraits de cervelets de souris transgéniques adultes. N'ayant pas obtenu de résultats concluants par Western Blot, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-GFP (**figure 28Bb, Cb**). Les échantillons immunoprécipités ont été analysés par immunoblot à l'aide d'un anticorps anti-GFP (**Bb et Cb haut**) ou d'un anticorps dirigé contre la queue cytoplasmique de BAI3 (**Bb et Cb bas**). Avec les deux anticorps, nous avons détecté deux bandes pour chacune des deux lignées, dont l'une à une masse concordant avec les masses moléculaires théoriques de 66,2 kDa pour BAI3-SCT et 194,2 kDa pour BAI3-FLT. La deuxième bande observée pour chacune des deux lignées pourrait correspondre à des modifications post-traductionnelles de la protéine, ou à des dimères dans le cas de la protéine FLT. La protéine BAI3 possède de nombreux sites de phosphorylation, notamment 46 sérines et 18 thréonines (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos> ; Blom et al., 1999), ainsi que quatre sites de sumoylation (<http://sumosp.biocuckoo.org> ; Ren et al., 2009). Les bandes détectées sont absentes des échantillons obtenus à partir de souris sauvages contrôles. Ces résultats montrent donc l'expression des protéines de fusion dans le cervelet de nos souris transgéniques.

Afin de caractériser le patron d'expression des protéines BAI3-SCT et -FLT au cours du développement et chez l'adulte, un immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-GFP couplé à une amplification simple a été réalisé sur des coupes parasagittales de cervelet de souris SCT (**figure 30Aa, b**) et FLT (**c, d**). Dès P10, les protéines BAI3-SCT et -FLT sont détectées dans le cervelet, où elles ne sont pas exprimées de façon homogène dans tous les lobules. En effet, la **figure 30A** montre que la protéine BAI3-SCT est fortement exprimée dans les lobules III, IV-V, et IX, et que le marquage de BAI3-FLT est plus intense dans le lobule IX. Cette hétérogénéité d'expression suivant les lobules, bien qu'encore présente, s'estompe pour les deux constructions chez l'adulte (**figures 30Ab et d**). L'expression la plus forte est observée dans les lobules antérieurs et le lobule IX chez les souris SCT, et les lobules centraux et le lobule IX chez les souris FLT.

À plus forte résolution, un double marquage utilisant un anticorps anti-GFP pour détecter les protéines de fusion (**figure 30B et C a, d**) et un anticorps anti-CaBP (**figure 30B et C b, e**),

spécifique des cellules de Purkinje dans le cervelet, permet de confirmer l'expression des protéines de fusion exclusivement dans les cellules de Purkinje à P10 et chez l'adulte. Ces marquages permettent également de détecter les protéines de fusion BAI3-SCT et -FLT dans le soma et les dendrites proximales et distales des cellules de Purkinje en développement et adultes. La protéine BAI3-SCT est également détectée dans l'axone des cellules de Purkinje, ce qui est en accord avec son caractère soluble.

Nos résultats obtenus *in vitro* ont permis de mettre en évidence la localisation de BAI3 sauvage dans les protrusions cellulaires riches en actine, et notamment dans les épines dendritiques des neurones (cf. Résultats § II.). *In vivo*, l'analyse par microscopie confocale à haute résolution montre un marquage ponctué pour la protéine BAI3-FLT dans les dendrites des cellules de Purkinje adultes et la présence de cette protéine dans les épines dendritiques (**figure 31A**). Ces résultats confirment les données biochimiques qui avaient identifié la protéine BAI3 au niveau des PSD, notamment à la synapse fibres parallèles/cellules de Purkinje (Jordan et al., 2004; Selimi et al., 2009). Le récepteur BAI3 possède à son extrémité C-terminale un motif QTEV connu pour lier le domaine PDZ présent dans un grand nombre de molécules de l'échafaudage postsynaptique comme la PSD95 ou les protéines Shank (cf. Introduction, § II.3.2.2.). Afin de déterminer si la présence de ce motif à l'extrémité C-terminale de BAI3 est suffisante pour l'adressage du récepteur dans les épines dendritiques, nous avons analysé la localisation de la protéine BAI3-SCT à P10 et chez l'adulte. La protéine BAI3-SCT, dépourvue des domaines transmembranaires, est soluble dans le cytoplasme, mais possède le domaine QTEV. L'observation à forte résolution en microscopie confocale chez l'adulte montre un marquage « en paquet » de BAI3-SCT, colocalisé avec le marquage de la CaBP, au niveau des dendrites principales (**figure 31B**), ainsi qu'au niveau de la tête des épines dendritiques des cellules de Purkinje (**figure 31B, têtes de flèches**). Pour vérifier que la présence de BAI3-SCT dans la tête des épines dendritiques n'est pas simplement due au fait que ce soit une protéine soluble, nous avons comparé le marquage obtenu avec celui obtenu sur des coupes de cervelet de souris L7-GFP (**figure 31Cb, b'**). L'observation à forte résolution montre une distribution homogène de la GFP soluble le long des dendrites et des épines, au sein desquelles elle semble être répartie de la base du cou (**figure 31Ca', flèche**) jusqu'à la tête (**tête de flèche**). Ces résultats suggèrent donc que la présence du motif QTEV à l'extrémité C-terminale de BAI3 – et conservé dans BAI3-SCT – pourrait permettre l'interaction du récepteur avec des protéines de l'échafaudage synaptique possédant un domaine PDZ. Ainsi, la queue cytoplasmique de BAI3 serait suffisante pour

adresser le récepteur dans la tête des épines dendritiques, là où est située la densité postsynaptique.

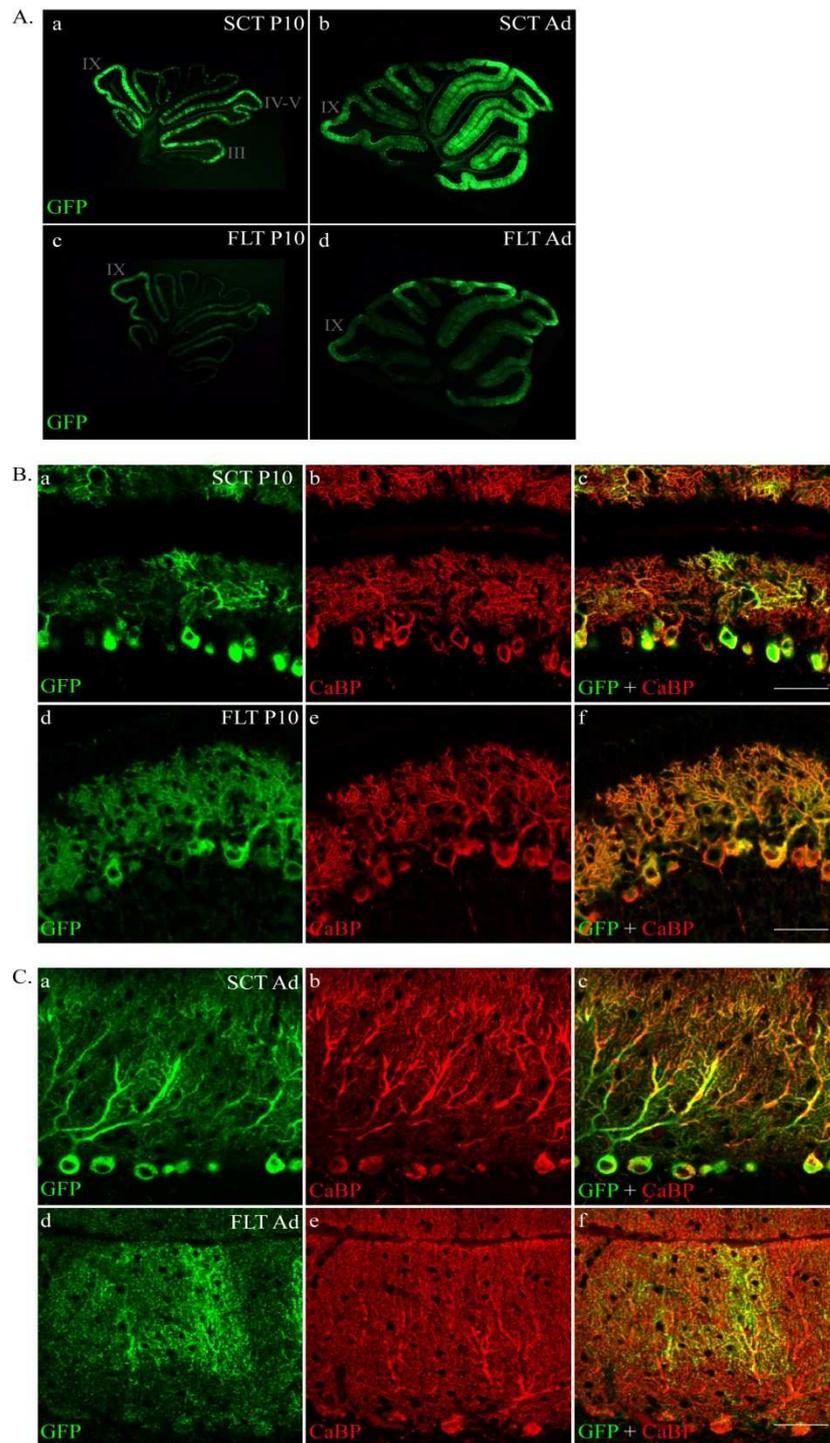
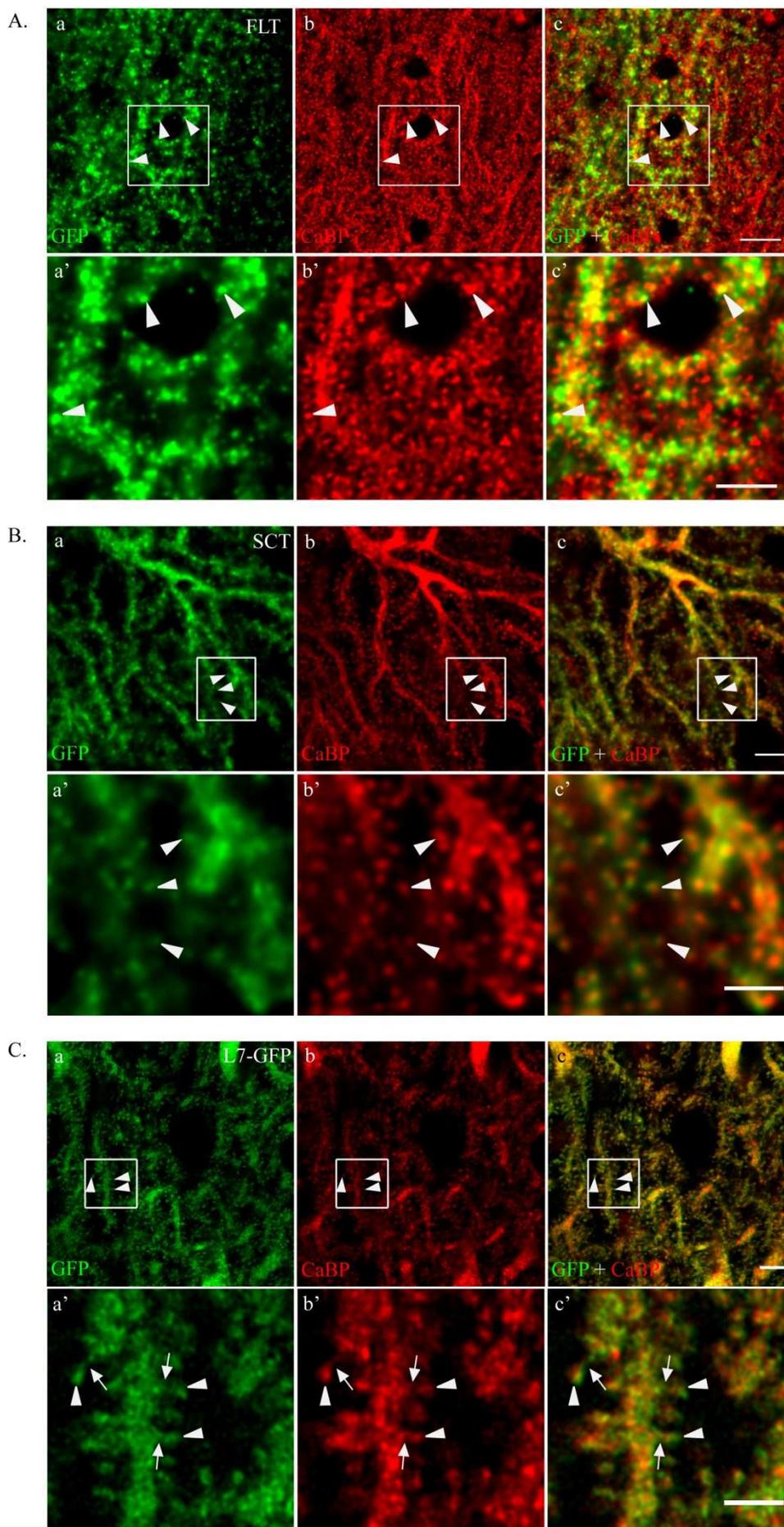


Figure 30 : Expression des protéines BAI3-SCT et -FLT dans les cellules de Purkinje.

A. Des coupes parasagittales de cervelets de souris SCT (a, b) et FLT (c, d) à P10 (a, c) et adultes (b, d) ont été immunomarquées avec un anticorps anti-GFP. Les protéines de fusion sont détectées dans les lobules de manière moins uniforme à P10 que chez l'adulte.

B. Des coupes de cervelets de souris à P10 ont été co-immunomarquées avec un anticorps anti-GFP pour détecter BAI3-SCT (a) ou BAI3-FLT (d) et un anticorps anti-CaBP révélant spécifiquement les cellules de Purkinje (b, e).

C. Des coupes de cervelets de souris adultes ont été co-immunomarquées comme en B. Barres d'échelle : 50 μm .



← **Figure 31 : La queue cytoplasmique de BAI3 semble être suffisante pour la localisation dans la tête des épines dendritiques de BAI3.**

A. Des coupes parasagittales de cervelet de souris FLT adultes ont été co-immunomarquées avec un anticorps anti-GFP pour révéler BAI3-FLT (a) et un anticorps anti-CaBP marquant les cellules de Purkinje (b). BAI3-FLT est localisé dans la tête de certaines épines dendritiques (têtes de flèches). a'-c' : agrandissements numériques des surfaces encadrées en a-c. Barres d'échelle : a-c : 5 μm , a'-c' : 2,5 μm .

B. Des coupes parasagittales de cervelet de souris SCT adultes ont été co-immunomarquées comme en A pour révéler BAI3-SCT (a) et les cellules de Purkinje (b). BAI3-SCT est localisé dans la tête des épines dendritiques (têtes de flèches). a'-c' : agrandissements numériques des surfaces encadrées en a-c. Barres d'échelle : a-c : 5 μm , a'-c' : 2,5 μm .

C. Des coupes parasagittales de cervelet de souris L7-GFP adultes (a) ont été immunomarquées avec un anticorps anti-CaBP (b) pour marquer les épines dendritiques des cellules de Purkinje. a'-c' : agrandissements numériques des surfaces encadrées en a-c. Contrairement à BAI3-FLT et -SCT, la GFP soluble semble présente non seulement dans les têtes des épines (têtes de flèche) mais aussi dans le cou des épines (flèches). Barres d'échelle : a-c : 5 μm , a'-c' : 2,5 μm .

III.2. Voie de signalisation de BAI3 *in vivo*

III.2.1. Étude de la localisation du partenaire de BAI3 ELMO1 dans les cellules de Purkinje adultes

Nous avons mis en évidence qu'ELMO1 interagit avec BAI3 *in vitro* au niveau du motif RKR (cf. Résultats § I.) tout comme BAI1 (Park et al., 2007). Nous avons aussi montré qu'ELMO1 est exprimé dans les cellules de Purkinje dès P3 et localisé dans l'arborisation dendritique de ces neurones durant le développement. Dans les neurones matures, nous avons observé que BAI3 est localisé dans les épines dendritiques des neurones *in vitro* et *in vivo*. Afin de déterminer si la localisation d'ELMO1 chez l'adulte pourrait concorder avec une interaction avec BAI3 *in vivo*, nous avons étudié sa localisation subcellulaire dans les cellules de Purkinje adultes. Pour cela, un double immunomarquage avec un anticorps dirigé contre ELMO1 et un anticorps anti-CaBP a été réalisé sur des coupes parasagittales de cervelet de souris sauvages adultes. L'observation à faible résolution montre un marquage intense d'ELMO1 (**figure 32 haut**) dans le soma et les dendrites proximales et distales des cellules de Purkinje. ELMO1 est aussi détecté dans les glies de Bergmann (**figure 32, astérisques**). L'observation à forte résolution du marquage dans les dendrites distales montre la présence d'ELMO1 dans certaines épines dendritiques (**figure 32 bas, têtes de flèches**), ce qui est en accord avec son interaction potentielle avec la protéine BAI3 dans les cellules de Purkinje.

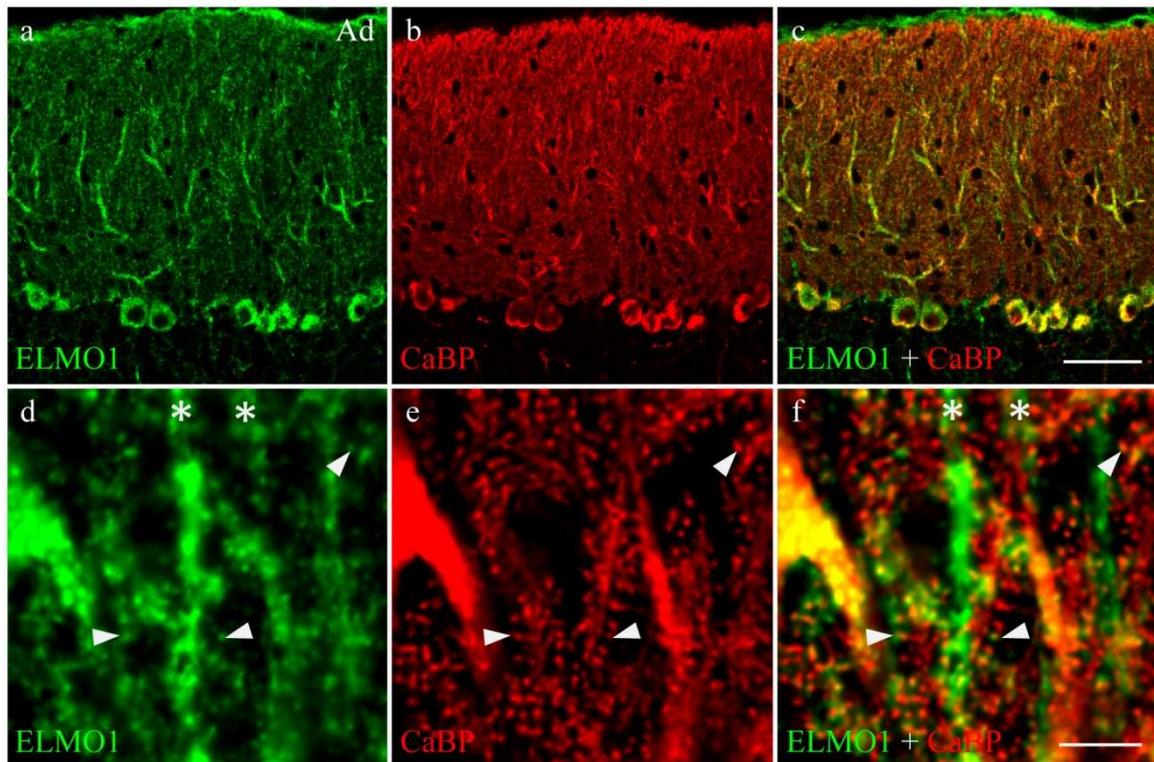


Figure 32 : ELMO1 est localisé dans les dendrites et les épines dendritiques des cellules de Purkinje adultes *in vivo*.

Des coupes de cervelets de souris sauvages ont été immunomarquées avec des anticorps reconnaissant la protéine ELMO1 (a, d) et la CaBP (b, e). La protéine ELMO1 est détectée dans la couche moléculaire du cervelet, en particulier dans les dendrites des cellules de Purkinje (haut). À forte résolution, ELMO1 est détecté dans certaines épines dendritiques des cellules de Purkinje (bas, têtes de flèche). Le marquage d'ELMO1 est aussi observé dans les glios de Bergmann (astérisques, d, f). Barres d'échelle : a-c : 50 μm , d-f : 5 μm .

III.2.2. Interaction d'ELMO1 avec la queue cytoplasmique de BAI3 *in vivo*

Afin de tester si l'interaction entre ELMO1 et la queue cytoplasmique de BAI3 a effectivement lieu *in vivo*, nous avons utilisé des lysats de cervelet provenant de souris transgéniques SCT pour réaliser des expériences de coimmunoprécipitation avec un anticorps anti-GFP (**figure 33**). Des préparations de cervelets issues de souris L7-GFP ont été utilisées comme contrôle. Les protéines purifiées ont été révélées par immunoblot à l'aide d'un anticorps anti-GFP pour détecter BAI3-SCT puis d'un anticorps anti-ELMO1.

Cette étude a nécessité de nombreuses mises au point de plusieurs paramètres. Nous avons d'abord testé l'immunoprécipitation dans deux tampons différents contenant tous deux la même concentration d'un détergent non ionique, 0,05% Triton-X100, mais différant dans leur concentration en ions (faible concentration tp1 : 0,32 M sucrose, 5 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, 1% inhibiteurs de protéases (**figure 33B**); ou forte concentration tp2 : 10 mM HEPES-KOH, 5 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1% inhibiteurs de protéases et 2% inhibiteur de phosphatases (**figure 33D**)). Les résultats présentés en **figure 33 A, B et D** montrent que, dans les deux conditions, nous pouvons immunoprécipiter la protéine BAI3-SCT dans nos échantillons. La figure 33D montre même que cette immunoprécipitation semble plus efficace dans le tampon à forte concentration ionique, ce qui correspond peut-être à une meilleure extraction de la protéine SCT. L'analyse de ces échantillons avec un anticorps anti-ELMO1 montre que quelque soit le tampon utilisé, la co-immunoprécipitation d'ELMO1 est parfois observée (**figure 33B et 33D tp2**), mais n'est pas reproductible (**figure 33A et 33D tp1**). Nous avons également varié la quantité initiale de protéines dans nos lysats (**A et D** : 3 cervelets, **B** : 2 cervelets, **C** : 1 cervelet), sans obtenir de résultats concluants.

Nous avons donc plusieurs fois observé une co-immunoprécipitation d'ELMO1 avec la protéine BAI3-SCT à partir d'extraits de cervelet de souris transgéniques, mais de manière non systématiquement reproductible. Ces résultats suggèrent une interaction directe mais de faible affinité entre ELMO1 et la queue cytoplasmique de BAI3 *in vivo*.

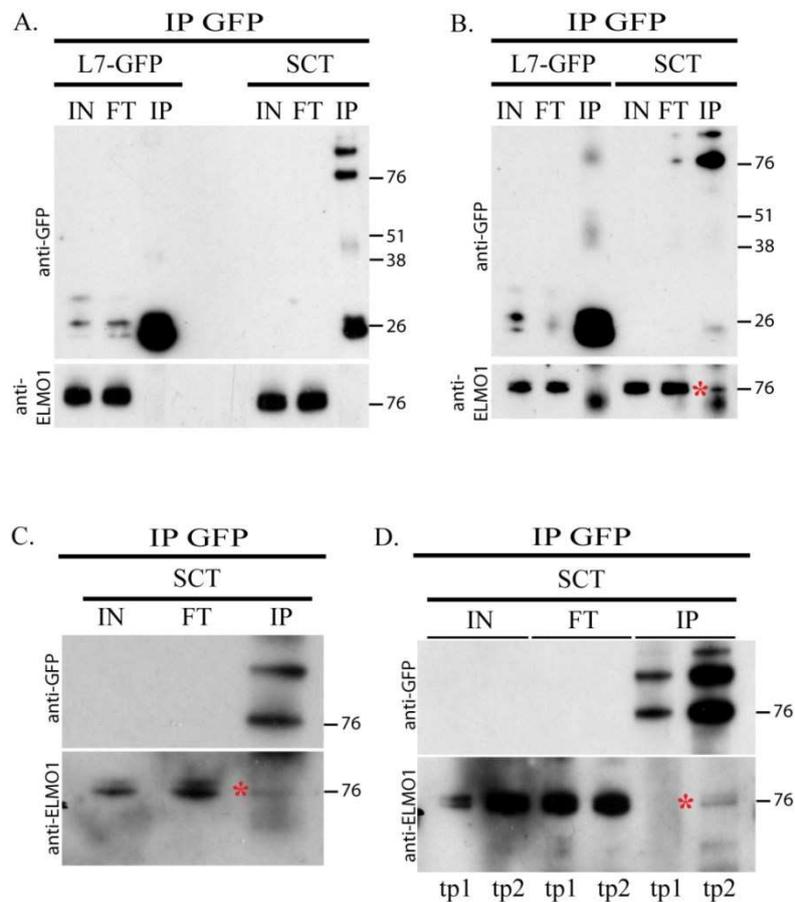


Figure 33 : ELMO1 semble interagir avec la queue cytoplasmique de BAI3 de façon labile *in vivo*.

A. Des extraits protéiques obtenus à partir d'homogénats de cervelets de souris contrôles L7-GFP et de souris SCT (n=3 animaux par échantillon) ont été immunoprécipités dans le tampon 2 à forte concentration ionique avec un mix de deux anticorps monoclonaux anti-GFP. Les protéines purifiées ont été révélées par des analyses en Western Blot avec des anticorps anti-GFP et anti-ELMO1. Les résultats montrent l'absence d'interaction entre SCT et ELMO1 dans cette expérience.

B. Même expérience de co-immunoprécipitation avec cette fois-ci le tampon 1 à faible concentration ionique et 2 animaux par échantillon. Dans cette expérience, la présence d'une bande correspondant à ELMO1 (astérisque rouge), détectée spécifiquement dans l'échantillon provenant de souris SCT, indique une interaction *in vivo* entre BAI3-SCT et ELMO1.

C. Mêmes conditions qu'en A avec un cervelet par extrait. ELMO1 est co-immunoprécipité (astérisque rouge) avec SCT.

D. Expérience réalisée pour comparer directement la co-immunoprécipitation dans les deux tampons tp2 (testé en A et C) et tp1 (testé en B). Les conditions sont identiques à l'expérience en A. Cette fois, la co-immunoprécipitation d'ELMO1 avec SCT est observée dans le tampon 2.

IN : INPUT, fractions protéiques entières ; FT : Flow Through, fractions protéiques non-immunoprécipitées ; IP : fractions immunoprécipitées.

III.3. Étude du rôle de BAI3 dans le développement et l'innervation des cellules de Purkinje

III.3.1. La protéine BAI3 pourrait réguler la mise en place de l'innervation excitatrice sur les cellules de Purkinje

Nous avons observé que la surexpression du récepteur BAI3 sauvage dans les neurones d'hippocampe provoque des modifications de la dendritogenèse des neurones (cf. Résultats § I.). Dans les cellules de Purkinje, BAI3 a été identifié au niveau des synapses constituées par les fibres parallèles (Selimi et al., 2009) et nous avons montré la localisation de BAI3-SCT et -FLT au niveau des dendrites et des épines dendritiques des cellules de Purkinje. Nous avons donc émis l'hypothèse que BAI3 pourrait être impliqué dans la morphogenèse et la synaptogenèse des cellules de Purkinje.

Nous avons montré précédemment que la protéine BAI3-SCT interagit avec le partenaire de BAI3 ELMO1 *in vitro* (cf. Résultats § I.) et *in vivo* (**figure 33B, C, D**). Dans les souris transgéniques, elle pourrait donc interférer avec la fonction du récepteur BAI3 endogène en « titrant » les protéines ELMO1 disponibles. Nos données biochimiques et morphologiques montrent qu'*in vitro* la protéine BAI3-FLT a perdu la capacité de réguler la morphogenèse et a une affinité réduite pour la protéine ELMO1. Elle pourrait donc jouer le rôle de dominant-négatif pour la protéine BAI3. Nous avons donc étudié le cervelet des souris transgéniques SCT et FLT pour analyser l'effet potentiel de la perturbation de la voie de signalisation BAI3 sur la morphogenèse et la synaptogenèse des cellules de Purkinje.

Les fibres parallèles et les fibres grimpantes sont en compétition pour leur territoire d'innervation, comme l'ont montré plusieurs études de souris mutantes (Watanabe et Kano, 2011). Cette compétition se traduit par le fait que si l'un des types de fibres « recule » dans son territoire, l'autre s'étend. Les fibres parallèles forment jusqu'à $2 \cdot 10^5$ synapses sur les cellules de Purkinje et le transporteur vésiculaire du glutamate VGluT1, spécifique de ces synapses dans le cervelet, présente un marquage intense, uniforme sur toute la hauteur de la couche moléculaire, trop dense pour être quantifié. À l'inverse, les fibres grimpantes ne forment que quelques centaines de synapses sur les dendrites proximales des cellules de Purkinje, facilement détectables à l'aide du marquage de VGluT2, un autre transporteur du glutamate spécifique de ces synapses. Dans le but de déterminer l'effet de l'expression des formes modifiées BAI3-SCT et -FLT sur l'innervation des cellules de Purkinje par les fibres grimpantes, nous avons donc co-immunomarquées des coupes parasagittales de cervelets de

souris sauvages, SCT ou FLT, avec un anticorps anti-VGluT2 et un anticorps anti-CaBP nous permettant d'observer les cellules de Purkinje dans leur intégralité (**figure 34A droite**). Sur ces coupes, nous avons mesuré la hauteur des cellules de Purkinje, du soma jusqu'à l'extrémité des dendrites, et l'extension du marquage VGluT2 (**flèches**) dans différents lobules du cervelet (**figure 34A gauche**). Aucun des paramètres mesurés ne varie de manière statistiquement significative chez les souris SCT, quel que soit le lobule analysé. En revanche, l'analyse des souris FLT montre une extension significative du marquage VGluT2 comparées aux souris sauvages dans le lobule VI (WT : $220,2 \pm 2,1 \mu\text{m}$; FLT : $238,0 \pm 2,2 \mu\text{m}$; $p < 0,05$) et dans le lobule IX (WT : $177,2 \pm 3,8 \mu\text{m}$; FLT : $202,9 \pm 6,8 \mu\text{m}$; $p < 0,01$) (**figure 34B bas droite**). Dans le lobule IX, une extension significative de la hauteur des cellules de Purkinje est également détectée (WT : $213,3 \pm 3,2 \mu\text{m}$; FLT : $234,4 \pm 4,5 \mu\text{m}$; $p < 0,05$). Ces résultats indiquent que l'expression de la forme modifiée de BAI3, BAI3-FLT, interfère avec la mise en place du territoire d'innervation des afférences excitatrices sur les cellules de Purkinje et modifie également la morphogenèse de ces neurones.

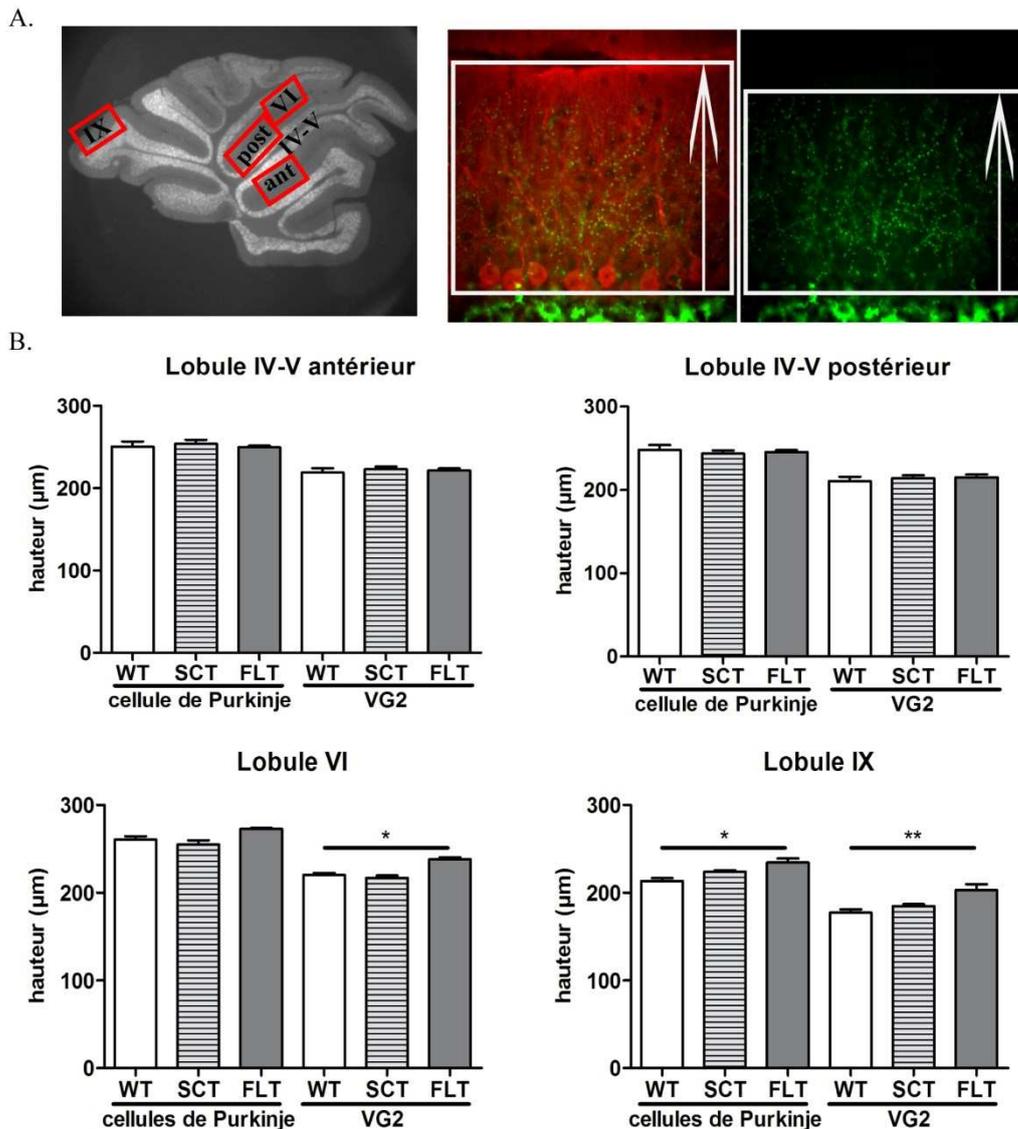


Figure 34 : Les souris transgéniques FLT présentent des modifications de la taille des cellules de Purkinje ainsi qu'une extension de l'innervation des fibres grimpanes.

A. Des coupes de cervelet de souris sauvages (WT) ou transgéniques (SCT ou FLT) ont été immunomarquées avec un anticorps anti-CaBP (rouge) spécifique des cellules de Purkinje et avec un anticorps anti-VGluT2 (vert) qui met en évidence l'innervation par les fibres grimpanes. Pour chaque marquage, les valeurs mesurées sont représentées par les flèches. Les régions de quantification dans les coupes de cervelet sont indiquées sur l'image de gauche.

B. Quantification de la hauteur moyenne des cellules de Purkinje et de l'extension moyenne du marquage VGluT2 (VG2) pour les souris WT, SCT et FLT dans différents lobules. Seules les souris FLT présentent des variations de l'extension de l'innervation des fibres grimpanes (lobules VI et IX) et de la hauteur des neurones (lobule IX). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; one-way ANOVA, test *post hoc* de Tukey; $n = 6$ animaux par genotype.

III.3.2. Le récepteur BAI3 pourrait réguler la morphogenèse des cellules de Purkinje

Nous avons observé *in vitro* que BAI3 joue un rôle dans la dendritogenèse des neurones d'hippocampe en culture, entraînant notamment une complexification de leur arborisation dendritique. Les souris FLT présentent, dans le lobule IX, une augmentation de la hauteur des cellules de Purkinje. Pour déterminer si ces modifications sont corrélées à une variation de la complexité de l'arbre dendritique de ces neurones, des cellules de Purkinje issues de souris adultes sauvages ou FLT ont été injectées, en collaboration avec le Dr Isope, avec de la biocytine remplissant toute la cellule et révélée grâce à la technique ABC (Hsu et al., 1981; Hsu et Raine, 1981) avec une tyramide couplée à un fluorophore FITC (cf. M&M § VI.2.). En utilisant la microscopie confocale à forte résolution, nous avons reconstituées les cellules de Purkinje entières en mosaïque (**figure 35A**). Nous avons ensuite utilisé le logiciel NeuronStudio pour mesurer la longueur totale de leurs dendrites, leur nombre de dendrites terminales et leur nombre d'embranchements. Les valeurs brutes obtenues pour chaque cellule sont indiquées dans le **tableau B** de la figure 35. On observe une importante variabilité des valeurs brutes au sein d'un même génotype, qui peuvent varier du simple au triple. Ces variations semblent refléter en partie la localisation des neurones dans les différents lobules. Les cellules de Purkinje des souris FLT présentent une légère tendance à une augmentation de la complexité et de la taille de leur arbre dendritique par rapport aux cellules sauvages. Mais, en moyenne, aucun des paramètres analysés ne diffère de manière significative entre les deux génotypes, que l'on prenne les données dans leur ensemble (**figure 35C**, longueur totale des dendrites WT : $6,42 \pm 0,84$ mm ; FLT : $7,05 \pm 0,50$ mm ; $p > 0,05$; nombre de dendrites terminales WT : 336 ± 44 ; FLT : 383 ± 28 ; $p > 0,05$; nombre d'embranchements WT : 298 ± 40 ; FLT : 346 ± 26 ; $p > 0,05$) ou seulement les données correspondant au lobule IX (**figure 35D**, longueur totale des dendrites WT : $5,32 \pm 0,23$ mm ; FLT : $6,53 \pm 0,59$ mm ; $p > 0,05$; nombre de dendrites terminales WT : 278 ± 18 ; FLT : 348 ± 29 ; $p > 0,05$; nombre d'embranchements WT : 244 ± 17 ; FLT : 313 ± 27 ; $p > 0,05$).

Les petites différences observées au niveau phénotypique pourraient être dues à un niveau d'expression insuffisant des protéines BAI3-SCT et -FLT. Les analyses par Western Blot et immunohistochimie suggèrent un faible niveau d'expression des transgènes dans les deux lignées transgéniques obtenues. Pour obtenir une expression plus importante des transgènes, et potentiellement observer un effet plus grand sur le phénotype des cellules de Purkinje, de nouvelles lignées sont en cours de production.

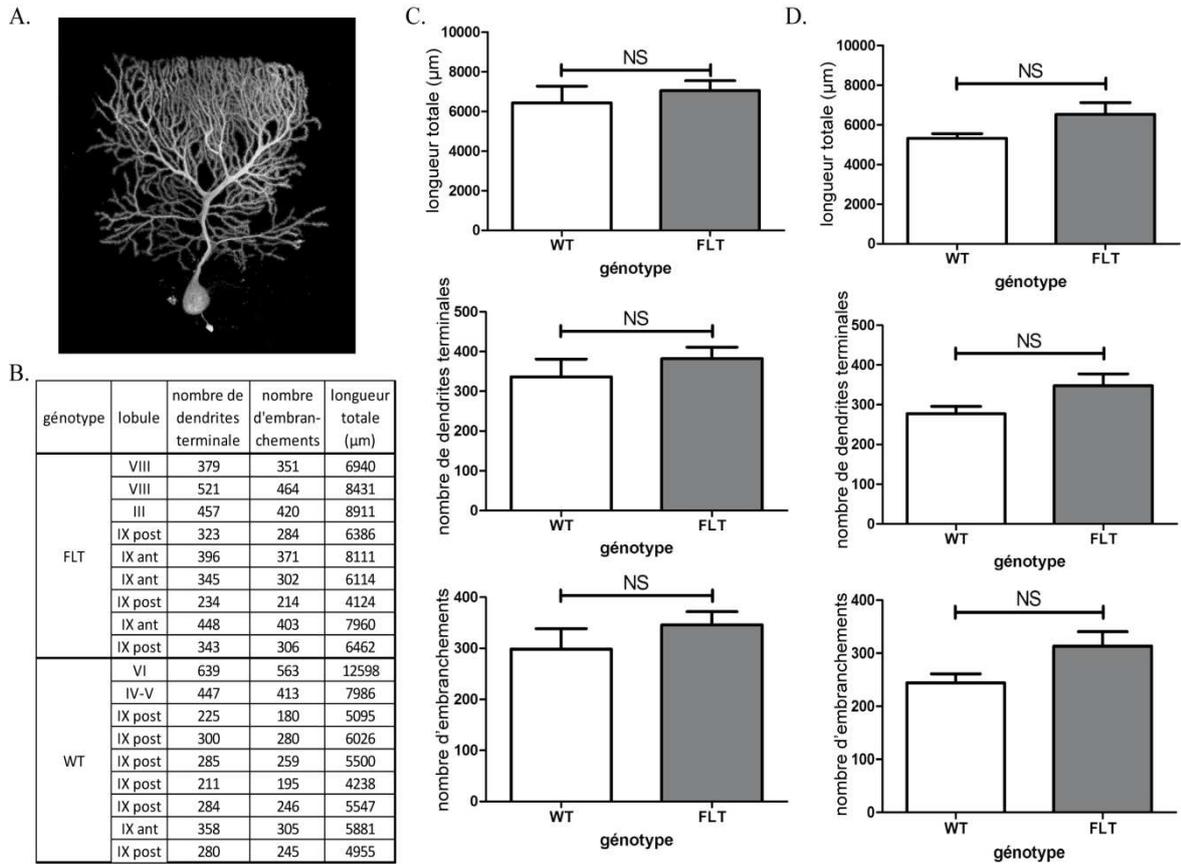


Figure 35 : L'expression de la protéine de fusion BAI3-FLT n'entraîne pas de modification significative de la morphologie des cellules de Purkinje.

A. Cellule de Purkinje injectée avec de la biocytine et révélée avec un marqueur fluorescent. Images prises à forte résolution en microscopie confocale et reconstituées en mosaïque.

B. Résultats des quantifications pour chaque cellule injectée.

C. Histogramme des moyennes obtenues pour l'ensemble des cellules. n= 9 cellules de Purkinje par génotype.

D. Histogramme des moyennes obtenues ne prenant en compte que les cellules de Purkinje localisées dans le lobule IX. NS : non significatif, *t*-test, n= 6 cellules de Purkinje pour FLT et n=7 pour WT.

III.4. Conclusion et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons cherché à déterminer la localisation de BAI3 et à vérifier la voie de signalisation et le rôle de ce récepteur dans les cellules de Purkinje *in vivo*.

Nous avons montré pour la première fois la répartition de BAI3 dans le cerveau murin. Nous avons mis en évidence son expression dans différentes zones du cerveau ainsi que dans le cortex cérébelleux, plus particulièrement dans la couche moléculaire où les cellules de Purkinje étendent leur arbre dendritique. Cependant, la faible qualité des anticorps commerciaux ne nous a pas permis d'approfondir l'étude de la localisation subcellulaire du récepteur *in vivo* et de nouvelles expériences avec des anticorps de meilleure qualité seront nécessaires.

L'étude de nos lignées de souris transgéniques nous a toutefois permis de mettre en évidence la présence des protéines de fusion BAI3-SCT et -FLT dans les épines dendritiques des cellules de Purkinje, même en absence des domaines N-terminal et transmembranaires. Corrélés aux résultats obtenus *in vitro* dans des neurones d'hippocampe en culture et aux données de la littérature, ces observations indiquent que BAI3 est concentré dans les épines dendritiques des neurones. De plus, l'observation de BAI3-SCT dans la tête des épines dendritiques des cellules de Purkinje suggère que la présence du motif QTEV à l'extrémité C-terminale du récepteur pourrait être essentielle pour l'adressage de BAI3 à la PSD.

Par ailleurs, nous avons utilisé nos souris transgéniques SCT pour vérifier *in vivo* l'interaction entre les protéines BAI3 et ELMO1 – toutes deux présentes dans les épines dendritiques des cellules de Purkinje. Nous avons observé une interaction d'ELMO1 avec la protéine BAI3-SCT, mais nous avons eu des difficultés à obtenir des résultats reproductibles. De nouvelles expériences seront réalisées sur les nouvelles souris transgéniques exprimant plus de transgène. Par ailleurs, de nouveaux anticorps dirigés contre le récepteur BAI3 endogène, plus spécifiques, pourront être générés pour réaliser l'expérience directement sur le récepteur endogène et ainsi valider l'interaction d'ELMO1 avec BAI3 dans les cellules de Purkinje où ces deux protéines sont fortement exprimées.

Enfin, nous avons analysé l'innervation des cellules de Purkinje exprimant les formes modifiées de BAI3 et avons observé une extension significative du territoire d'innervation des fibres grimpantes dans les souris FLT comparées aux sauvages dans les lobules VI et IX du cervelet, ainsi qu'une augmentation significative de la taille des cellules de Purkinje. Ce

phénotype est associé à une tendance à une complexification de l'arbre dendritique. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de BAI3 dans le contrôle de la morphogenèse des cellules de Purkinje, mais pourrait indiquer également un déficit de la formation des synapses fibres parallèles/cellules de Purkinje exprimant BAI3-FLT.

Discussion générale et perspectives

Les RCPG d'Adhésion constituent la deuxième plus large famille de RCPG et sont caractérisés par un long segment N-terminal comportant des domaines souvent retrouvés dans des protéines d'adhésion (Bjarnadóttir et al., 2004, 2007a; Schiöth et Fredriksson, 2005; Whittaker et al., 2006; Lagerström et Schiöth, 2008). Plus de la moitié de ces récepteurs est exprimée dans le SNC (Haitina et al., 2008), mais peu d'entre eux ont été caractérisés, tant du point de vue de leur localisation précise, que de leur rôle ou de leurs voies de signalisation. Ainsi, les récepteurs BAI sont exclusivement exprimés dans le SNC et ont été identifiés dans des préparations de densités postsynaptiques (Koh et al., 2001; Kee et al., 2002, 2004). Les fonctions de ces récepteurs dans le SNC restent encore mal connues. Au cours de nos travaux, nous nous sommes intéressées au récepteur BAI3 et notamment à sa localisation subcellulaire, à sa voie de signalisation et à son rôle dans le SNC. À l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo*, nous avons montré que :

- Le récepteur BAI3 est localisé dans les dendrites des neurones en développement et contrôle la dendritogenèse des neurones en régulant la longueur des dendrites ainsi que la complexité de l'arborisation dendritique.
- Le récepteur BAI3 est localisé dans les épines dendritiques des neurones matures. Son adressage à la PSD pourrait résulter de la présence du motif QTEV de liaison au domaine PDZ à son extrémité C-terminale. Il pourrait aussi jouer un rôle dans la mise en place de l'innervation excitatrice des cellules de Purkinje du cervelet *in vivo*.
- Le récepteur BAI3 interagit avec la protéine cytoplasmique ELMO1 qui appartient au GEF non conventionnel ELMO1/Dock180 de Rac1. Cette interaction participe à la régulation de la dendritogenèse, mais nos résultats suggèrent que BAI3 pourrait faire intervenir d'autres voies de signalisation en amont des RhoGTPases.

I. BAI3, un nouveau RCPG d'adhésion contrôlant la morphogenèse dendritique

I.1. BAI3 contrôle la longueur et la complexité de l'arborisation dendritique

La morphogenèse des neurones débute par le développement de filopodes à la surface du soma qui s'étendent et se différencient en axone et en dendrites (Da Silva et Dotti, 2002; Dent et al., 2007). Par la suite, les dendrites primaires se recouvrent de nouveaux filopodes qui formeront les dendrites secondaires, etc... La surexpression du récepteur BAI3 dans des neurones d'hippocampe en culture entraîne une complexification de l'arborisation dendritique, se traduisant par l'augmentation du nombre de dendrites distales, et une augmentation de la taille totale des dendrites. Des données préliminaires obtenues dans le laboratoire indiquent que l'inhibition de l'expression de BAI3 endogène à l'aide d'ARNsh dans des cellules de Purkinje en culture entraîne d'importants retards et défauts dans le développement de leur arborisation dendritique (S. Sigoillot, données non publiées). Par ailleurs, nos données sur les souris transgéniques FLT sont en faveur d'un rôle de BAI3 *in vivo* dans la morphogenèse dendritique. Une étude précédente avait déjà suggéré un rôle des récepteurs BAI dans le contrôle de la morphogenèse cellulaire puisque l'expression du récepteur BAI1 dans des cellules hétérologues induit la formation de filopodes à leur surface (Shiratsuchi et al., 1998). De plus, l'expression forte des récepteurs BAI au cours du développement dans le SNC est en accord avec ce rôle (Kee et al., 2004). Nous avons observé la présence du récepteur BAI3 dans diverses régions du SNC murin, dont l'aire rétropléniale dorsale, différents noyaux postérieurs ainsi que dans le cervelet, au niveau des noyaux profonds et dans la couche moléculaire, où les cellules de Purkinje étendent leur arbre dendritique et reçoivent la majorité de leurs synapses. L'ensemble de ces données montrent donc que le récepteur BAI3 pourrait contrôler la morphogenèse dendritique des neurones dans diverses populations neuronales *in vivo*. D'autres RCPG d'Adhésion sont impliqués dans la dendritogenèse des neurones, comme CELSR2, dont l'activation induit la neuritogenèse via le recrutement de la CaMKII. À l'inverse, CELSR3 inhibe la croissance des neurites en régulant une voie de signalisation en amont de la calcineurine (Shima et al., 2007). Ainsi, les RCPG d'adhésion jouent un rôle important dans le développement de l'arborisation dendritique des neurones.

I.2. BAI3 interagit avec ELMO1

La régulation des RhoGTPases – et donc du remodelage du cytosquelette – est un mécanisme important de la dendritogenèse. Notamment, le contrôle de l'activation de Rac1 par différents GEF a été mis en évidence dans plusieurs voies moléculaires induisant le développement et la ramification de l'arbre dendritique (Rajan et al., 1999; Katoh et Negishi, 2003; Tanaka et al., 2004; Toliás et al., 2005; Chen et al., 2010; Shirazi Fard et al., 2010). BAI1, un autre RCPG d'Adhésion du groupe des BAI, interagit avec la protéine ELMO1 dans plusieurs systèmes, notamment les macrophages et les cellules de Sertoli des testicules de souris, au niveau d'un motif RKR situé dans la queue cytoplasmique du récepteur et conservé dans BAI3 (Park et al., 2007; Elliott et al., 2010; Das et al., 2011). Le complexe ELMO1/Dock180 est un GEF pour la RhoGTPase Rac1, permettant le passage d'une conformation inactive Rac1-GDP à une conformation active Rac1-GTP (Brugnera et al., 2002; Lu et al., 2004). Nous avons pu observer que BAI3, à l'instar de BAI1, interagit avec ELMO1 *in vitro* via le motif RKR, suggérant un contrôle de l'activité de Rac1 par la protéine BAI3.

L'activité de Rac1 promeut la croissance et le branchement des microfilaments d'actine, à l'origine notamment de la formation des replis membranaires et des lamellipodes permettant l'étalement des cellules (Insall et Machesky, 2009; Ridley, 2011). L'étalement de cellules sur de la fibronectine est donc un test classique de l'activation de Rac1 (Katoh et Negishi, 2003; Johnston et al., 2008). La surexpression de BAI3 dans des cellules HEK-293H inhibe leur étalement sur fibronectine par rapport à des cellules contrôles, suggérant ainsi une inhibition de Rac1 par BAI3. Ce résultat est contraire à ce qui a été montré pour BAI1 (Park et al., 2007) et est en contradiction avec un rôle de BAI3 en amont d'ELMO1 puisqu'ELMO1 fait partie d'un GEF activateur de Rac1. Cependant, dans ce test, l'expression d'une forme mutée de BAI3 au niveau du domaine de liaison à ELMO1 supprime partiellement l'effet de BAI3 sur l'étalement des cellules, ce qui montre que cet effet passe effectivement par la liaison à ELMO1. Il se pourrait donc que, dans nos conditions, l'inhibition de l'étalement des cellules révèle une activation de Rac1. Cette différence par rapport aux autres études utilisant l'étalement des cellules sur fibronectine pourrait être due à une différence technique : nous avons utilisé ici un Cell Tracker, précédemment employé dans des observations morphologiques de neurones et d'autres types cellulaires (Tuttle et Matthew, 1991; Paramore et al., 1992), alors que la morphologie des cellules étalées est le plus souvent observée grâce au marquage des microfilaments d'actine (Katoh et Negishi, 2003; Johnston et al., 2008) ou

simplement par contraste de phase (Wells et al., 2004). Il se pourrait également que le type cellulaire utilisé dans ce test donne un résultat différent des cellules utilisées dans les autres études (HeLa ; Katoh et Negishi, 2003). Par ailleurs, il n'existe actuellement aucune donnée sur la liaison d'ELMO1 à un autre partenaire que Dock180, mais des travaux récents ont montré des effets différents dans des neurones en culture de l'inhibition de l'expression ou de la surexpression d'ELMO1 par rapport à celle de Dock180 (Kim et al., 2011). ELMO1 pourrait donc former des complexes avec d'autres protéines cytoplasmiques que Dock180, entraînant une régulation différente de l'activité de Rac1. Dans ce cas, les variations de la surface des cellules exprimant BAI3-WT par rapport au contrôle ne serait pas directement dépendantes du récepteur, mais plutôt de la voie de signalisation qu'il régule. L'activation de Rac1 par BAI1 était observée suite à la liaison d'un ligand, la phosphatidylsérine (Park et al., 2007). Les protéines solubles C1ql ont récemment été identifiées comme ligands de BAI3 (Bolliger et al., 2011). Il sera donc intéressant de déterminer l'effet de la liaison de ces ligands sur l'activation de Rac1 en aval de BAI3. Il se pourrait que BAI3 dans sa forme basale lie ELMO1, l'empêchant d'interagir avec Dock180 et d'activer Rac1. L'activation du récepteur par C1ql pourrait permettre le relargage d'ELMO1 et sa liaison à Dock180 permettant, ainsi d'activer Rac1. Cet effet a précédemment été décrit dans le cas de Disrupted In Schizophrenia 1 (DISC1) qui, à l'état basal, sequestre le GEF Kalirine7 en l'ancrant à PSD95 et empêche l'activation de Rac1. Lors de l'activation des récepteurs NMDA, le complexe DISC1/Kalirine7/PSD95 se dissocie et la Kalirine7 active Rac1 (Hayashi-Takagi et al., 2010).

Ces résultats suggèrent aussi que BAI3 pourrait être impliqué dans plusieurs voies de signalisation en amont des RhoGTPases. Certaines protéines régulant les RhoGTPases jouent des rôles opposés pour réguler le cytosquelette d'actine en fonction des besoins de la cellule. Par exemple, la Nétrine 1, en se liant à son récepteur UNC5A, induit dans les neurones deux cascades de signalisation différentes : la première active les RhoGTPases Rac1 et Cdc42 et promeut la croissance des dendrites, la seconde, plus tardive, active RhoA, réprimant la croissance de la F-actine et permettant ainsi la stabilisation des dendrites (Picard et al., 2009). La famille des récepteurs EphA était jusqu'à récemment connue pour son implication dans l'activation de Rac1 via la phosphorylation du GEF Tiam1 (Tanaka et al., 2004), mais une récente étude suggère que ces récepteurs seraient aussi impliqués dans l'activation de RhoA dans un processus de rétraction des épines dendritiques (Zhou et al., 2012).

I.3. BAI3 régule la morphogenèse dendritique via ELMO1

Les protéines ELMO1 et Dock180 ont été impliquées dans le développement des neurones en amont de Rac1 (Katoh et Negishi, 2003; Kim et al., 2011). L'expression de formes mutées de l'une ou l'autre de ces protéines dans des cellules PC12 empêche leur développement, et l'inhibition de l'expression de Dock180 dans des neurones d'hippocampe en culture entraîne une diminution de la complexité de l'arborisation dendritique de ces neurones (Katoh et Negishi, 2003; Kim et al., 2011). ELMO1 est, comme BAI3, exprimé dans les cellules de Purkinje durant le développement et chez l'adulte (Katoh et al., 2006) et nous avons observé sa présence dans l'arborisation de ces neurones au cours du développement. Malgré nos efforts, nous n'avons pu obtenir des résultats reproductibles *in vivo* quant à la liaison d'ELMO1 avec BAI3. Ceci pourrait être expliqué par différents paramètres : le temps assez court d'activation de Rac1, nécessitant une interaction rapide et brève des deux partenaires ; l'âge des animaux utilisés dans ces expériences (la voie de signalisation de BAI3 pourrait varier au cours du développement. De nouvelles expériences réalisées sur des souriceaux à P15 permettront de vérifier cette hypothèse). Par ailleurs, de nouveaux anticorps dirigés contre BAI3 endogène pourront être testés pour réaliser l'expérience directement sur le récepteur endogène. En accord avec l'implication d'ELMO1 dans la dendritogenèse via son interaction avec Rac1, l'expression des formes BAI3-WT-A ou BAI3-EMT, dans lesquelles le domaine de liaison à ELMO1 est respectivement muté ou délété, dans des neurones d'hippocampe en culture induit une augmentation de la longueur des dendrites et une complexification de l'arbre dendritique plus faibles que celles induites par la surexpression de BAI3-WT. La morphologie des neurones exprimant BAI3-FLT est proche de la morphologie des neurones contrôles exprimant la GFP soluble, indiquant un défaut dans la signalisation du récepteur BAI3-FLT plus important que pour BAI3-EMT ou BAI3-WT-A. Cet effet pourrait être dû à une gêne stérique engendrée par la GFP insérée près du motif RKR dans le récepteur BAI3-FLT, interférant avec la liaison d'ELMO1. Effectivement, relativement à la quantité de protéine cible BAI3-FLT purifiée, nous avons observé dans nos expériences d'immunoprécipitation une diminution importante de l'interaction entre BAI3-FLT et ELMO1 comparée à l'interaction avec la queue cytoplasmique seule. De manière surprenante, dans nos souris transgéniques FLT, l'arbre dendritique des cellules de Purkinje est légèrement plus complexe que celui des neurones sauvages. Ce résultat est contraire à ce qui est attendu au vu des résultats obtenus sur les neurones d'hippocampe, montrant une régulation de la dendritogenèse par BAI3 différente suivant le type de neurone analysé.

L'ensemble de ces données indique que la liaison d'ELMO1 par BAI3 est mise en jeu dans le processus de dendritogenèse, mais que d'autres voies de signalisation en aval de BAI3 pourraient également intervenir.

L'une des caractéristiques premières des RCPG est leur capacité à interagir avec des protéines G (Fredriksson et al., 2003; Kristiansen, 2004). Très peu de RCPG d'Adhésion ont été clairement impliqués dans la régulation de ces protéines G. GPR56, exprimé dans le SNC durant le développement, interagit avec la protéine $G\alpha_{12/13}$ dans les progéniteurs neuronaux, induisant l'activation de RhoA et inhibant la migration des progéniteurs neuronaux (Iguchi et al., 2008). Des variants d'épissage présentant une délétion d'une partie de la troisième boucle cytoplasmique ont été mis en évidence dans le récepteur BAI2 (Kee et al., 2002), suggérant une possible régulation des voies de signalisation de cette famille de récepteurs, et notamment d'une potentielle interaction avec des protéines G. Le développement de différentes protéines G associées à des fluorophores permettant le transfert d'énergie de bioluminescence (Bioluminescence Resonance Energy Transfert, BRET) et la création d'une banque accessible à tous par le Pr Bouvier et ses collaborateurs (Bouvier, 2012) pourra permettre de tester quelles sont la/les protéine(s) G susceptibles d'être activée(s) par BAI3. L'ensemble de ces données suggère que BAI3 régule le cytosquelette d'actine via différentes voies de signalisation : d'une part, BAI3 pourrait activer Rac1 via le complexe ELMO1/Dock180 et ainsi promouvoir la polymérisation du cytosquelette d'actine ; d'autre part, BAI3 pourrait interagir avec des protéines G pour au contraire activer RhoA et/ou inhiber Rac1/Cdc42, inhibant ainsi l'extension de la F-actine.

Enfin, BAI1 interagit avec BAP2/BAIAP2/IRSp53, une protéine mise en évidence dans la régulation du cytosquelette d'actine via le régulateur mDia. BAP2 lie Rac1 et Cdc42 sous leur forme activée à WAVE2 et Arp2/3, notamment lors du processus de spinogenèse *in vitro* (Oda et al., 1999; Fujiwara et al., 2000; Choi et al., 2005) et pourrait donc être un autre partenaire de BAI3. À nouveau, ces données appuient le rôle des récepteurs BAI dans la régulation du cytosquelette d'actine via les RhoGTPases au cours du développement neuronal.

II. BAI3 joue-t-il rôle un dans la morphogenèse des épines ?

Des études de microscopie électronique ont permis de différencier plusieurs catégories d'épines dendritiques en fonction de leur morphologie, corrélée à leur maturité et à la robustesse des synapses portées (Bourne et Harris, 2008). De nombreux récepteurs transmembranaires régulant Rac1 au cours de la dendritogenèse régulent aussi la morphogenèse des épines dendritiques, comme par exemple les récepteurs aux éphrines qui activent Rac1 via le GEF Tiam1 (Tanaka et al., 2004; Tolia et al., 2007). Le complexe ELMO1/Dock180 a été impliqué dans des processus de neuritogenèse et de spinogenèse (Kato et Negishi, 2003; Kim et al., 2011) et nous avons montré que BAI3 interagit avec ELMO1. Le récepteur BAI3 pourrait donc être impliqué dans la morphogenèse des épines dendritiques en amont du module ELMO1/Dock180/Rac1. Nos analyses morphométriques n'ont pas permis de mettre en évidence des différences dans la morphologie et la densité des épines dendritiques à la surface de neurones d'hippocampe matures exprimant pendant 48 heures les différentes formes de BAI3 par rapport aux épines des neurones contrôles. Ceci est peut-être dû à un temps trop court d'expression des constructions BAI3. En effet, les effets de l'inhibition de l'expression d'ELMO1 et de Dock180, ou, au contraire, de leur surexpression, ont été observés dans des neurones d'hippocampe en culture transfectés précocement (DIV6) et pendant une plus longue période (fixation à DIV17-19 ; Kim et al., 2011). L'effet de Disrupted In Schizophrenia 1 (DISC1), qui empêche l'activation de Rac1 en absence d'activité synaptique, sur la morphologie des épines dendritiques est différent suivant que sa modulation est de courte ou longue durée (Hayashi-Takagi et al., 2010). Il n'est donc pas exclu que BAI3 puisse être impliqué dans les processus plus précoces de formation des épines dendritiques, mais pas dans les étapes plus tardives de plasticité. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudra réaliser de nouvelles expériences sur des cultures de neurones d'hippocampe plus jeunes et qui exprimeront BAI3 ou ses formes modifiées sur une période plus longue. Les résultats obtenus permettront de déterminer si le récepteur BAI3 est impliqué dans la formation de nouvelles épines dendritiques à partir des filopodes présents à la surface des dendrites lors des stades précoces du développement.

III. *In vivo*, BAI3 joue-t-il un rôle dans la compétition fibres parallèles/fibres grimpantes sur les cellules de Purkinje?

III.1. BAI3, un RCPG d'Adhésion synaptique

Nos données *in vivo* montrent une localisation de BAI3 dans la couche moléculaire du cervelet dans laquelle sont situées les épines dendritiques des cellules de Purkinje contactées par les fibres parallèles. L'étude de nos lignées de souris transgéniques FLT nous a permis d'observer que les protéines BAI3-FLT sont présentes dans les épines dendritiques de ces neurones. De plus, nos analyses *in vitro* dans des neurones d'hippocampe en culture nous ont permis de confirmer la présence de BAI3 dans les épines dendritiques, et sa colocalisation avec PSD95 est en accord avec les données biochimiques antérieures qui ont identifié BAI3 dans les densités postsynaptiques, notamment celles des synapses fibres parallèles/cellules de Purkinje (Jordan et al., 2004; Selimi et al., 2009).

Si plus de la moitié des RCPG d'Adhésion est exprimée dans le SNC, seuls quelques-uns ont été localisés précisément. Parmi ceux-là, les récepteurs VLGR1 (groupe II) et CIRL1 et 2 (ou LEC1 et 2 ; groupe III) sont les seuls, jusqu'à présent, à avoir été détectés au niveau de la synapse. Les récepteurs CIRL1 et 2 sont impliqués dans le relargage de vésicules présynaptiques en réponse à l' α -latrotoxine, une famille de toxines spécifiques des vertébrés sécrétée par les araignées veuves noires du genre *latrodectus*. La présence des récepteurs CIRL à la membrane postsynaptique et leur interaction avec les protéines d'échafaudage postsynaptique Shank suggèrent un rôle physiologique dans l'adhésion synaptique qui reste à élucider (Tobaben et al., 2000; Südhof, 2001). VLGR1 est aussi présent à la membrane postsynaptique où il interagit avec la protéine de l'échafaudage Whirlin dans les photorécepteurs et les cellules ciliées de la cochlée (Van Wijk et al., 2006). Des mutations dans le gène codant pour ce récepteur sont retrouvées chez des patients atteints du syndrome d'Usher et se traduisent par une cécité et une surdité (McMillan et al., 2002). Ces caractéristiques suggèrent ici aussi un rôle de VLGR1 dans l'adhésion et le développement des synapses. BAI3 est donc le quatrième RCPG d'Adhésion à être clairement identifié au niveau des synapses.

Dans nos lignées de souris transgéniques SCT, les protéines de fusion BAI3-SCT sont présentes dans les épines dendritiques des cellules de Purkinje, malgré l'absence des domaines N-terminal et transmembranaires. Le récepteur BAI3 possède à son extrémité C-

terminale un motif QTEV impliqué dans la liaison au domaine PDZ, un domaine conservé dans un grand nombre de protéines de l'échafaudage postsynaptique. Nos résultats semblent en effet indiquer que la protéine soluble BAI3-SCT, qui possède le motif QTEV, est concentrée dans la tête des épines dendritiques. Des études antérieures ont mis en évidence que, dans le récepteur BAI1, le motif QTEV permet la liaison à PSD95 (Lim et al., 2002). Le motif QTEV de BAI1 permet aussi l'interaction avec BAP1, une MAGUK communément retrouvées au niveau de la PSD (Shiratsuchi et al., 1998). Ainsi, ces données suggèrent que le motif QTEV à l'extrémité de la queue cytoplasmique de BAI3 pourrait jouer un rôle déterminant dans son adressage à la PSD. Pour confirmer le rôle du motif QTEV dans la localisation postsynaptique de BAI3, il sera nécessaire de générer des mutants dans lesquels ce motif sera délété, et observé si leur adressage à la PSD est aboli.

III.2. BAI3 contrôle-t-il la compétition synaptique ?

Une récente étude a identifié un ligand extracellulaire de BAI3 : les protéines C1ql (Bolliger et al., 2011). La protéine C1ql1 est exprimée spécifiquement dans les neurones de l'olive inférieure qui contactent les cellules de Purkinje au niveau de leurs épines dendritiques proximales (Iijima et al., 2010 ; données non publiées du laboratoire). La faible spécificité des outils actuellement disponibles n'a pas permis de localiser précisément le récepteur BAI3 endogène dans les cellules de Purkinje. Il nous a notamment été impossible de définir si BAI3 est restreint aux épines dendritiques distales portant les synapses des fibres parallèles et au niveau desquelles il a été identifié (Selimi et al., 2009), ou s'il est également présent dans les épines dendritiques proximales portant les synapses des fibres grimpantes. Des travaux en cours dans l'équipe permettront de purifier les synapses fibres grimpantes/cellules de Purkinje et d'identifier leur composition moléculaire grâce à l'approche SYProt, qui associe la purification par affinité et la spectrométrie de masse (Selimi et al., 2009). Ces résultats permettront, entre autres, de conclure sur la présence de BAI3 dans les épines dendritiques proximales portant les synapses des fibres grimpantes. De plus, le développement d'anticorps plus spécifiques, comme les anticorps simple domaine de camélidés (single-domain Antibody, sdAb, aussi connu sous le nom de nanobody ; Muyldermans, 2001), permettra de compléter cette étude.

In vitro, l'ajout de C1ql dans le milieu de culture de neurones d'hippocampe induit une diminution de la densité synaptique (Bolliger et al., 2011). Nous avons montré que les souris transgéniques FLT présentent, dans certains lobules, une extension significative du territoire

d'innervation des fibres grimpantes. Dans l'un des lobules, la hauteur de la couche moléculaire est également augmentée, et cette augmentation semble corrélée à l'extension des fibres grimpantes. Néanmoins, un second lobule présentant cette variation de l'innervation des fibres grimpantes ne montre pas de modification de la hauteur de la couche moléculaire. Cette extension pourrait donc découler d'une interférence induite par la protéine modifiée BAI3-FLT avec la signalisation du récepteur endogène. Une extension du territoire d'innervation des fibres grimpantes est classiquement observée lors d'un défaut dans la mise en place des synapses fibres parallèles/cellules de Purkinje, comme par exemple dans les souris mutantes *GluRδ2^{-/-}* et *Cbln1^{-/-}* (Ichikawa et al., 2002; Miyazaki et al., 2010). BAI3 pourrait donc réguler la formation des synapses émanant des fibres parallèles. Quel serait alors le rôle de l'expression du ligand de BAI3 par les fibres grimpantes ? Elle pourrait réguler l'innervation des cellules de Purkinje en inhibant la formation de synapses par les fibres parallèles au niveau du territoire des fibres grimpantes. Cet effet sur la synaptogenèse sera vérifié dans de nouvelles souris transgéniques exprimant plus de protéines de fusion BAI3-FLT. De plus, l'inhibition de l'expression de BAI3 endogène spécifiquement dans les cellules de Purkinje à l'aide d'infections lentivirales d'ARNsh permettra de déterminer le rôle exact du récepteur dans la mise en place de l'innervation excitatrice de ces neurones.

Les protéines du complément C1q et C3, impliquées dans le développement du SNC, ont été mises en évidence dans les processus d'élimination des synapses surnuméraires (Stevens et al., 2007; Perry et O'Connor, 2008). Ainsi, la protéine C1q est exprimée dans les cellules ganglionnaires de la rétine en présence d'astrocytes immatures et est localisée à la synapse. L'élimination des synapses ainsi « étiquetées » par C1q serait ensuite effectuée par les astrocytes immatures sous-jacents (Stevens et al., 2007). Cependant, les protéines du complément sont solubles et nécessitent de se lier à des récepteurs membranaires pour étiqueter efficacement les synapses à éliminer et ces récepteurs sont encore peu connus. La mise en évidence de BAI3 comme récepteur des protéines C1q suggère sa possible implication dans l'élimination synaptique (Bolliger et al., 2011) et nos résultats sur les cellules de Purkinje exprimant BAI3-FLT tendent à confirmer le rôle de BAI3 dans la mise en place des synapses excitatrices. Il a été montré que BAI1 joue un rôle important dans la phagocytose (Park et al., 2007) et il est exprimé dans les astrocytes, où il semble se concentrer autour de particules internalisées – phagocytées – par les cellules gliales (Sokolowski et al., 2010). Par ailleurs, *Cbln1*, une autre protéine de la superfamille des protéines du complément, forme un complexe tripartite avec *NRXβ1* et *GluRδ2* au niveau des synapses fibres

parallèles/cellules de Purkinje (Matsuda et Yuzaki, 2011). Il serait intéressant de déterminer si, comme pour la Cbln1, les protéines C1ql peuvent être engagées dans un complexe tripartite avec BAI3 et BAI1. BAI3 pourrait lier les protéines C1ql libérées par les fibres grimpantes. Les synapses ainsi étiquetées seraient reconnues par BAI1, situé à la surface des cellules gliales (Sokolowski et al., 2010), qui induirait la formation d'une coupe de phagocytose pour éliminer la synapse non désirée.

IV. BAI3, une nouvelle cible thérapeutique?

IV.1. BAI3 est-il impliqué dans les maladies neurodéveloppementales ?

Deux SNP associés aux symptômes désorganisés de la schizophrénie, rs1415031 et rs9446083, ont été localisés dans la région 5' du neuvième exon du gène codant le récepteur BAI3. D'autres SNP associés à BAI3 ont été analysés, et 20% d'entre eux ont été associés de façon significative avec ces symptômes (DeRosse et al., 2008). Sur le plan cellulaire, l'une des caractéristiques de la schizophrénie consiste en une simplification de l'arborisation dendritique des neurones et une diminution du nombre d'épines dendritiques (Glantz et Lewis, 2000; Kalus et al., 2000; Garey, 2010). Les résultats que nous avons obtenus impliquant le récepteur BAI3 dans la croissance et le branchement des dendrites suggèrent donc les bases cellulaires de l'association entre BAI3 et certains symptômes de la schizophrénie. Par ailleurs, l'étude de souris invalidées pour le gène codant BAI2 (BAI2^{-/-}) a mis en évidence des modifications de leur comportement, notamment une diminution de l'anxiété pouvant révéler une résistance au stress (Okajima et al., 2011). Le stress diminue la neurogenèse dans l'hippocampe (Gould et al., 1998), et les souris BAI2^{-/-} présentent une augmentation du nombre de neurones nouvellement formés à cet endroit (Okajima et al., 2011), indiquant un rôle de BAI2 dans le contrôle des stades précoces du développement neuronal. Cependant, il sera intéressant de déterminer les éventuels défauts dans la morphologie neuronale engendrés par l'absence du récepteur BAI2 dans les souris BAI2^{-/-}. De même, la génération de souris invalidées pour le gène codant BAI3 sera essentielle pour compléter notre étude en comparant notamment les éventuelles variations comportementales – défauts d'interactions sociales et variation de l'anxiété – de ces animaux par rapport à des souris sauvages. En outre, il sera aussi intéressant de déterminer la complémentarité et/ou la redondance des fonctions des récepteurs de la famille des BAI dans le développement des neurones, en analysant par exemple la morphologie du SNC et des neurones de souris double-mutantes BAI2^{-/-}/BAI3^{-/-}, BAI1^{-/-}/BAI2^{-/-} et BAI1^{-/-}/BAI3^{-/-}.

Enfin, l'autisme et les retards mentaux sont aussi des maladies neurodéveloppementales dans lesquelles des modifications de la morphologie neuronale ont été observées. Il semble par exemple que les patients atteints d'autisme présentent une densité accrue d'épines dendritiques mais une simplification de l'arborisation dendritique des neurones (Huttenlocher, 1970, 1974; Raymond et al., 1996). Il sera nécessaire par la suite de déterminer si de telles variations peuvent aussi reposer sur une dérégulation de l'expression des récepteurs BAI.

IV.2. BAI3, cible thérapeutique potentielle dans le traitement des cancers ?

Comme nous l'avons vu en introduction, le premier des trois membres de la famille des récepteurs BAI, BAI1, a été caractérisé comme gène cible du suppresseur de tumeur p53 (Nishimori et al., 1997). Par la suite, des études ont montré l'existence d'une corrélation entre la diminution de l'expression des récepteurs BAI et la progression des gliomes vers leur forme maligne : les glioblastomes et leur néovascularisation (Shiratsuchi et al., 1997). De plus, un criblage génétique réalisé sur des tumeurs issues de différents organes a mis en évidence la présence de différentes mutations dans les gènes codant les récepteurs BAI dans certains types de cancers. En particulier, BAI3 est muté dans les cancers du poumon non à petites cellules (Kan et al., 2010). La régulation du cytosquelette d'actine par les RhoGTPases joue un rôle important dans le développement tumoral. Rac1 est notamment impliqué dans le départ en migration des cellules invasives et dans l'angiogenèse tumorale. Dans les gliomes, la suractivation de Rac1 par le GEF non conventionnel ELMO1/Dock180 joue un rôle important dans la migration des cellules invasives (Jarzynka et al., 2007). La voie de signalisation ELMO1/Dock180/Rac1 est aussi impliquée dans la régulation de l'angiogenèse essentielle au développement tumoral (Kaur et al., 2005; Jeong et al., 2006; Kang et al., 2006; Epting et al., 2010; Klenotic et al., 2010). Nos travaux ont mis en évidence l'interaction du récepteur BAI3 avec la protéine cytoplasmique ELMO1 et son implication dans le contrôle de l'activation des RhoGTPases. Notamment, nos données suggèrent une inhibition de Rac1 dans des cellules hétérologues au cours du processus d'étalement. Ce processus précède la migration cellulaire dans plusieurs systèmes. Ainsi, BAI3 pourrait réguler différentes voies en amont des RhoGTPases selon le type cellulaire dans lequel il est exprimé, et diminuer la migration des cellules malignes. La présence de mutations dans sa queue cytoplasmique (Kan et al., 2010) pourrait induire un mauvais repliement de la protéine, empêchant son interaction avec les partenaires intracellulaires menant à ces régulations, donnant ainsi lieu à une aggravation du processus de tumorigénèse. Ces données suggèrent donc l'implication des récepteurs BAI dans le contrôle de la tumorigénèse, notamment lors de la métastatisation et de

la formation de tumeurs secondaires, qui nécessitent un important remodelage du cytosquelette d'actine.

De nombreuses voies de signalisation impliquées dans le développement normal du SNC jouent également un rôle dans la tumorigenèse et l'angiogenèse (Wechsler-Reya et Scott, 2001; Chédotal et al., 2005). Par exemple, les molécules de guidage axonal sémaphorines et leur récepteur neuropiline 1, ou encore les molécules Slit et leurs récepteurs ROBO ont été caractérisées dans la progression tumorale (Chédotal et al., 2005). Ainsi, la mise en évidence de BAI3 en amont du module ELMO1/Rac1, fortement impliquée dans le développement et la métastatisation des cancers, constitue une nouvelle ouverture dans la recherche et le développement de molécules thérapeutiques. De plus, les récepteurs BAI appartiennent à l'importante famille des RCPG qui, par leur diversité structurale, le grand nombre de ligands et les multiples voies de signalisation qu'ils activent, sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et constituent l'une des cibles majeures des molécules thérapeutiques actuellement sur le marché et en développement (Bjarnadóttir et al., 2007; Bridges et Lindsley, 2008; Rosenbaum et al., 2009; Bouvier, 2012).

Conclusion générale

Au cours de ces travaux, nous avons montré que le récepteur BAI3, localisé à la surface des dendrites en formation, régule le développement de l'arborisation dendritique, partiellement via son interaction avec ELMO1. Chez l'adulte, il se concentre dans la tête des épines dendritiques, au niveau de la PSD, probablement grâce au motif QTEV de liaison aux domaines PDZ situé à son extrémité C-terminale. Nos données suggèrent aussi que BAI3 pourrait être impliqué dans la compétition entre les fibres parallèles et les fibres grimpantes pour leur territoire d'innervation sur les cellules de Purkinje. D'un point de vue plus général, nos travaux mettent en évidence l'implication du RCPG d'Adhésion BAI3 dans le développement neuronal via la régulation des RhoGTPases.

Différentes questions seront à aborder ultérieurement. Tout d'abord, il faudra déterminer si BAI3 régule le développement précoce des épines dendritiques. En effet, nous avons montré qu'il n'est pas impliqué dans la plasticité des épines, mais il semble en revanche jouer un rôle dans la mise en place de l'innervation excitatrice des cellules de Purkinje. Dès lors, il est possible que BAI3 permette la stabilisation des épines en formation, ou au contraire induise leur élimination. Les ligands de BAI3, les protéines C1ql, ont été mis en évidence dans l'inhibition de la formation des synapses. Il sera donc nécessaire de déterminer le rôle exact de ces protéines au niveau des neurones de l'olive inférieure où elles sont exprimées, notamment dans la mise en place des synapses fibres grimpantes/cellules de Purkinje. Enfin, les données que nous avons obtenues suggèrent l'existence de plusieurs cascades intracellulaires en aval du récepteur BAI3 dans la régulation du développement neuronal. L'une d'elles semble impliquer le GEF non conventionnel ELMO1/Dock180 et induirait l'activation de Rac1. Il faudra par la suite mettre en évidence de manière directe la régulation par BAI3 de l'activation de Rac1 dans les neurones en développement. Il sera également nécessaire de déterminer les autres partenaires, notamment les protéines G, qui interagissent avec BAI3 dans le cytoplasme.

De manière plus générale, nous avons montré le rôle important du récepteur BAI3 dans le développement neuronal. Étant donné le possible lien génétique existant entre ce récepteur et certains symptômes de la schizophrénie, nos travaux identifient les récepteurs BAI comme de nouveaux acteurs de la morphogenèse neuronale et offrent ainsi de nouvelles perspectives dans l'étude des maladies neurodéveloppementales. Des modèles animaux délétés du gène

codant pour BAI3 devront notamment être générés pour analyser, par des études comportementales, l'implication de ce récepteur dans les différents symptômes de ces maladies.

Annexe : Matériels et méthodes

I. Constructions

Les différentes constructions BAI3 ont été clonées dans le plasmide pEGFP-C2 (BD Biosciences Clontech, #6083-1), sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus humain CMV. La construction codant pour BAI3-SCT a été réalisée en fusionnant l'ADN murin codant pour la partie C-terminale de BAI3 (résidus 1166 à 1522) en 3' de l'ADN codant pour l'eGFP. La construction BAI3-FLT a été générée en insérant l'ADN codant pour l'eGFP après le codon correspondant au résidu 1349 de la protéine BAI3. Pour la construction BAI3-EMT, la queue cytoplasmique de BAI3 a été remplacée après le codon correspondant au résidu 1174 par la séquence codant pour l'eGFP. La construction BAI3-WT correspond à la séquence codante intacte de BAI3 dans le vecteur pEGFP-C2. Pour la construction BAI3-WT-A, la séquence codant pour le motif RKR (résidus 1431-1433 ; 5'aggaagag 3') a été muté en une séquence codant AAA (5'GCCGCCGC 3') dans le plasmide codant pour BAI3-WT à l'aide du kit Stratagene's QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, #200518), selon les indications du fabricant.

II. Anticorps

Les anticorps primaires utilisés au cours de nos travaux sont listés dans le **tableau 1**. Un bref résumé des anticorps secondaires utilisés pour l'immunomarquage et le Western Blot est donné dans le **tableau 2**.

anticorps	espèce	spécificité/épitope	utilisation	concentration	référence
anti-ELMO1	chèvre	peptide synthétique: PKEPSNYDFVYDCN, aa 714-727 du domaine C-terminal d'ELMO1 humain	IHC, WB	1/1000, 1/500	Abcam #ab2239
anti-VGluT1	cochon d'Inde	peptide synthétique linéaire de VGluT1 de rat	ICC	1/500	Millipore #AB5905
anti-BAI3	lapin	peptide synthétique correspondant à la 3ème boucle cytoplasmique de BAI3 humain	IHC	1/1000	Imgenex #IMG71620
anti-BAI3	lapin	fragment recombinant de 124 aa du domaine N-terminal de BAI3 humain	ICC	1/200	Sigma-Aldrich #HPA015963
anti-CaBP	lapin	calbindine D-28k recombinante de rat	IHC	1/5000	Swant #CB38
anti-GFP	lapin	GFP recombinante d' <i>Aequorea victoria</i>	IHC, ICC, IP, WB	1/100, 1/500, 3,3µg/mg, 1/2500	Abcam #ab6556
anti-GFP	lapin	GFP native d' <i>Aequorea victoria</i>	IHC, WB	1/500, 1/2500	Millipore #AB3080
anti-VGluT2	souris	aa 501-582 du domaine C-terminal de VGluT2 de rat	IHC	1/100	Neuromab #N29/29
anti-CaBP	souris	calbindine D-28k d'intestin de poulet	IHC	1/5000	Swant #300
anti-c-myc	souris	EQKLISEEDL (aa 410-419) du produit de l'oncogène humain <i>c-myc</i>	ICC, WB	1/500, 1/10000	Sigma-Aldrich #M4439
anti-PSD95	souris	PSD95 de rat	ICC	1/200	Thermo Scientific #MA1-046
anti-synaptophysine	souris	aa 205-306 de la synaptophysine de rat	ICC	1/200	BD Biosciences #611880

← **Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages (immunohistochimie, IHC ; immunocytochimie, ICC) et/ou pour la biochimie (Western Blot, WB).**

anticorps	utilisation	concentration	référence
Alexa Fluor® 488 âne anti-souris IgG (H+L)	IHC, ICC	1/1000	Invitrogen #A21202
Alexa Fluor® 488 âne anti-lapin IgG (H+L)	IHC, ICC	1/1000	Invitrogen #A21206
Alexa Fluor 568 âne anti-souris IgG	IHC, ICC	1/1000	Invitrogen #A10037
Rhodamine Red-X-conjugated âne anti-souris IgG (H+L)	IHC, ICC	1/1000	Jackson IR #715-295-151
Biotinylated cheval anti-chèvre IgG (H+L)	IHC	1/2500	Vector Laboratories #BA9500
Biotin-SP-conjugated F(ab') ₂ fragment âne anti-lapin IgG (H+L)	IHC	1/2500	Jackson IR #711-066-152
Peroxidase-conjugated F(ab') ₂ fragment âne anti-lapin IgG (H+L)	IHC	1/500	Jackson IR #711-036-152
Peroxidase-conjugated IgG fraction monoclonal souris anti-lapin IgG	WB	1/25000	Jackson IR #211-032-171
Peroxidase-conjugated chèvre anti-souris IgG	WB	1/25000	Jackson IR #115-035-174
Peroxidase-conjugated IgG fraction monoclonal souris anti-chèvre IgG	WB	1/50000	Jackson IR #205-032-176

Tableau 2 : Anticorps secondaires utilisés en IHC, ICC et WB.

III. Culture de cellules HEK-293H

III.1. Plastiques et milieux

Les plaques et tubes utilisés en culture cellulaire proviennent de Falcon ou de Nunc.

Lamelles en verres	Marienfeld GmbH, #01 115 40, No1 - 14 mm Ø
Poly-D-lysine PDL :	10 µg.mL ⁻¹ poly-D-lysine (PDL, Sigma, #P7280) dans H ₂ O stérile (Sigma, #W4502)
Milieu complet :	DMEM-glutamax 4,5 g/L glucose, + pyruvate (Gibco, #31966) 10% (v/v) sérum de veau fœtal (SVF, Gibco, #10270, lot 41F4304K) 1% (v/v) pénicilline/stréptomycine (Gibco, #15140)
Milieu sans antibiotique :	DMEM-glutamax 4,5 g/L glucose, + pyruvate 10% (v/v) sérum de veau fœtal
Tampon phosphate Salin (PBS 1X) :	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄

PFA 4% : 4% (w/v) paraformaldéhyde (Sigma, #16005)
PBS 1X

III.2. Culture des cellules HEK-293H

Les cellules HEK-293H (Gibco, # 11631-017) sont maintenues en culture dans des flasques de 75 cm²ensemencées avec 30000 cellules.cm⁻² dans un incubateur spécifique à 37°C, 5% de CO₂ et 100% d'humidité. Pour les expériences, des lamelles disposées dans des plaques 4 puits Nunc (Thermo Fisher #76740) sont incubées 1 heure à température ambiante avec de la PDL à 10 µg.mL⁻¹, rincées 3 fois à l'eau stérile et séchées sous la hotte. Les cellules sont rincées au PBS 1X stérile (Gibco, #14040) avant d'être détachées avec 1 mL de trypsine-EDTA (Gibco, #25200) préalablement réchauffée à 37°C et laissée une minute sur les cellules à température ambiante. L'action de la trypsine est arrêtée en ajoutant 5 mL de milieu sans antibiotique. Chaque puits est ensemencé avec 5.10⁴ cellules.

III.3. Principe de transfection des cellules HEK-293H

Les cellules sont transfectées 24 heures après leur ensemencement sur lamelle. Pour un puits (i.e. 1,9 cm²), 2 µL de Lipofectamine-2000 (Invitrogen, #11668019) et 0,8 µg de plasmide (cf. § I.) pour 100 µL de milieu DMEM sont utilisés pour la transfection suivant le protocole Invitrogen. Les cellules sont ensuite incubées pendant 48 heures avant d'être fixées pour l'immunomarquage.

III.4. Test d'étalement cellulaire

Les cellules HEK-293H sont ensemencées à la concentration de 2,5.10⁵ cellules par puits dans une plaque 6 puits précédemment incubée une heure à température ambiante avec la PDL à 10 µg.mL⁻¹. Après 24 heures de croissance, les cellules sont transfectées avec les différentes constructions présentées en I. avec 4 µg d'ADN en utilisant de la Lipofectamine-2000 suivant le protocole Invitrogen. Pour observer la morphologie des cellules, nous avons utilisé le Cell TrackerTM CMPTX (Invitrogen, #C34552), une sonde fluorescente capable de traverser la membrane plasmique et qui, une fois dans la cellule, réagit avec les thiols endogènes et est transformé en un produit imperméable, incapable de ressortir. Après une nuit de transfection, les cellules sont incubées 30 minutes avec du Cell Tracker à une concentration de 2,5 µM dilué dans du DMEM, puis 30 minutes dans du milieu sans antibiotique, ce qui permet la modification du groupe chlorométhyle du Cell Tracker. Les cellules sont alors détachées mécaniquement avec du milieu sans antibiotique, sont incubées dans un tube Falcon de 15 ml

pendant 30 minutes à 37°C et 5% CO₂, puis centrifugées 3 minutes à 1000 rpm. Les cellules sont resuspendues dans du DMEM à la concentration de 10⁵ cellules.mL⁻¹. 5.10⁴ cellules sont finalement déposées sur des lamelles préalablement traitées à la fibronectine 10 µg.mL⁻¹ et bloquées avec 1% d'albumine de sérum bovin (Bovin Serum Albumin, BSA, Sigma, #A1933). Les cellules sont mises à étaler dans l'incubateur durant 5 ou 30 minutes puis fixées par addition d'un volume équivalent de PFA 4% (concentration finale de 2%) pendant 30 minutes.

IV. Souris

IV.1. Fond génétique

Les constructions SCT et FLT présentées en I. ont été placées sous le contrôle du promoteur L7-PCP2 spécifique des cellules de Purkinje dans le cervelet, et injectées dans le pronucleus mâle de zygotes de souris Swiss Webster (Rockefeller, NY, USA). Les fondateurs de lignées obtenus ont été recroisés avec des souris FVB/N, une lignée caractérisée par un taux de fécondité élevé et une certaine robustesse. Les souris contrôles proviennent de la même portée ou d'une lignée exprimant une forme soluble de la GFP sous le contrôle du promoteur L7-PCP2

IV.2. Animalerie

Les animaux sont élevés dans l'animalerie conventionnelle de l'IFR83 ou du CIRB, en environnement contrôlé à une température de 21°C ± 2°C, avec une photopériode de 12 heures.

IV.3. Géotypage des souris transgéniques FLT et SCT

IV.3.1. Solutions

Tampon de lyse :	50 mM Tris-HCl 100 mM EDTA 0,5% (v/v) SDS pH 8
Protéinase K :	10 mg.mL ⁻¹ dans H ₂ O
Tampon Tris Acétate EDTA (TAE) 1X :	40 mM Tris 20 mM acide acétique 1 mM EDTA

Gel d'agarose 2% : TAE 1X
 2% (w/v) agarose (Invitrogen, #16500)
 10 µL GelRed™ (FluoProbes)

IV.3.2. Protocole de géotypage des souris FLT et SCT

amorce	séquence amorce 5' to 3'
L7Ven-R	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG
BAI3FLTas	GATTTCCAGTGTCCAGGTGCAGT
L7BAI3sens	AGGGATAGAACCCAGGGCTTTGAT

Tableau 3 : Séquence des amorces utilisées.

Les biopsies de queues de souris sont digérées dans 250 µL de tampon de lyse supplémenté de 12,5 µL de protéinase K, 4 heures à 55°C et 900 rpm. Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 13000 rpm, puis dilués au 1/100^{ème} dans de l'eau stérile. Le mélange suivant est préparé pour chaque échantillon :

4 µL de 5X FIREPol® Master Mix (Solis BioDyne, #04-11-00115)

0,2 µL de L7Ven-R (10 µM)

0,2 µL de BAI3FLTas (10 µM)

0,2 de L7BAI3sens (10 µM)

13,4 µL d'H₂O stérile

2 µL d'ADN dilué au 1/100^{ème}

Les paramètres utilisés pour la PCR sont détaillés dans le **tableau 4**.

étape	cycles	températures (°C)	durée
1. dénaturation initiale	1	94	5 minutes
2. dénaturation, hybridation des amorces et élongation	40	94	30 secondes
		60	30 secondes
		72	30 secondes
3. élongation	1	72	10 minutes
4. refroidissement	1	4	infini

Tableau 4

Le produit de PCR est séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose 2% avec du tampon TAE 1X et observé par illumination ultraviolette ($\lambda = 302 \text{ nm}$).

V. PCR quantitative (qPCR) et transcription inverse-qPCR (RT-qPCR)

V.1. Extraction de l'ADN génomique

Pour quantifier le nombre de copies de transgène insérées dans les lignées de souris SCT et FLT, des expériences de qPCR ont été réalisées sur des extraits d'ADN génomique. Un échantillon de queue de chaque animal analysé est digéré dans 615 μL de TSE (Tris 25mM pH 8.0, EDTA 25mM pH 8.0, NaCl 75mM, 1% SDS) supplémenté de 15 μL de protéinase K à 55°C durant une nuit. Cent cinquante μL de NaCl 6 M sont ajoutés et l'échantillon est vortexé 5 secondes puis centrifugé 4 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est repris, additionné de 500 μL d'isopropanol et agité doucement avant d'être centrifugé à nouveau 4 minutes à 13000 rpm. Le culot d'ADN est lavé avec 500 μL d'éthanol 70%, séché à 55°C puis dissous dans 100 μL d'eau traité au DiEthylPyrocarbonate (DEPc).

V.2. Quantification du taux d'expression des transgènes

V.2.1. Extraction d'ARN

Pour mesurer le taux d'expression des transgènes, la quantité d'ARNm a été analysée par RT-qPCR. Le cervelet de souris transgéniques SCT ou FLT ou de souris sauvages (contrôles) est homogénéisé dans 1 mL de trizol (Invitrogen, #15596-018) selon le protocole Invitrogen puis dissous dans 40 μL d'eau sans RNases. Après dosage, les ARN sont conservés à -80°C.

V.2.2. Synthèse des ADNc - transcription inverse

Les ARN sont traités à la DNase I (Invitrogen, # 18047019) puis chauffés à 65°C pendant 10 minutes. Les ARN sont préparés à une concentration de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et placés sur la glace. Le mix de transcription inverse est préparé selon le protocole du fournisseur (Applied Biosystems, #4374966), résumé dans le **tableau 5**.

solutions	volumes (par tube, μL)
10X RT buffer	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT random primers	2
MultiScribe reverse transcriptase	1
RNase inhibitor	1
Nuclease free water	3,2
ARN à 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	10

Tableau 5 : Préparation du mix de transcription inverse.

Les paramètres utilisés pour la transcription inverse sont détaillés dans le **tableau 6**.

étape	températures ($^{\circ}\text{C}$)	durée
1.	25	10 minutes
2.	37	120 minutes
3.	85	5 secondes
4.	4	infini

Tableau 6 : Paramètres utilisés pour la transcription inverse des ARNm des extraits de cervelet des souris transgéniques.

V.3. Protocole de PCR quantitative

Le gène de référence utilisé est le gène codant pour la GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase (GAPDH), catalysant la seule réaction d'oxydation de la glycolyse. Ce gène « de ménage » a été choisi car il présente une expression stable et comparable à celle du gène codant pour BAI3 dans les neurones.

Pour chacun des deux gènes GAPDH et BAI3, une gamme est préparée. Pour cela, les ADNg ou les ADNc des différents échantillons sont additionnés et des dilutions successives au $1/10^{\text{ème}}$, $1/20^{\text{ème}}$, $1/50^{\text{ème}}$, $1/100^{\text{ème}}$ et $1/500^{\text{ème}}$ sont réalisées dans de l'eau stérile. Les échantillons à analyser sont, eux, dilués au $1/50^{\text{ème}}$, correspondant au milieu de la gamme. La qPCR est effectuée à l'aide du kit LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche, #04707516001). Les amorces utilisées pour chacun des deux gènes sont listées dans le **tableau 7**.

amorce	séquence amorce 5' to 3'
GAPDH sens	TCCTGCGACTTCAACAGCAACT
GAPDH antisens	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTTG
BAI3 sens	CTGGCCATGACAGATAAACG
BAI3 antisens	CTCTCCGAAGAATGCAGTGG

Tableau 7 : Séquences des amorces du gène contrôle GAPDH et du gène d'intérêt BAI3 utilisées en qPCR.

Les réactions sont effectuées dans un volume de 11 μL :

6,25 μL de LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master

0,31 μL d'amorce sens (10 μM)

0,31 μL d'amorce antisens (10 μM)

3,13 μL d' H_2O stérile

1 μL d'ADN dilué au 1/50ème

Les paramètres utilisés pour la qPCR sont décrits dans le **tableau 8**.

températures ($^{\circ}\text{C}$)	cycles	durée
95	1	15 minutes
95	40	10 secondes
60		15 secondes
72		15 secondes
95	1	5 secondes
65 à 97	1	acquisition tous les 5°C
40	1	10 secondes

Tableau 8 : Paramètres de qPCR.

Afin de dissocier les amplicons spécifiques des non-spécifiques, une courbe de dissociation est générée pour chaque transcrit. La quantification de l'expression du gène d'intérêt est normalisée par rapport à l'expression du gène de référence, GAPDH, et par rapport à un échantillon contrôle. L'expression relative est évaluée grâce à la méthode comparative δ - δCt (Pfaffl, 2001). La quantification est réalisée à partir de trois expériences indépendantes.

VI. Immunomarquages

VI.1. Immunocytochimie (ICC)

VI.1.1. Solutions

Tampon d'incubation : 0,2% (v/v) Triton-X100 (Sigma, #X100)
PBS 1X

Tampon de blocage : 4% (v/v) sérum d'âne (Sigma, #D9663)
Tampon d'incubation

Hoechst : 2 μ L Hoechst 10 mg.mL⁻¹
50 mL PBS/0,005% Triton-X100

VI.1.2. Protocole d'immunocytochimie

Les cellules sont fixées durant 30 minutes dans leur milieu additionné d'un volume équivalent de PFA 4% (concentration finale du PFA : 2%), puis rincées 3 fois dans du PBS 1X. Elles sont ensuite incubées 30 minutes dans le tampon de blocage, puis 1 heure 30 - 2 heures à température ambiante dans l'anticorps primaire dilué dans le tampon d'incubation. Après trois rinçages, les cellules sont incubées dans l'anticorps secondaire dilué dans le tampon d'incubation 1 heure 30 - 2 heures à température ambiante, rincées, puis incubées 15 minutes dans du Hoechst. Les lamelles sont ensuite montées sur lames dans du milieu de montage ProLong® Gold (Invitrogen, #P36930).

VI.1.3. Marquage des microfilaments d'actine à la phalloïdine

Les cellules sont fixées comme précédemment puis incubées 5 minutes dans de la glycine 0,15 M. Elles sont ensuite rincées 2 fois dans du PBS 1X puis incubées 10 minutes dans le tampon d'incubation, 30 minutes dans du PBS/4% sérum d'âne et enfin 30 minutes dans la phalloïdine-Tetraméthyle Rhodamine IsoThioCyanate (TRITC, Sigma, #P1951) diluée à 100 nM dans du PBS 1X.

VI.2. Immunohistochimie (IHC)

VI.2.1. Solutions

Sucrose 10% : PBS 1X
10% (w/v) sucrose

Sucrose 30% : PBS 1X

	30 % (w/v) sucrose
PGTA :	PBS 1X 1% (v/v) Triton-X100 0,2% (w/v) gélatine 0,02% (w/v) sodium azide
PGT :	PBS 1X 1% (v/v) Triton-X100 0,2% (w/v) gélatine
Blocage Avidin :	PGT 4% (v/v) sérum d'âne 33% (v/v) Avidin (Vector Laboratories, #SP-2001)
Blocage Biotin :	PGT 1% (v/v) sérum d'âne 33% (v/v) Biotin (Vector Laboratories, #SP-2001)
Solution ABC :	PGT 0,2% (v/v) solution A (Vector Laboratories, #PK-6100). 0,2% (v/v) solution B (Vector Laboratories, #PK-6100)

VI.2.2. Perfusion des souris et coupe des cerveaux

Les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale de 100 µL de Pentobarbital, puis perfusées par voie intracardiaque avec 100 mL de PFA 4 %, puis 50 mL de sucrose 10%. Les cerveaux sont disséqués puis cryoprotégés 3 nuits dans du sucrose 30%. Des coupes parasagittales de 30 µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un microtome à congélation.

VI.2.3. IHC simple

Les coupes sont rincées 3 fois 10 minutes dans du PBS 1X, puis bloquées une heure dans du PGTA/4% sérum d'âne. Elles sont ensuite incubées 2 heures à température ambiante ou la nuit à 4°C dans l'anticorps primaire dilué dans le PGTA. Après rinçages, les coupes sont incubées 2 heures à température ambiante dans l'anticorps secondaire dilué dans le PGTA. Enfin, 3 rinçages de 10 minutes sont réalisés et les coupes sont montées sur des lames porte-objet Menzel-Gläser dans le milieu de montage ProLong[®] Gold.

VI.2.4. IHC amplifiées

Les deux techniques d'amplification décrites ci-dessous reposent sur le système d'amplification du signal utilisant la tyramide (Tyramide Signal Amplification, TSATM, Perkin Elmer). Le système TSA est une méthode enzymatique de détection utilisant l'activité catalytique de la peroxydase de Raifort (HRP). Cette enzyme, produite par la racine du Raifort, contient un hème utilisant le peroxyde d'hydrogène pour oxyder des composés organiques ou inorganiques (Veitch, 2004). Dans les protocoles développés ci-après, la HRP catalyse l'activation et le dépôt de tyramide couplée à un fluorophore (Fluorescéine Iso Thio Cyanate, FITC ou Cyanine, Cy3) tout autour de l'enzyme (**figure 29**).

VI.2.4.1 IHC simple : avec un anticorps secondaire couplé à l'HRP

Les coupes sont rincées 3 fois 10 minutes dans du PBS 1X puis l'activité des peroxydases endogènes est bloquée par une incubation de 30 minutes dans du PBS/0,2% H₂O₂ à température ambiante. Après 3 nouveaux rinçages, les coupes sont incubées 30 minutes avec du PGT/4% sérum d'âne puis 2 heures à température ambiante dans l'anticorps primaire dilué dans le PGT. Les coupes sont rincées puis incubées à nouveau 2 heures dans l'anticorps secondaire dilué dans le PGT. Après 3 rinçages de 10 minutes, les coupes sont incubées 10 minutes dans la TSA diluée au 1/100^{ème} dans le diluant d'amplification du kit (Perkin Elmer, #NEL74). Le montage se fait comme précédemment dans du ProLong[®] Gold.

VI.2.4.2 IHC double : avec un anticorps secondaire couplé à la biotine

Les coupes sont rincées 3 fois 10 minutes dans du PBS 1X, incubées dans la solution de blocage Avidin pendant 30 minutes, rincées 3 fois 5 minutes dans du PGT et incubées la nuit à 4°C dans l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage Biotin. Le lendemain, les coupes sont rincées 3 fois 10 minutes dans du PGT et incubées 2 heures à température ambiante dans l'anticorps secondaire biotinylé dilué dans du PGT. Les coupes sont rincées 3 fois 10 minutes dans du PGT puis incubées 30 minutes dans du PGT/10% méthanol/1% H₂O₂. Après 3 rinçages de 10 minutes, les coupes sont incubées 30 minutes dans la solution ABC préparée 30 minutes avant utilisation. Les coupes sont à nouveau rincées 3 fois avant d'être incubées 10 minutes dans la TSA diluée au 1/100^{ème} dans le diluant d'amplification du kit. Après 3 derniers rinçages, les coupes sont montées dans du ProLong[®] Gold.

VII. Pseudo-Golgi

VII.1. Solutions

PBS-T :	PBS 1X 1% Triton-X100
T. de blocage peroxydases endogènes :	PBS-T 10% méthanol 1% H ₂ O ₂
Tampon de lavage du PFA :	PBS-T 50 mM NH ₄ Cl
Solution ABC :	5 mL PBS-T 2 gouttes solution A 2 gouttes solution B

VII.2. Révélation de la biocytine

Des tranches de cervelet de souris FLT ou sauvages ont été préparées par l'équipe du Dr. Isope. Sur chaque tranche, une à deux cellules de Purkinje ont été injectées avec de la biocytine. Les tranches, stockées ensuite dans du PFA 4%, sont rincées 3 fois 10 minutes dans du PBS-T puis incubées 30 minutes dans le tampon de blocage des peroxydases endogènes. Après 3 nouveaux rinçages de 10 minutes dans le PBS-T, les tranches sont incubées 15 minutes à température ambiante dans le tampon de lavage du PFA pour bloquer les groupes aldéhydes libres. Les coupes sont à nouveau rincées 3 fois puis incubées sur la nuit dans la solution ABC à 4°C. Après rinçages, les tranches sont incubées 15 minutes dans la TSA (cf. § V.2.4.) diluée au 1/50^{ème} dans le tampon d'amplification. Les tranches sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS et montées dans du milieu de montage Vectashield® (Vector Laboratories, #H-1000).

VIII. Immunoprécipitation

VIII.1. Immunoprécipitations *in vitro*

VIII.1.1. Solutions

Billes Dynabeads® Protein G (Invitrogen, #100.03D)

Tampon d'immunoprécipitation (IP) :	1% Triton-X100 150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl pH 7,5
-------------------------------------	--

	2 mM EDTA
Tampon d'éluion 1X :	6 M urée 2% (v/v) SDS 200 μ L bleu de Bromophénol à 20 mg.mL ⁻¹ 62,5 mM Tris-HCL 10% (v/v) β -mercaptoéthanol 20% (v/v) glycérol
Tampon d'éluion 2X :	12 M urée 4% (v/v) SDS 400 μ L bleu de Bromophénol à 20 mg.mL ⁻¹ 125 mM Tris-HCL 20% (v/v) β -mercaptoéthanol 40% (v/v) glycérol
Tampon de migration :	5% (v/v) NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer 20X 95% H2O MilliQ

VIII.1.2. Préparation des billes couplées à la protéine G

Les billes Dynabeads couplées à la protéine G, préalablement lavées 6 fois au PBS 1X, sont resuspendues dans l'anticorps dilué à la concentration de 3,3 μ g par mg de billes et incubées durant une heure avec rotation à température ambiante. Elles sont ensuite rincées une fois dans du PBS 1X, une fois dans du PBS/0,02% Tween-20 puis à nouveau 4 fois dans le PBS 1X. Les billes sont ensuite incubées 30 minutes dans du bissulfosuccinimidyl suberate 5 mM (BS³, Pierce Biotechnology, #21585) pour lier de manière covalente les anticorps à la protéine G présente à la surface des billes. La réaction est arrêtée par l'ajout de 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 pendant 15 minutes. Les billes sont lavées une fois dans 100 mM de glycine-HCl pH 2,5, une fois dans 10 mM de Tris pH 8,8 et 4 fois dans du PBS 1X, puis elles sont resuspendues dans le volume adéquat de tampon d'IP.

VIII.1.3. Immunoprécipitation

Les cellules sont rincées une fois avec du PBS 1X, détachées dans du PBS supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases puis incubées 30 minutes à température ambiante dans 2 mM de Dithiobis Succinimidyl Propionate (DSP, Thermo Fischer Scientific, #22586) afin de lier les protéines de manière covalente. La réaction est arrêtée par l'ajout de Tris-HCl pH 7,5 à la concentration finale de 20 mM. Les cellules sont lavées 2 fois dans du PBS 1X puis resuspendues dans 700 μ L de tampon d'IP supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases et un cocktail d'inhibiteurs de

phosphatases et lysées pendant 30 minutes à 4°C. Après une centrifugation de 15 minutes à 10000 g à 4°C, le surnageant, dont 100 µL sont prélevés pour servir de contrôle pour l'expression des protéines d'intérêt dans les cellules (INPUT, IN), est incubé avec rotation pendant 1 heure à 4°C avec 20 µL de billes couplées à l'anticorps. À la fin de cette étape, le surnageant contenant les protéines non liées aux anticorps (Flow Through, FT) est prélevé. Les billes sont lavées 3 fois dans du tampon d'IP puis resuspendues dans 50 µL de tampon d'éluion 1X, incubées à 65°C pendant 15 minutes, avec une agitation de 1250 rpm, pour récupérer les protéines immunoprécipitées (IP). Les échantillons (*i.e.* 1,43% du volume pour l'IN ; 1,61% pour le FT et 50% pour l'IP) sont séparés par électrophorèse sur des gels NuPAGE® 4-12% Bis-Tris (Invitrogen, #NP0322BOX) dans du tampon de migration 50 minutes à 200 V.

VIII.2. Immunoprécipitations *in vivo*

VIII.2.1. Solutions

Tampon 1 de lavage 0,35 M NaCl :	0,05% (v/v) Triton-X100 5 mM HEPES 0,1 mM EDTA 350 mM NaCl 1% (v/v) Inhibiteurs de protéases (Sigma, #P8340) pH 7,45
Tampon 1 d'homogénéisation :	0,05% (v/v) Triton-X100 0,32 M sucrose 5 mM HEPES 0,1 mM EDTA 1% (v/v) Inhibiteurs de protéases pH 7,45
Tampon 1 de lavage :	0,05% (v/v) Triton-X100 5 mM HEPES 0,1 mM EDTA pH 7,45
Tampon 2 de lavage 0,15 M KCl :	0,05% (v/v) Triton-X100 10 mM HEPES-KOH pH 7,4 5 mM MgCl ₂ 150 mM KCl 0,05% (v/v) Triton-X100
Tampon 2 d'homogénéisation :	0,05% (v/v) Triton-X100 10 mM HEPES-KOH pH 7,4

5 mM MgCl₂
 150 mM KCl
 1% (v/v) Inhibiteurs de protéases
 2% (v/v) Inhibiteur de phosphatases I (Sigma, #P2850)
 2% (v/v) Inhibiteur de phosphatases II (Sigma, #P5726)

Tampon 2 de lavage 0,35 M KCl :
 10 mM HEPES-KOH pH 7,4
 5 mM MgCl₂
 350 mM KCl
 0,05% (v/v) Triton-X100
 1% (v/v) Inhibiteurs de protéases
 2% (v/v) Inhibiteur de phosphatases I
 2% (v/v) Inhibiteur de phosphatases II

VIII.2.2. Préparation des billes couplées à la protéine G

2,25 mg de billes Dynabeads couplées à la protéine G sont lavés 6 fois dans le tampon de lavage. Les billes sont incubées avec 20 µg d'un mix d'anticorps anti-GFP monoclonaux (19C8 et 19F7, Doyle et al., 2008) pendant 2 heures avec rotation à température ambiante. Elles sont ensuite rincées 6 fois dans le tampon de lavage puis incubées 30 minutes dans du BS³ 5 mM pour lier de manière covalente les anticorps à la protéine G. La réaction est arrêtée par l'ajout de 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 aux billes, incubées encore 15 minutes. Les billes sont lavées une fois dans 100 mM de glycine-HCl pH 2,5, une fois dans 10 mM de Tris pH 8,8, une fois dans du Triéthylamine 100 mM et 3 fois dans le tampon de lavage, puis elles sont resuspendues dans le 40 µL de tampon de lavage. Pour les expériences réalisées sans liaison covalente des anticorps aux billes, les incubations avec le BS³ et Tris sont omises.

VIII.2.3. Immunoprécipitation

Les cervelets de souris sont homogénéisés dans 1 mL (pour un cervelet) ou 2 mL (pour deux ou trois cervelets) de tampon d'homogénéisation sans Triton-X100. Cent µL de tampon d'homogénéisation contenant 0,5 % de Triton-X100 sont ajoutés à l'homogénat pour obtenir une concentration finale de 0,05% Triton-X100. Les homogénats sont agités 30 minutes à 4°C, puis centrifugés 30 minutes à 20000 g, 4°C. Un aliquot de 100 µL du surnageant est prélevé. Le reste est incubé avec 10 µL.mL⁻¹ de billes une heure à 4°C. Après prélèvement du surnageant (FT), les billes sont rincées 3 fois dans le tampon de lavage puis resuspendues dans du tampon d'éluion 1X et éluées 15 minutes à 60°C et 1250 rpm. Le surnageant est prélevé (IP). Les échantillons (*i.e.* 0,15% du volume pour l'IN ; 0,16% pour le FT et 30% pour l'IP) sont séparés par électrophorèse sur gel comme décrit dans le chapitre § VIII.1.3.

VIII.3. Western Blot

VIII.3.1. Solutions

Tampons de transfert

- Tampon anode I : 300 mM TrizmaBase
10% (v/v) méthanol
 - Tampon anode II : 25 mM trizmaBase
10% (v/v) méthanol
 - Tampon cathode : 25 mM trizmaBase
40 mM glycine
10% (v/v) méthanol
- Rouge Ponceau : 7% (v/v) acide acétique glacial
0,2% (w/v) Ponceau S
- PBS-Tween (PBT) : PBS 1X
0,2% (v/v) Tween-20 (Sigma, #P9416)
- Tampon de blocage : PBT
5% (w/v) lait écrémé en poudre (Régilait)
- Tampon d'incubation : PBT
2,5% (w/v) lait écrémé en poudre

VIII.3.2. Transfert des protéines sur une membrane PVDF

Les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon[®]-P Transfer Membrane en polyvinylidène fluorure (PVDF) (Millipore, #IPVH00010) suivant le protocole du fournisseur par la technique du transfert semi-sec à l'aide de la machine Trans-Blot[®] Semi-Dry de BioRad (#170-3940). En bref, le gel est incubé 15 minutes dans le tampon cathode. La membrane est incubée 15 seconde dans du méthanol 100%, puis 2 minutes dans de l'eau MilliQ et enfin 5 minutes dans le tampon anode II. Deux morceaux de papier Whatman mouillés dans le tampon anode I sont placés l'un au-dessus de l'autre sur l'anode en platine de l'appareil, puis un morceau trempé dans le tampon anode II. La membrane est ensuite déposée, puis le gel, et enfin 3 morceaux de papier Whatman trempés dans le tampon cathode. Les protéines sont transférées 30 minutes à 13 V et 400 mA. À la fin du transfert, la membrane est placée dans de l'eau MilliQ et la présence des protéines est vérifiée par une incubation rapide dans du rouge Ponceau, rincé à l'eau MilliQ.

VIII.3.3. Détection des protéines par Western Blot

La membrane est incubée 30 minutes à température ambiante dans le tampon de blocage pour réduire les liaisons non-spécifiques des anticorps, puis 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C dans l'anticorps primaire dilué dans le tampon d'incubation. Après 3 rinçages de 10 minutes dans le PBT, la membrane est incubée 2 heures à température ambiante dans l'anticorps secondaire couplé à l'HRP et dilué dans le tampon d'incubation. La membrane est rincée dans le PBT et les protéines sont révélées grâce à l'HRP de l'anticorps secondaire en incubant la membrane une minute avec les substrats chemiluminescents du kit SuperSignal West Dura (Thermo Scientific, #34075).

IX. Culture des neurones d'hippocampe

IX.1. Plastiques et milieux

Lamelles en verre	Marienfeld GmbH, #1001/18, No1 - 18 mm Ø
Milieu de dissection :	HBSS (Gibco, #14170) froid
Kit de dissociation :	Papain Dissociation System (Worthington, #LK003150)
Milieu de culture :	Neurobasal (NB, Gibco, #21103) 2% (v/v) B27 (Gibco, #17504) 0,25% (v/v) Glutamax (Gibco, #35050) 1% (v/v) pénicilline/stréptomycine (Gibco, #15140)
Poly-L-lysine 0,1 mg.mL ⁻¹ :	40 µL poly-L-lysine (PLL, Sigma, #P7890) à 2,5 mg.mL ⁻¹ 1 mL H ₂ O stérile
Laminine :	10 µg laminine (Invitrogen, #23017) 1 mL HBSS

IX.2. Mise en culture des neurones d'hippocampe de souris

La veille, les lamelles sont disposées dans des plaques 12 puits et incubées à 37°C avec la PLL. Les lamelles sont rincées 3 fois avec de l'eau stérile puis séchées à température ambiante. Elles sont ensuite incubées 2 heures à 37°C dans la laminine. Pendant ce temps, les hippocampes de 7 à 10 embryons de souris Swiss à 17-18 jours embryonnaires (E17-E18) sont disséqués et placés dans 1,8 mL d'HBSS froid. Les neurones d'hippocampes sont dissociés suivant le protocole du kit de dissociation Papaine et resuspendus dans un mL de

milieu. Les neurones sontensemencés à une densité de $1,5 \cdot 10^5$ cellules. mL^{-1} sur les lamelles préalablement rincées avec de l'HBSS.

IX.3. Transfection des neurones d'hippocampes en culture

Dans une nouvelle plaque 12 puits, 400 μL de Neurobasal sont déposés dans chaque puits et mis à équilibrer 30 minutes à 37°C et 5% CO_2 . Les lamelles sur lesquelles se trouvent les neurones sont déposées dans ces puits, et le milieu conditionné dans lequel étaient les neurones est conservé. Quatre μL de Lipofectamine 2000 sont mélangés à 100 μL de Neurobasal et incubés 5 minutes à température ambiante. Dans le même temps, 0,25 μg de plasmide mCherry (cf. § I.) et 2 μg de plasmide contenant l'une ou l'autre des constructions BAI3 (WT, WT-A, FLT ou EMT) ou 0,5 μg de plasmide pMaxGFP sont mélangés à 100 μL de Neurobasal. La Lipofectamine est ajoutée goutte à goutte à l'ADN et le mélange est incubé 20 minutes à température ambiante. Le mélange lipofectamine/ADN est ensuite déposé goutte à goutte sur les neurones. Après 45 minutes, le milieu de transfection est remplacé par le milieu conditionné. Les neurones sont fixés 48 heures après transfection et immunomarqués avec soit l'anticorps dirigé contre le domaine N-terminal de BAI3 (pour les constructions WT et WT-A), soit l'anticorps dirigé contre la GFP (constructions FLT et EMT).

X. Imagerie et quantifications

X.1. Microscopes et logiciels d'acquisition d'images

Les photos utilisées le test d'étalement sur la fibronectine ont été prises avec un microscope inversé muni d'une caméra Qicam (1392 x 1040 pixels) avec un objectif 20x, et les photos ont été capturées à l'aide du logiciel QCapture.

Pour les autres expériences, les photos ont été prises sur un confocal Leica SP5 (Spectral Photometry) avec un microscope inversé DMI6000 ou un microscope droit DMI6000CFS muni d'une platine motorisée XYZ, des objectifs 20x avec une ouverture numérique (Numerical Aperture, NA) de 0,70 ; 40x NA 1,25 ; 63x NA 1,4 ; et lasers et diodes émettant aux longueurs d'onde suivantes : 405 nm, 488 nm, 561 nm, 633 nm. Les photos ont été acquises à l'aide du logiciel Leica Software LASAF v2.4.1.

X.2. Traitement et analyse des images

X.2.1. Déconvolution des images de microscopie confocale

Le logiciel Huygens Essential v3.4 (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, Pays-Bas) a été utilisé pour déconvoluer les images acquises en microscopie confocale. Les données microscopiques utilisées sont celles contenues dans les fichiers .lif, les données de déconvolution ont, elles, été déterminées pour l'obtention d'une image reflétant au mieux la réalité. Le nombre d'itérations (*i.e.* la répétition du processus) est de 100 et le seuil de qualité est de 0,001 : plus le seuil de qualité est petit, plus le nombre d'itérations complétées est grand et plus la qualité de restauration est élevée. Le ratio signal sur bruit (Signal to Noise Ratio, SNR) a été choisi selon les indications du constructeur : plus l'image est bruitée, plus le SNR est bas. Pour les photos d'IHC, le SNR est de 5, pour celles d'ICC, il est fixé à 10 ou 15.

X.2.2. Traitement des images

Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ (NIH, USA). Pour la mesure des dendrites des neurones d'hippocampe à DIV5, les stacks ont été projetés et les dendrites ont été tracées à l'aide du plugin NeuronJ. Les dendrites primaires (n) sont les dendrites émanant du soma, les niveaux suivants sont déterminés à chaque embranchement (n+1). Pour mesurer le territoire d'innervation des fibres grimpantes sur les cellules de Purkinje, le marquage des synapses par VGluT2 a été encadré, et sa hauteur mesurée. La hauteur des cellules de Purkinje a été mesurée de la même façon, l'encadrement partant cette fois de la base du soma jusqu'à l'extrémité distale des neurones. Pour la mesure de la surface des cellules étalées sur la fibronectine (cf. Résultats § I.) la macro suivante a été développée dans ImageJ :

```
for (i=1; i<n; i++)
{
open("C:\\Documents and Settings\\S"+i+".TIF");
run("Subtract Background...", "rolling=50");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setAutoThreshold();
setThreshold(16, 255);
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=100-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Outlines display");
saveAs("Tiff", "C:\\Documents and Settings\\drawingS"+i+" .tif");
saveAs("Measurements", "C:\\Documents and Settings\\results "+i+".xls");
close();
close();
}
```

Pour les différentes mesures effectuées sur les épines dendritiques, le logiciel NeuronStudio a été utilisé (Rodriguez et al., 2008). Les paramètres suivants ont été utilisés, en accord avec les données précédemment publiées (Heck et al., 2011) :

Taille des voxels : x : 0,06 μm ; y : 0,06 μm ; z : 0,2 μm

Taille minimale des dendrites : 10 μm

Longueur minimale des épines : 0,2 μm ; maximale : 8 μm

XI. Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism[®] v5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). La distribution Gaussienne (*i.e.* normale) des données a été vérifiée par le test de normalité recommandé de D'Agostino et Pearson (*i.e.* omnibus K2).

Dans le cas d'une comparaison entre deux groupes, les données ont été analysées à l'aide d'un *t-test* non apparié de Mann-Whitney.

La comparaison de plusieurs groupes a été faite en ANOVA à une voie (one-way ANOVA). Les données Gaussiennes ont été analysées avec un test *post hoc* de Tukey ; les données non Gaussiennes ont, elles, été analysées avec un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test *post hoc* de Dunns.

Bibliographie

- A -

- Abbott LC, Sotelo C (2000) Ultrastructural analysis of catecholaminergic innervation in weaver and normal mouse cerebellar cortices. *J Comp Neurol* 426:316-329.
- Abe J, Fukuzawa T, Hirose S (2002) Cleavage of Ig-Hepta at a « SEA » Module and at a Conserved G Protein-coupled Receptor Proteolytic Site. *Journal of Biological Chemistry* 277:23391 -23398.
- Adams JC, Tucker RP (2000) The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn* 218:280-299.
- Ahuja R, Pinyol R, Reichenbach N, Custer L, Klingensmith J, Kessels MM, Qualmann B (2007) Cordon-Bleu Is an Actin Nucleation Factor and Controls Neuronal Morphology. *Cell* 131:337-350.
- Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ (2004) Ankyrin-Based Subcellular Gradient of Neurofascin, an Immunoglobulin Family Protein, Directs GABAergic Innervation at Purkinje Axon Initial Segment. *Cell* 119:257-272.
- Ango F, Wu C, Van der Want JJ, Wu P, Schachner M, Huang ZJ (2008) Bergmann glia and the recognition molecule CHL1 organize GABAergic axons and direct innervation of Purkinje cell dendrites. *PLoS Biol* 6:e103.
- Apps R, Garwicz M (2005) Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nature Reviews Neuroscience* 6:297-311.
- Araç D, Boucard AA, Bolliger MF, Nguyen J, Soltis SM, Südhof TC, Brunger AT (2012) A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *The EMBO Journal* Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/emboj.2012.26>.
- Archer HL, Evans J, Edwards S, Colley J, Newbury-Ecob R, O'Callaghan F, Huyton M, O'Regan M, Tolmie J, Sampson J, Clarke A, Osborne J (2006) CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. *Journal of Medical Genetics* 43:729 -734.
- Armengol JA, Sotelo C (1991) Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in « in vitro » slices. *Brain Res Dev Brain Res* 64:95-114.
- Asch AS, Leung LL, Shapiro J, Nachman RL (1986) Human brain glial cells synthesize thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2904-2908.
- Attwood TK, Findlay JBC (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Engineering* 7:195 -203.
- Audesirk G, Cabell L, Kern M (1997) Modulation of neurite branching by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Developmental Brain Research* 102:247-260.

- B -

- Baas PW, Black MM, Banker GA (1989) Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 109:3085-3094.

- Baas PW, Deitch JS, Black MM, Banker GA (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8335-8339.
- Baines AJ (2010) The spectrin–ankyrin–4.1–adducin membrane skeleton: adapting eukaryotic cells to the demands of animal life. *Protoplasma* 244:99-131.
- Banker GA, Cowan WM (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Research* 126:397-425.
- Banker GA, Cowan WM (1979) Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J Comp Neurol* 187:469-493.
- Baptista CA, Hatten ME, Blazeski R, Mason CA (1994) Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified purkinje cells in vitro. *Neuron* 12:243-260.
- Benes CH, Pouligiannis G, Cantley LC, Soltoff SP (2011) The SRC-associated protein CUB Domain-Containing Protein-1 regulates adhesion and motility. *Oncogene* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725358>.
- Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, Endris V, Roberts W, Szatmari P, Pinto D, Bonin M, Riess A, Engels H, Sprengel R, Scherer SW, Rappold GA (2010) Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nature Genetics* 42:489-491.
- Bishop GA (1990) Neuromodulatory effects of corticotropin releasing factor on cerebellar purkinje cells: An in vivo study in the cat. *Neuroscience* 39:251-257.
- Bjarnadóttir TK, Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DE, Lagerström MC, Schiöth HB (2004) The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics* 84:23-33.
- Bjarnadóttir TK, Fredriksson R, Schiöth HB (2007a) The adhesion GPCRs: a unique family of G protein-coupled receptors with important roles in both central and peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci* 64:2104-2119.
- Bjarnadóttir TK, Geirardsdóttir K, Ingemansson M, Mirza MAI, Fredriksson R, Schiöth HB (2007b) Identification of novel splice variants of Adhesion G protein-coupled receptors. *Gene* 387:38-48.
- 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.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294:1351-1362.
- Boda B, Alberi S, Nikonenko I, Node-Langlois R, Jourdain P, Moosmayer M, Parisi-Jourdain L, Muller D (2004) The Mental Retardation Protein PAK3 Contributes to Synapse Formation and Plasticity in Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 24:10816 - 10825.
- Bodick N, Stevens JK, Sasaki S, Purpura DP (1982) Microtubular disarray in cortical dendrites and neurobehavioral failure. II. Computer reconstruction of perturbed microtubular arrays. *Brain Res* 281:299-309.
- Bohnekamp J, Schöneberg T (2011) The cell-adhesion receptor GPR133 couples to the Gs protein. *The Journal of Biological Chemistry* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025619>.
- Bolliger MF, Martinelli DC, Südhof TC (2011) The cell-adhesion G protein-coupled receptor BAI3 is a high-affinity receptor for C1q-like proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2534-2539.
- Bork P, Beckmann G (1993) The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 231:539-545.

- Bosch M, Hayashi Y (2011) Structural plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology* Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438811001462>.
- Boukhtouche F, Doulazmi M, Frederic F, Dusart I, Brugg B, Mariani J (2006) RORalpha, a pivotal nuclear receptor for Purkinje neuron survival and differentiation: from development to ageing. *Cerebellum* 5:97-104.
- Bourne JN, Harris KM (2008) Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47-67.
- Bourrat F, Sotelo C (1988) Migratory pathways and neuritic differentiation of inferior olivary neurons in the rat embryo. Axonal tracing study using the in vitro slab technique. *Brain Res* 467:19-37.
- Bourrat F, Sotelo C (1991) Relationships between neuronal birthdates and cytoarchitecture in the rat inferior olivary complex. *J Comp Neurol* 313:509-521.
- Bouvier M (2012) Bases moléculaires de la sélectivité fonctionnelle et criblage des RCPG. *Nouvelles avenues pour la découverte de médicaments*.
- Bradley P, Berry M (1978) The Purkinje cell dendritic tree in mutant mouse cerebellum. A quantitative Golgi study of Weaver and Staggerer mice. *Brain Research* 142:135-141.
- Bravin M, Morando L, Vercelli A, Rossi F, Strata P (1999) Control of spine formation by electrical activity in the adult rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1704-1709.
- Bridges TM, Lindsley CW (2008) G-Protein-Coupled Receptors: From Classical Modes of Modulation to Allosteric Mechanisms. *ACS Chem Biol* 3:530-541.
- Brugnera E, Haney L, Grimsley C, Lu M, Walk SF, Tosello-Tramont A-C, Macara IG, Madhani H, Fink GR, Ravichandran KS (2002) Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nature Cell Biology* Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb824>.

- C -

- Chédotal A, Kerjan G, Moreau-Fauvarque C (2005) The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. *Cell Death Differ* 12:1044-1056.
- Chédotal A, Sotelo C (1992) Early Development of Olivocerebellar Projections in the Fetal Rat Using CGRP Immunocytochemistry. *Eur J Neurosci* 4:1159-1179.
- Chédotal A, Sotelo C (1993) The « creeper stage » in cerebellar climbing fiber synaptogenesis precedes the « pericellular nest »--ultrastructural evidence with parvalbumin immunocytochemistry. *Brain Res Dev Brain Res* 76:207-220.
- Chen H, Firestein BL (2007) RhoA Regulates Dendrite Branching in Hippocampal Neurons by Decreasing Cypin Protein Levels. *The Journal of Neuroscience* 27:8378 -8386.
- Chen H, Herndon ME, Lawler J (2000) The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 19:597-614.
- Chen LY, Rex CS, Casale MS, Gall CM, Lynch G (2007) Changes in Synaptic Morphology Accompany Actin Signaling during LTP. *The Journal of Neuroscience* 27:5363 -5372.
- Chen Q, Zhu Y-C, Yu J, Miao S, Zheng J, Xu L, Zhou Y, Li D, Zhang C, Tao J, Xiong Z-Q (2010) CDKL5, a Protein Associated with Rett Syndrome, Regulates Neuronal Morphogenesis via Rac1 Signaling. *Journal of Neuroscience* 30:12777-12786.
- Chhabra ES, Higgs HN (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* 9:1110-1121.
- Choi J, Ko J, Racz B, Burette A, Lee J-R, Kim S, Na M, Lee HW, Kim K, Weinberg RJ, Kim E (2005) Regulation of Dendritic Spine Morphogenesis by Insulin Receptor Substrate

- 53, a Downstream Effector of Rac1 and Cdc42 Small GTPases. *The Journal of Neuroscience* 25:869-879.
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CCA, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Moshier DF, Bornstein P, Barres BA (2005) Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. *Cell* 120:421-433.
- Cohen-Cory S, Dreyfus C, Black I (1991) NGF and excitatory neurotransmitters regulate survival and morphogenesis of cultured cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Neuroscience* 11:462-471.
- Collins MO, Husi H, Yu L, Brandon JM, Anderson CNG, Blackstock WP, Choudhary JS, Grant SGN (2006) Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem* 97 Suppl 1:16-23.
- Craig AM, Kang Y (2007) Neurexin–neuroligin signaling in synapse development. *Current Opinion in Neurobiology* 17:43-52.
- Crepel F, Delhaye-Bouchaud N, Dupont JL (1981) Fate of the multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibers in immature control, x-irradiated and hypothyroid rats. *Brain Res* 227:59-71.
- Crepel F, Mariani J (1976) Multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the cerebellum of the Weaver Mutant Mouse. *J Neurobiol* 7:579-582.
- Cullen M, Elzarrad MK, Seaman S, Zudaire E, Stevens J, Yang MY, Li X, Chaudhary A, Xu L, Hilton MB, Logsdon D, Hsiao E, Stein EV, Cuttitta F, Haines DC, Nagashima K, Tessarollo L, St. Croix B (2011) GPR124, an orphan G protein-coupled receptor, is required for CNS-specific vascularization and establishment of the blood–brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:5759-5764.
- Curtin JA, Quint E, Tshipouri V, Arkell RM, Cattanach B, Copp AJ, Henderson DJ, Spurr N, Stanier P, Fisher EM, Nolan PM, Steel KP, Brown SDM, Gray IC, Murdoch JN (2003) Mutation of *Celsr1* Disrupts Planar Polarity of Inner Ear Hair Cells and Causes Severe Neural Tube Defects in the Mouse. *Current Biology* 13:1129-1133.

- D -

- Dailey ME, Smith SJ (1996) The Dynamics of Dendritic Structure in Developing Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience* 16:2983-2994.
- Das S, Owen KA, Ly KT, Park D, Black SG, Wilson JM, Sifri CD, Ravichandran KS, Ernst PB, Casanova JE (2011) Brain angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) is a pattern recognition receptor that mediates macrophage binding and engulfment of Gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2136-2141.
- Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A, Hall A (2001) Rac/Cdc42 and p65PAK Regulate the Microtubule-destabilizing Protein Stathmin through Phosphorylation at Serine 16. *Journal of Biological Chemistry* 276:1677-1680.
- Davies B, Baumann C, Kirchhoff C, Ivell R, Nubbemeyer R, Habenicht U-F, Theuring F, Gottwald U (2004) Targeted Deletion of the Epididymal Receptor HE6 Results in Fluid Dysregulation and Male Infertility. *Molecular and Cellular Biology* 24:8642-8648.
- Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, Philippar U, Barzik M, Rubinson DA, Gupton S, Van Veen JE, Furman C, Zhang J, Alberts AS, Mori S, Gertler FB (2007) Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol* 9:1347-1359.
- DeRosse P, Lencz T, Burdick KE, Siris SG, Kane JM, Malhotra AK (2008) The genetics of symptom-based phenotypes: toward a molecular classification of schizophrenia. *Schizophr Bull* 34:1047-1053.

- Dev KK (2004) Making protein interactions druggable: targeting PDZ domains. *Nat Rev Drug Discov* 3:1047-1056.
- Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R (1996) Crystal Structures of a Complexed and Peptide-Free Membrane Protein-Binding Domain: Molecular Basis of Peptide Recognition by PDZ. *Cell* 85:1067-1076.
- Doyle JP, Dougherty JD, Heiman M, Schmidt EF, Stevens TR, Ma G, Bupp S, Shrestha P, Shah RD, Doughty ML, Gong S, Greengard P, Heintz N (2008) Application of a Translational Profiling Approach for the Comparative Analysis of CNS Cell Types. *Cell* 135:749-762.

- E -

- Eccles JC (1970) Neurogenesis and Morphogenesis in the Cerebellar Cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66:294 -301.
- Ehrlich I, Klein M, Rumpel S, Malinow R (2007) PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:4176 - 4181.
- Eisenman LM, Schalekamp MP, Voogd J (1991) Development of the cerebellar cortical efferent projection: an in-vitro anterograde tracing study in rat brain slices. *Brain Res Dev Brain Res* 60:261-266.
- Elliott MR, Zheng S, Park D, Woodson RI, Reardon MA, Juncadella IJ, Kinchen JM, Zhang J, Lysiak JJ, Ravichandran KS (2010) Unexpected requirement for ELMO1 in clearance of apoptotic germ cells in vivo. *Nature* 467:333-337.
- Epting D, Wendik B, Bennewitz K, Dietz CT, Driever W, Kroll J (2010) The Rac1 regulator ELMO1 controls vascular morphogenesis in zebrafish. *Circ Res* 107:45-55.
- Eroglu Ç, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Özkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, Huberman AD, Green EM, Lawler J, Dolmetsch R, Garcia KC, Smith SJ, Luo ZD, Rosenthal A, Mosher DF, Barres BA (2009) Gabapentin Receptor $\alpha 2\delta$ -1 Is a Neuronal Thrombospondin Receptor Responsible for Excitatory CNS Synaptogenesis. *Cell* 139:380-392.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.

- F -

- Fernández-Chacón R, Königstorfer A, Gerber SH, García J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410:41-49.
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Molecular Pharmacology* 63:1256 -1272.
- Fritschy J-M, Panzanelli P, Kralic JE, Vogt KE, Sassoè-Pognetto M (2006) Differential Dependence of Axo-Dendritic and Axo-Somatic GABAergic Synapses on GABAA Receptors Containing the $\alpha 1$ Subunit in Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience* 26:3245 -3255.
- Fujiwara T, Mammoto A, Kim Y, Takai Y (2000) Rho small G-protein-dependent binding of mDia to an Src homology 3 domain-containing IRSp53/BAIAP2. *Biochem Biophys Res Commun* 271:626-629.

- Fukushima Y, Oshika Y, Tsuchida T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Nakamura M (1998) Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 expression is inversely correlated with vascularity and distant metastasis of colorectal cancer. *Int J Oncol* 13:967-970.
- Furutani K, Okubo Y, Kakizawa S, Iino M (2006) Postsynaptic inositol 1,4,5-trisphosphate signaling maintains presynaptic function of parallel fiber–Purkinje cell synapses via BDNF. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:8528 -8533.

- G -

- Gao FB, Brenman JE, Jan LY, Jan YN (1999) Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in *Drosophila*. *Genes Dev* 13:2549-2561.
- Gao Y, Perkins EM, Clarkson YL, Tobia S, Lyndon AR, Jackson M, Rothstein JD (2011) β -III Spectrin Is Critical for Development of Purkinje Cell Dendritic Tree and Spine Morphogenesis. *The Journal of Neuroscience* 31:16581 -16590.
- Garey L (2010) When cortical development goes wrong: schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *J Anat* 217:324-333.
- Glantz LA, Lewis DA (2000) Decreased Dendritic Spine Density on Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons in Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57:65-73.
- Goshima Y, Sasaki Y, Nakayama T, Ito T, Kimura T (2000) Functions of semaphorins in axon guidance and neuronal regeneration. *Jpn J Pharmacol* 82:273-279.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:3168 -3171.
- Grabham PW, Reznik B, Goldberg DJ (2003) Microtubule and Rac 1-dependent F-actin in growth cones. *Journal of Cell Science* 116:3739 -3748.
- Gray JX, Haino M, Roth MJ, Maguire JE, Jensen PN, Yarme A, Stetler-Stevenson MA, Siebenlist U, Kelly K (1996) CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J Immunol* 157:5438-5447.
- Grenningloh G, Soehrman S, Bondallaz P, Ruchti E, Cadas H (2004) Role of the microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth. *J Neurobiol* 58:60-69.
- Gu C, Limberg BJ, Whitaker GB, Perman B, Leahy DJ, Rosenbaum JS, Ginty DD, Kolodkin AL (2002) Characterization of Neuropilin-1 Structural Features That Confer Binding to Semaphorin 3A and Vascular Endothelial Growth Factor 165. *Journal of Biological Chemistry* 277:18069 -18076.
- Gualdoni S, Albertinazzi C, Corbetta S, Valtorta F, Curtis I (2007) Normal levels of Rac1 are important for dendritic but not axonal development in hippocampal neurons. *Biology of the Cell* 99:455-464.
- Guastavino JM, Sotelo C, Damez-Kinselle I (1990) Hot-foot murine mutation: behavioral effects and neuroanatomical alterations. *Brain Res* 523:199-210.
- Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Trampont AC, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, Walk SF, Nemergut ME, Macara IG, Francis R, Schedl T, Qin Y, Van Aelst L, Hengartner MO, Ravichandran KS (2001) CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* 107:27-41.

- H -

- Haditsch U, Leone DP, Farinelli M, Chrostek-Grashoff A, Brakebusch C, Mansuy IM, McConnell SK, Palmer TD (2009) A central role for the small GTPase Rac1 in hippocampal plasticity and spatial learning and memory. *Molecular and Cellular Neuroscience* 41:409-419.
- Haitina T, Olsson F, Stephansson O, Alsjö J, Roman E, Ebendal T, Schiöth HB, Fredriksson R (2008) Expression profile of the entire family of Adhesion G protein-coupled receptors in mouse and rat. *BMC Neurosci* 9:43.
- Hallonet ME, Teillet MA, Le Douarin NM (1990) A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development* 108:19-31.
- Hallonet MER, Le Douarin NM (1993) Tracing Neuroepithelial Cells of the Mesencephalic and Metencephalic Alar Plates During Cerebellar Ontogeny in Quail – chick Chimaeras. *European Journal of Neuroscience* 5:1145-1155.
- Hand R, Bortone D, Mattar P, Nguyen L, Heng JI-T, Guerrier S, Boutt E, Peters E, Barnes AP, Parras C, Schuurmans C, Guillemot F, Polleux F (2005) Phosphorylation of Neurogenin2 Specifies the Migration Properties and the Dendritic Morphology of Pyramidal Neurons in the Neocortex. *Neuron* 48:45-62.
- Haraguchi S, Sasahara K, Shikimi H, Honda S-I, Harada N, Tsutsui K (2011) Estradiol Promotes Purkinje Dendritic Growth, Spinogenesis, and Synaptogenesis During Neonatal Life by Inducing the Expression of BDNF. *Cerebellum (London, England)* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198873>.
- Harris K, Jensen F, 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 [published erratum appears in *J Neurosci* 1992 Aug;12(8):following table of contents]. *The Journal of Neuroscience* 12:2685-2705.
- HAS (2007a) Schizophrénies - Guide - Affection de longue durée. Available at: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/guide_ald23_schizophr_juin_07.pdf.
- HAS (2007b) La prise en charge de votre schizophrénie. Available at: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2008-06/08-090_gp_schizophenie_2008-06-16_14-36-31_927.pdf.
- HAS (2010) Autisme et autres troubles envahissants du développement (TED) - État des connaissances hors mécanismes physiopathologiques, psychopathologiques et recherche fondamentale. Available at: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-03/autisme_et_autres_ted_etat_des_connaissances_resume.pdf.
- Hashimoto K, Tsujita M, Miyazaki T, Kitamura K, Yamazaki M, Shin H-S, Watanabe M, Sakimura K, Kano M (2011) Postsynaptic P/Q-type Ca²⁺ channel in Purkinje cell mediates synaptic competition and elimination in developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:9987-9992.
- Hatten ME (1990) Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci* 13:179-184.
- Hatten ME, Alder J, Zimmerman K, Heintz N (1997) Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Current Opinion in Neurobiology* 7:40-47.
- Hatten ME, Heintz N (1995) Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 18:385-408.

- Hayashi-Takagi A, Takaki M, Graziane N, Seshadri S, Murdoch H, Dunlop AJ, Makino Y, Seshadri AJ, Ishizuka K, Srivastava DP, Xie Z, Baraban JM, Houslay MD, Tomoda T, Brandon NJ, Kamiya A, Yan Z, Penzes P, Sawa A (2010) Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nature Neuroscience* 13:327-332.
- Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J (2011) A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines: application to a mouse model of Huntington's disease. *Brain Structure and Function* Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00429-011-0340-y>.
- Hely TA, Graham B, Ooyen AV (2001) A computational model of dendrite elongation and branching based on MAP2 phosphorylation. *J Theor Biol* 210:375-384.
- Hendelman WJ, Aggerwal AS (1980) The Purkinje neuron: I. A Golgi study of its development in the mouse and in culture. *J Comp Neurol* 193:1063-1079.
- Heuer H, Mason CA (2003) Thyroid Hormone Induces Cerebellar Purkinje Cell Dendritic Development via the Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$. *The Journal of Neuroscience* 23:10604 -10612.
- Hirai H, Launey T (2000) The Regulatory Connection between the Activity of Granule Cell NMDA Receptors and Dendritic Differentiation of Cerebellar Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience* 20:5217 -5224.
- Hirai H, Pang Z, Bao D, Miyazaki T, Li L, Miura E, Parris J, Rong Y, Watanabe M, Yuzaki M, Morgan JI (2005) Cbln1 is essential for synaptic integrity and plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci* 8:1534-1541.
- Hokfelt T, Fuxe K (1969) Cerebellar Monoamine Nerve Terminals, a new Type of Afferent Fibers to the Cortex Cerebelli. *Experimental Brain Research* 9:63-72.
- Horn F (2003) GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Research* 31:294-297.
- 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, Tanhuanpää K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P (2009) Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 185:323 -339.
- Hsu SM, Raine L (1981) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 29:1349 -1353.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 29:577 -580.
- Huang Z, Zang K, Reichardt LF (2005) The origin recognition core complex regulates dendrite and spine development in postmitotic neurons. *The Journal of Cell Biology* 170:527-535.
- Huang ZJ, Di Cristo G, Ango F (2007) Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nat Rev Neurosci* 8:673-686.
- Huttenlocher PR (1970) Dendritic development and mental defect. *Neurology* 20:381.
- Huttenlocher PR (1974) Dendritic development in neocortex of children with mental defect and infantile spasms. *Neurology* 24:203-210.
- Hyman SE (2008) A glimmer of light for neuropsychiatric disorders. *Nature* 455:890-893.

- I -

- Ichikawa R, Miyazaki T, Kano M, Hashikawa T, Tatsumi H, Sakimura K, Mishina M, Inoue Y, Watanabe M (2002) Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor delta 2. *J Neurosci* 22:8487-8503.
- Ichikawa R, Yamasaki M, Miyazaki T, Konno K, Hashimoto K, Tatsumi H, Inoue Y, Kano M, Watanabe M (2011) Developmental Switching of Perisomatic Innervation from Climbing Fibers to Basket Cell Fibers in Cerebellar Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience* 31:16916 -16927.
- Ide M, Lewis DA (2010) Altered Cortical CDC42 Signaling Pathways in Schizophrenia: Implications for Dendritic Spine Deficits. *Biological Psychiatry* 68:25-32.
- Iguchi T, Sakata K, Yoshizaki K, Tago K, Mizuno N, Itoh H (2008) Orphan G Protein-coupled Receptor GPR56 Regulates Neural Progenitor Cell Migration via a Gα12/13 and Rho Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 283:14469 -14478.
- Iijima T, Miura E, Watanabe M, Yuzaki M (2010) Distinct expression of C1q-like family mRNAs in mouse brain and biochemical characterization of their encoded proteins. *European Journal of Neuroscience*:no-no.
- Insall RH, Machesky LM (2009) Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell* 17:310-322.
- Ito M (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Progress in Neurobiology* 78:272-303.

- J -

- Jacob TC, Wan Q, Vithlani M, Saliba RS, Succol F, Pangalos MN, Moss SJ (2009) GABAA receptor membrane trafficking regulates spine maturity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:12500 -12505.
- Jarzynka MJ, Hu B, Hui K-M, Bar-Joseph I, Gu W, Hirose T, Haney LB, Ravichandran KS, Nishikawa R, Cheng S-Y (2007) ELMO1 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion. *Cancer Res* 67:7203-7211.
- Jeong BC, Kim M-Y, Lee JH, Kee HJ, Kho DH, Han KE, Qian YR, Kim J-K, Kim KK (2006) Brain-specific angiogenesis inhibitor 2 regulates VEGF through GABP that acts as a transcriptional repressor. *FEBS Lett* 580:669-676.
- Johnson RC, Penzes P, Eipper BA, Mains RE (2000) Isoforms of Kalirin, a Neuronal Dbl Family Member, Generated through Use of Different 5'- and 3'-Ends Along with an Internal Translational Initiation Site. *Journal of Biological Chemistry* 275:19324 -19333.
- Johnston SA, Bramble JP, Yeung CL, Mendes PM, Machesky LM (2008) Arp2/3 complex activity in filopodia of spreading cells. *BMC Cell Biology* 9:65.
- Jones AR, Overly CC, Sunkin SM (2009) The Allen Brain Atlas: 5 years and beyond. *Nat Rev Neurosci* 10:821-828.
- Jones SB, Lu HY, Lu Q (2004) Abl Tyrosine Kinase Promotes Dendrogenesis by Inducing Actin Cytoskeletal Rearrangements in Cooperation with Rho Family Small GTPases in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 24:8510 -8521.

Jordan BA, Fernholz BD, Boussac M, Xu C, Grigorean G, Ziff EB, Neubert TA (2004) Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Mol Cell Proteomics* 3:857-871.

- K -

Kalinichenko SG, Okhotin VE (2005) Unipolar brush cells--a new type of excitatory interneuron in the cerebellar cortex and cochlear nuclei of the brainstem. *Neurosci Behav Physiol* 35:21-36.

Kalus P, Muller TJ, Zuschratter W, Senitz D (2000) The dendritic architecture of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenic patients. *NeuroReport* 11 Available at: http://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/2000/11090/The_dendritic_architecture_of_prefrontal_pyramidal.44.aspx.

Kan Z et al. (2010) Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 466:869-873.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science*, 4th éd. McGraw-Hill.

Kang X et al. (2006) Antiangiogenic activity of BAI1 in vivo: implications for gene therapy of human glioblastomas. *Cancer Gene Ther* 13:385-392.

Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Pathology*:217-250.

Kano M, Hashimoto K (2009) Synapse elimination in the central nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 19:154-161.

Kano M, Rexhausen U, Dreessen J, Konnerth A (1992) Synaptic excitation produces a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in cerebellar Purkinje cells. *Nature* 356:601-604.

Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H (2003) Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences* 26:360-368.

Katoh H, Fujimoto S, Ishida C, Ishikawa Y, Negishi M (2006) Differential distribution of ELMO1 and ELMO2 mRNAs in the developing mouse brain. *Brain Research* 1073-1074:103-108.

Katoh H, Negishi M (2003) RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* 424:461-464.

Kaur B, Brat DJ, Devi NS, Van Meir EG (2005) Vasculostatin, a proteolytic fragment of brain angiogenesis inhibitor 1, is an antiangiogenic and antitumorigenic factor. *Oncogene* 24:3632-3642.

Kaur B, Cork SM, Sandberg EM, Devi NS, Zhang Z, Klenotic PA, Febbraio M, Shim H, Mao H, Tucker-Burden C, Silverstein RL, Brat DJ, Olson JJ, Van Meir EG (2009) Vasculostatin Inhibits Intracranial Glioma Growth and Negatively Regulates In vivo Angiogenesis through a CD36-Dependent Mechanism. *Cancer Research* 69:1212-1220.

Kee HJ, Ahn KY, Choi KC, Won Song J, Heo T, Jung S, Kim J-K, Bae CS, Kim KK (2004) Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 3 (BAI3) in normal brain and implications for BAI3 in ischemia-induced brain angiogenesis and malignant glioma. *FEBS Lett* 569:307-316.

Kee HJ, Koh JT, Kim M-Y, Ahn KY, Kim JK, Bae CS, Park SS, Kim KK (2002) Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (BAI2) in normal and ischemic brain: involvement of BAI2 in the ischemia-induced brain angiogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1054-1067.

Killeen M, Tong J, Krizus A, Steven R, Scott I, Pawson T, Culotti J (2002) UNC-5 Function Requires Phosphorylation of Cytoplasmic Tyrosine 482, but Its UNC-40-Independent

- Functions also Require a Region between the ZU-5 and Death Domains. *Developmental Biology* 251:348-366.
- Kim J-Y, Oh MH, Bernard LP, Macara IG, Zhang H (2011) The RhoG/ELMO1/Dock180 Signaling Module Is Required for Spine Morphogenesis in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 286:37615-37624.
- Kim S, Kim T, Lee D, Park S-H, Kim H, Park D (2000) Molecular Cloning of Neuronally Expressed Mouse β Pix Isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272:721-725.
- Kimura-Kuroda J, Nagata I, Negishi-Kato M, Kuroda Y (2002) Thyroid hormone-dependent development of mouse cerebellar Purkinje cells in vitro. *Developmental Brain Research* 137:55-65.
- King JS, Bishop GA (2002) The Distribution and Cellular Localization of CRF-R1 in the Vermis of the Postnatal Mouse Cerebellum. *Experimental Neurology* 178:175-185.
- Kirchhoff C, Osterhoff C, Samalecos A (2008) HE6/GPR64 adhesion receptor co-localizes with apical and subapical F-actin scaffold in male excurrent duct epithelia. *Reproduction* 136:235-245.
- Klenotic PA, Huang P, Palomo J, Kaur B, Van Meir EG, Vogelbaum MA, Febbraio M, Gladson CL, Silverstein RL (2010) Histidine-Rich Glycoprotein Modulates the Anti-Angiogenic Effects of Vasculostatin. *The American Journal of Pathology* 176:2039-2050.
- Ko J, Fuccillo MV, Malenka RC, Südhof TC (2009) LRRTM2 Functions as a Neurexin Ligand in Promoting Excitatory Synapse Formation. *Neuron* 64:791-798.
- Koch H, Hofmann K, Brose N (2000) Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform. *Biochem J* 349:247-253.
- Koh JT, Kook H, Kee HJ, Seo Y-W, Jeong BC, Lee JH, Kim M-Y, Yoon KC, Jung S, Kim KK (2004) Extracellular fragment of brain-specific angiogenesis inhibitor 1 suppresses endothelial cell proliferation by blocking α β 5 integrin. *Experimental Cell Research* 294:172-184.
- Koh JT, Lee ZH, Ahn KY, Kim JK, Bae CS, Kim HH, Kee HJ, Kim KK (2001) Characterization of mouse brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) and phytanoyl-CoA alpha-hydroxylase-associated protein 1, a novel BAI1-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res* 87:223-237.
- Koirala S, Jin Z, Piao X, Corfas G (2009) GPR56-Regulated Granule Cell Adhesion Is Essential for Rostral Cerebellar Development. *The Journal of Neuroscience* 29:7439-7449.
- Kolakowski LF Jr (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept Channels* 2:1-7.
- Komander D, Patel M, Laurin M, Fradet N, Pelletier A, Barford D, Côté J-F (2008) An α -Helical Extension of the ELMO1 Pleckstrin Homology Domain Mediates Direct Interaction to DOCK180 and Is Critical in Rac Signaling. *Molecular Biology of the Cell* 19:4837-4851.
- Krasnoperov V, Bittner MA, Holz RW, Chepurny O, Petrenko AG (1999) Structural Requirements for α -Latrotoxin Binding and α -Latrotoxin-stimulated Secretion. *Journal of Biological Chemistry* 274:3590-3596.
- Krasnoperov VG, Bittner MA, Beavis R, Kuang Y, Salnikow KV, Chepurny OG, Little AR, Plotnikov AN, Wu D, Holz RW, Petrenko AG (1997) α -Latrotoxin Stimulates Exocytosis by the Interaction with a Neuronal G-Protein-Coupled Receptor. *Neuron* 18:925-937.

- Kreis P, Thévenot E, Rousseau V, Boda B, Muller D, Barnier J-V (2007) The p21-activated Kinase 3 Implicated in Mental Retardation Regulates Spine Morphogenesis through a Cdc42-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 282:21497 -21506.
- Kristiansen K (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & Therapeutics* 103:21-80.
- Kudo S, Konda R, Obara W, Kudo D, Tani K, Nakamura Y, Fujioka T (2007) Inhibition of tumor growth through suppression of angiogenesis by brain-specific angiogenesis inhibitor 1 gene transfer in murine renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 18:785-791.

- L -

- Lafont F, Rouget M, Rousselet A, Valenza C, Prochiantz A (1993) Specific responses of axons and dendrites to cytoskeleton perturbations: an in vitro study. *Journal of Cell Science* 104:433 -443.
- Lagerström MC, Rabe N, Haitina T, Kalnina I, Hellström AR, Klovins J, Kullander K, Schiöth HB (2007) The evolutionary history and tissue mapping of GPR123: specific CNS expression pattern predominantly in thalamic nuclei and regions containing large pyramidal cells. *J Neurochem* 100:1129-1142.
- Lagerström MC, Schiöth HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7:339-357.
- Lainé J, Axelrad H (1994) The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 339:159-173.
- Lee HW, Choi J, Shin H, Kim K, Yang J, Na M, Choi SY, Kang GB, Eom SH, Kim H, Kim E (2008) Preso, A Novel PSD-95-Interacting FERM and PDZ Domain Protein That Regulates Dendritic Spine Morphogenesis. *Journal of Neuroscience* 28:14546-14556.
- Letellier M, Bailly Y, Demais V, Sherrard RM, Mariani J, Lohof AM (2007) Reinnervation of late postnatal Purkinje cells by climbing fibers: neosynaptogenesis without transient multi-innervation. *J Neurosci* 27:5373-5383.
- Li S, Jin Z, Koirala S, Bu L, Xu L, Hynes RO, Walsh CA, Corfas G, Piao X (2008) GPR56 regulates pial basement membrane integrity and cortical lamination. *J Neurosci* 28:5817-5826.
- Li Z, Van Aelst L, Cline HT (2000) Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat Neurosci* 3:217-225.
- Lim IA, Hall DD, Hell JW (2002) Selectivity and Promiscuity of the First and Second PDZ Domains of PSD-95 and Synapse-associated Protein 102. *Journal of Biological Chemistry* 277:21697 -21711.
- Lin H-H, Stacey M, Yona S, Chang G-W (2010) GPS proteolytic cleavage of adhesion-GPCRs. *Adv Exp Med Biol* 706:49-58.
- Little KD, Hemler ME, Stipp CS (2004) Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association. *Mol Biol Cell* 15:2375-2387.
- Lu M, Kinchen JM, Rossman KL, Grimsley C, deBakker C, Brugnera E, Tosello-Tramont A-C, Haney LB, Klingele D, Sondek J, Hengartner MO, Ravichandran KS (2004) PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat Struct Mol Biol* 11:756-762.

- Lu M, Ravichandran KS (2006) Dock180–ELMO Cooperation in Rac Activation. In: Regulators and Effectors of Small GTPases: Rho Family, pp.388-402. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687906060289>.
- Luo L (2002) ACTIN CYTOSKELETON REGULATION IN NEURONAL MORPHOGENESIS AND STRUCTURAL PLASTICITY. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601-635.
- Luo L, Hensch TK, Ackerman L, Barbel S, Jan LY, Nung Jan Y (1996) Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* 379:837-840.

- M -

- Ma X-M, Huang J, Wang Y, Eipper BA, Mains RE (2003) Kalirin, a Multifunctional Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor, Is Necessary for Maintenance of Hippocampal Pyramidal Neuron Dendrites and Dendritic Spines. *The Journal of Neuroscience* 23:10593 -10603.
- Mariani J, Changeux J (1981a) Ontogenesis of olivocerebellar relationships. II. Spontaneous activity of inferior olivary neurons and climbing fiber-mediated activity of cerebellar Purkinje cells in developing rats. *The Journal of Neuroscience* 1:703 -709.
- Mariani J, Changeux J (1981b) Ontogenesis of olivocerebellar relationships. I. Studies by intracellular recordings of the multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the developing rat cerebellum. *The Journal of Neuroscience* 1:696 -702.
- Mariani J, Crepel F, Mikoshiba K, Changeux JP, Sotelo C (1977) Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from Reeler mutant mouse. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 281:1-28.
- Mason CA, Gregory E (1984) Postnatal maturation of cerebellar mossy and climbing fibers: transient expression of dual features on single axons. *J Neurosci* 4:1715-1735.
- Matsuda K, Miura E, Miyazaki T, Kakegawa W, Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Ito-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, Watanabe M, Yuzaki M (2010) Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer. *Science* 328:363-368.
- Matsuda K, Yuzaki M (2010) Cbln1 and the Delta2 Glutamate Receptor-An Orphan Ligand and an Orphan Receptor Find Their Partners. *Cerebellum* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20535596>.
- Matsuda K, Yuzaki M (2011) Cbln family proteins promote synapse formation by regulating distinct neurexin signaling pathways in various brain regions. *European Journal of Neuroscience* 33:1447-1461.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.
- McAllister AK (2007) Dynamic Aspects of CNS Synapse Formation. *Annual Review of Neuroscience* 30:425-450.
- McMillan DR, Kayes-Wandover KM, Richardson JA, White PC (2002) Very Large G Protein-coupled Receptor-1, the Largest Known Cell Surface Protein, Is Highly Expressed in the Developing Central Nervous System. *Journal of Biological Chemistry* 277:785 -792.
- McMillan DR, White PC (2004) Loss of the transmembrane and cytoplasmic domains of the very large G-protein-coupled receptor-1 (VLGR1 or Mass1) causes audiogenic seizures in mice. *Molecular and Cellular Neuroscience* 26:322-329.

- Metzger F, Kapfhammer JP (2000) Protein kinase C activity modulates dendritic differentiation of rat Purkinje cells in cerebellar slice cultures. *Eur J Neurosci* 12:1993-2005.
- Metzger F, Wiese S, Sendtner M (1998) Effect of Glutamate on Dendritic Growth in Embryonic Rat Motoneurons. *The Journal of Neuroscience* 18:1735 -1742.
- Miyazaki T, Fukaya M, Shimizu H, Watanabe M (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *European Journal of Neuroscience* 17:2563-2572.
- Miyazaki T, Hashimoto K, Shin H-S, Kano M, Watanabe M (2004) P/Q-Type Ca²⁺ Channel α 1A Regulates Synaptic Competition on Developing Cerebellar Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience* 24:1734 -1743.
- Miyazaki T, Watanabe M (2011) Development of an anatomical technique for visualizing the mode of climbing fiber innervation in Purkinje cells and its application to mutant mice lacking GluR δ 2 and Ca(v)2.1. *Anat Sci Int* 86:10-18.
- Miyazaki T, Yamasaki M, Takeuchi T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe M (2010) Ablation of glutamate receptor GluR δ 2 in adult Purkinje cells causes multiple innervation of climbing fibers by inducing aberrant invasion to parallel fiber innervation territory. *J Neurosci* 30:15196-15209.
- Monk KR, Oshima K, Jörs S, Heller S, Talbot WS (2011) Gpr126 is essential for peripheral nerve development and myelination in mammals. *Development* 138:2673 -2680.
- Montague P, Friedlander M (1991) Morphogenesis and territorial coverage by isolated mammalian retinal ganglion cells. *The Journal of Neuroscience* 11:1440 -1457.
- Montague PR, Friedlander MJ (1989) Expression of an intrinsic growth strategy by mammalian retinal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7223-7227.
- Morara S, van der Want JJ, de Weerd H, Provini L, Rosina A (2001) Ultrastructural analysis of climbing fiber-Purkinje cell synaptogenesis in the rat cerebellum. *Neuroscience* 108:655-671.
- Moresco EMY, Donaldson S, Williamson A, Koleske AJ (2005) Integrin-Mediated Dendrite Branch Maintenance Requires Abelson (Abl) Family Kinases. *The Journal of Neuroscience* 25:6105 -6118.
- Mori K, Kanemura Y, Fujikawa H, Nakano A, Ikemoto H, Ozaki I, Matsumoto T, Tamura K, Yokota M, Arita N (2002) Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) is expressed in human cerebral neuronal cells. *Neurosci Res* 43:69-74.
- Morrow EM, Kane A, Goff DC, Walsh CA (2008) Sequence analysis of P21-activated kinase 3 (PAK3) in chronic schizophrenia with cognitive impairment. *Schizophrenia Research* 106:265-267.
- Mugnaini E, Floris A (1994) The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 339:174-180.
- Muyldermans S (2001) Single domain camel antibodies: current status. *Reviews in Molecular Biotechnology* 74:277-302.

- N -

- Nakayama AY, Harms MB, Luo L (2000) Small GTPases Rac and Rho in the Maintenance of Dendritic Spines and Branches in Hippocampal Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 20:5329 -5338.
- Nam D-H, Park K, Suh YL, Kim J-H (2004) Expression of VEGF and brain specific angiogenesis inhibitor-1 in glioblastoma: prognostic significance. *Oncol Rep* 11:863-869.

- Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y (2002) The Neuropilins: Multifunctional Semaphorin and VEGF Receptors that Modulate Axon Guidance and Angiogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine* 12:13-19.
- Ng D, Pitcher GM, Szilard RK, Sertié A, Kanisek M, Clapcote SJ, Lipina T, Kalia LV, Joo D, McKerlie C, Cortez M, Roder JC, Salter MW, McInnes RR (2009) Neto1 Is a Novel CUB-Domain NMDA Receptor-Interacting Protein Required for Synaptic Plasticity and Learning Nestler E, éd. *PLoS Biology* 7:e41.
- Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, Kimura Y, Kiyono K, Tatsumi K, Yoshida S, Ono M, Kuwano M, Nakamura Y, Tokino T (1997) A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene* 15:2145-2150.

- O -

- Oda K, Shiratsuchi T, Nishimori H, Inazawa J, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y, Tokino T (1999) Identification of BAIAP2 (BAI-associated protein 2), a novel human homologue of hamster IRSp53, whose SH3 domain interacts with the cytoplasmic domain of BAI1. *Cytogenet Cell Genet* 84:75-82.
- Ohkawa N, Fujitani K, Tokunaga E, Furuya S, Inokuchi K (2007) The microtubule destabilizer stathmin mediates the development of dendritic arbors in neuronal cells. *Journal of Cell Science* 120:1447 -1456.
- Okajima D, Kudo G, Yokota H (2010) Brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (BAI2) may be activated by proteolytic processing. *J Recept Signal Transduct Res* 30:143-153.
- Okajima D, Kudo G, Yokota H (2011) Antidepressant-like behavior in brain-specific angiogenesis inhibitor 2-deficient mice. *J Physiol Sci* 61:47-54.
- OMS (1998) Schizophrenia and public health. Available at: http://www.who.int/mental_health/media/en/55.pdf.
- OMS (2001) Troubles mentaux et du comportement.
- OMS (2010) International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision. Available at: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>.

- P -

- Palay SL, Chan-Palay V (1974) *Cerebellar Cortex: Cytology and Organization*.
- Paramore CG, Turner DA, Madison RD (1992) Fluorescent labeling of dissociated fetal cells for tissue culture. *J Neurosci Methods* 44:7-17.
- Park D, Tosello-Tramont A-C, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, Klibanov AL, Mandell JW, Ravichandran KS (2007) BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 450:430-434.
- Peacock JH, Rush DF, Mathers LH (1979) Morphology of dissociated hippocampal cultures from fetal mice. *Brain Research* 169:231-246.
- Peng J, Kim MJ, Cheng D, Duong DM, Gygi SP, Sheng M (2004) Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J Biol Chem* 279:21003-21011.
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, Srivastava DP (2008) Convergent CaMK and RacGEF signals control dendritic structure and function. *Trends in Cell Biology* 18:405-413.

- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen J-E, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 14:285-293.
- Penzes P, Johnson RC, Sattler R, Zhang X, Huganir RL, Kambampati V, Mains RE, Eipper BA (2001) The Neuronal Rho-GEF Kalirin-7 Interacts with PDZ Domain-Containing Proteins and Regulates Dendritic Morphogenesis. *Neuron* 29:229-242.
- Perry VH, O'Connor V (2008) C1q: the perfect complement for a synaptic feast? *Nat Rev Neurosci* 9:807-811.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Picard M, Petrie RJ, Antoine-Bertrand J, Saint-Cyr-Proulx E, Villemure J-F, Lamarche-Vane N (2009) Spatial and temporal activation of the small GTPases RhoA and Rac1 by the netrin-1 receptor UNC5a during neurite outgrowth. *Cellular Signalling* 21:1961-1973.
- Pickering C, Hägglund M, Szmydynger-Chodobska J, Marques F, Palha JA, Waller L, Chodobski A, Fredriksson R, Lagerström MC, Schiöth HB (2008) The Adhesion GPCR GPR125 is specifically expressed in the choroid plexus and is upregulated following brain injury. *BMC Neuroscience* 9:97.
- Pijpers A, Apps R, Pardoe J, Voogd J, Ruigrok TJH (2006) Precise Spatial Relationships between Mossy Fibers and Climbing Fibers in Rat Cerebellar Cortical Zones. *The Journal of Neuroscience* 26:12067 -12080.
- Pinyol R, Haeckel A, Ritter A, Qualmann B, Kessels MM (2007) Regulation of N-WASP and the Arp2/3 Complex by Abp1 Controls Neuronal Morphology Heisenberg C-P, éd. *PLoS ONE* 2:e400.
- Polleux F, Morrow T, Ghosh A (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404:567-573.
- Poulain FE, Chauvin S, Wehrle R, Desclaux M, Mallet J, Vodjdani G, Dusart I, Sobel A (2008) SCLIP Is Crucial for the Formation and Development of the Purkinje Cell Dendritic Arbor. *Journal of Neuroscience* 28:7387-7398.
- Purpura DP (1975a) Dendritic differentiation in human cerebral cortex: normal and aberrant developmental patterns. *Adv Neurol* 12:91-134.
- Purpura DP (1975b) Normal and aberrant neuronal development in the cerebral cortex of human fetus and young infant. *UCLA Forum Med Sci*:141-169.
- Purves D, Lichtman JW (1980) Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science* 210:153-157.

- R -

- Rajan I, Witte S, Cline HT (1999) NMDA receptor activity stabilizes presynaptic retinotectal axons and postsynaptic optic tectal cell dendrites in vivo. *J Neurobiol* 38:357-368.
- Rakic P, Sidman RL (1973) Organization of cerebellar cortex secondary to deficit of granule cells in weaver mutant mice. *J Comp Neurol* 152:133-161.
- Ramón y Cajal S (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, Maloine.
- Rathjen FG, Wolff JM, Chang S, Bonhoeffer F, Raper JA (1987) Neurofascin: A novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell* 51:841-849.
- Raymond GV, Bauman ML, Kemper TL (1996) Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathol* 91:117-119.
- Rejeb I, Saillour Y, Castelnau L, Julien C, Bienvenu T, Taga P, Chaabouni H, Chelly J, Jemaa LB, Bahi-Buisson N (2008) A novel splice mutation in PAK3 gene underlying mental retardation with neuropsychiatric features. *Eur J Hum Genet* 16:1358-1363.

- Ren J, Gao X, Jin C, Zhu M, Wang X, Shaw A, Wen L, Yao X, Xue Y (2009) Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics* 9:3409-3412.
- Rich KA, George FW 4th, Law JL, Martin WJ (1990) Cell-adhesive motif in region II of malarial circumsporozoite protein. *Science* 249:1574-1577.
- Ridley AJ (2011) Life at the leading edge. *Cell* 145:1012-1022.
- Rocca DL, Martin S, Jenkins EL, Hanley JG (2008) Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 10:259-271.
- 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 Sabatini B, éd. *PLoS ONE* 3:e1997.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459:356-363.
- Ryo Y, Miyawaki A, Furuichi T, Mikoshiba K (1993) Expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR1 alpha and the ionotropic glutamate receptor GluR1 in the brain during the postnatal development of normal mouse and in the cerebellum from mutant mice. *J Neurosci Res* 36:19-32.

- S -

- Sakamoto H, Mezaki Y, Shikimi H, Ukena K, Tsutsui K (2003) Dendritic Growth and Spine Formation in Response to Estrogen in the Developing Purkinje Cell. *Endocrinology* 144:4466 -4477.
- Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K (2001) Effects of Progesterone Synthesized De Novo in the Developing Purkinje Cell on Its Dendritic Growth and Synaptogenesis. *The Journal of Neuroscience* 21:6221 -6232.
- Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR (2008) Activity-Dependent Synaptogenesis: Regulation by a CaM-Kinase Kinase/CaM-Kinase I/ β PIX Signaling Complex. *Neuron* 57:94-107.
- Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, Meloni I, Giachino D, Bruttini M, Hayek G, Zappella M, Renieri A (2005) CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *Journal of Medical Genetics* 42:103 -107.
- Scelfo B, Strata P (2005) Correlation between multiple climbing fibre regression and parallel fibre response development in the postnatal mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 21:971-978.
- Schilling K, Dickinson MH, Connor JA, Morgan JI (1991) Electrical activity in cerebellar cultures determines Purkinje cell dendritic growth patterns. *Neuron* 7:891-902.
- Schiöth HB, Fredriksson R (2005) The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol* 142:94-101.
- Schonewille M, Gao Z, Boele H-J, Veloz MFV, Amerika WE, Simek AAM, De Jeu MT, Steinberg JP, Takamiya K, Hoebeek FE, Linden DJ, Haganir RL, De Zeeuw CI (2011) Reevaluating the role of LTD in cerebellar motor learning. *Neuron* 70:43-50.
- Schoonover C (2010) *Portraits of the Mind: Visualizing the Brain from Antiquity to the 21st Century*. Abrams.
- Schrenk K, Kapfhammer J., Metzger F (2002) Altered dendritic development of cerebellar Purkinje cells in slice cultures from protein kinase C γ -deficient mice. *Neuroscience* 110:675-689.

- Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL, Segal RA (1997) Abnormal Cerebellar Development and Foliation in BDNF^{-/-} Mice Reveals a Role for Neurotrophins in CNS Patterning. *Neuron* 19:269-281.
- Seandel M, Falcioni I, Shmelkov SV, Kim J, James D, Rafii S (2008) Niche players: Spermatogonial progenitors marked by GPR125. *Cell Cycle* 7:135-140.
- Seidel J, Kunc K, Possinger K, Jehn C, Lüftner D (2011) Effect of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib on CUB-domain containing protein (CDCP1)-mediated breast cancer cell survival and migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414:226-232.
- Sekino Y, Kojima N, Shirao T (2007) Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry International* 51:92-104.
- Selimi F, Cristea IM, Heller E, Chait BT, Heintz N (2009) Proteomic studies of a single CNS synapse type: the parallel fiber/purkinje cell synapse. *PLoS Biol* 7:e83.
- Sharp DJ, Yu W, Ferhat L, Kuriyama R, Rueger DC, Baas PW (1997) Identification of a microtubule-associated motor protein essential for dendritic differentiation. *J Cell Biol* 138:833-843.
- Sheng M, Hoogenraad CC (2007) The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annu Rev Biochem* 76:823-847.
- Shima Y, Kawaguchi S, Kosaka K, Nakayama M, Hoshino M, Nabeshima Y, Hirano T, Uemura T (2007) Opposing roles in neurite growth control by two seven-pass transmembrane cadherins. *Nat Neurosci* 10:963-969.
- Shiratsuchi T, Futamura M, Oda K, Nishimori H, Nakamura Y, Tokino T (1998) Cloning and characterization of BAI-associated protein 1: a PDZ domain-containing protein that interacts with BAI1. *Biochem Biophys Res Commun* 247:597-604.
- Shiratsuchi T, Nishimori H, Ichise H, Nakamura Y, Tokino T (1997) Cloning and characterization of BAI2 and BAI3, novel genes homologous to brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1). *Cytogenet Cell Genet* 79:103-108.
- Shirazi Fard S, Kele J, Vilar M, Paratcha G, Ledda F (2010) Tiam1 as a signaling mediator of nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. *PLoS ONE* 5:e9647.
- Siddiqui TJ, Pancaroglu R, Kang Y, Rooyackers A, Craig AM (2010) LRRTMs and Neuroligins Bind Neurexins with a Differential Code to Cooperate in Glutamate Synapse Development. *Journal of Neuroscience* 30:7495-7506.
- Silva J-P, Lelianova V, Hopkins C, Volynski KE, Ushkaryov Y (2009) Functional cross-interaction of the fragments produced by the cleavage of distinct adhesion G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 284:6495-6506.
- Da Silva JS, Dotti CG (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci* 3:694-704.
- Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W, Dotti CG (2003) RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *The Journal of Cell Biology* 162:1267-1279.
- Sokolowski JD, Nobles SL, Heffron DS, Park D, Ravichandran KS, Mandell JW (2010) Brain-specific angiogenesis inhibitor-1 expression in astrocytes and neurons: Implications for its dual function as an apoptotic engulfment receptor. *Brain Behav Immun* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888903>.
- Sotelo C (1990) Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J Exp Biol* 153:225-249.
- Sotelo C (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol* 72:295-339.
- Sotelo C (2008) Development of « Pinceaux » formations and dendritic translocation of climbing fibers during the acquisition of the balance between glutamatergic and γ -

- aminobutyric acid inputs in developing Purkinje cells. *The Journal of Comparative Neurology* 506:240-262.
- Sotelo C, Dusart I (2009) Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neuroscience* 162:589-600.
- Sotelo C, Hillman DE, Zamora AJ, Llinás R (1975) Climbing fiber deafferentation: Its action on Purkinje cell dendritic spines. *Brain Research* 98:574-581.
- 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. *The Journal of Neuroscience* 17:190-203.
- Spatkowski G, Schilling K (2003) Postnatal dendritic morphogenesis of cerebellar basket and stellate cells in vitro. *J Neurosci Res* 72:317-326.
- Stacey M, Chang G-W, Davies JQ, Kwakkenbos MJ, Sanderson RD, Hamann J, Gordon S, Lin H-H (2003) The epidermal growth factor-like domains of the human EMR2 receptor mediate cell attachment through chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Blood* 102:2916-2924.
- Stacey M, Chang G-W, Sanos SL, Chittenden LR, Stubbs L, Gordon S, Lin H-H (2002) EMR4, a Novel Epidermal Growth Factor (EGF)-TM7 Molecule Up-regulated in Activated Mouse Macrophages, Binds to a Putative Cellular Ligand on B Lymphoma Cell Line A20. *Journal of Biological Chemistry* 277:29283-29293.
- Stacey M, Lin H-H, Hilyard KL, Gordon S, McKnight AJ (2001) Human Epidermal Growth Factor (EGF) Module-containing Mucin-like Hormone Receptor 3 Is a New Member of the EGF-TM7 Family That Recognizes a Ligand on Human Macrophages and Activated Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 276:18863-18870.
- State MW (2010) Another piece of the autism puzzle. *Nat Genet* 42:478-479.
- Stea A, Tomlinson WJ, Soong TW, Bourinet E, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP (1994) Localization and functional properties of a rat brain alpha 1A calcium channel reflect similarities to neuronal Q- and P-type channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:10576-10580.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA (2007) The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 131:1164-1178.
- Stone MC, Roegiers F, Rolls MM (2008) Microtubules have opposite orientation in axons and dendrites of *Drosophila* neurons. *Mol Biol Cell* 19:4122-4129.
- Südhof TC (2001) α -LATROTOXIN AND ITS RECEPTORS: Neurexins and CIRL/Latrophilins. *Annu Rev Neurosci* 24:933-962.
- Südhof TC (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455:903-911.
- Swinny JD, Metzger F, IJkema-Paassen J, Goukko NV, Gramsbergen A, van der Want JJJ (2004) Corticotropin-releasing factor and urocortin differentially modulate rat Purkinje cell dendritic outgrowth and differentiation in vitro. *Eur J Neurosci* 19:1749-1758.

- T -

- Tada T, Sheng M (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 16:95-101.
- Tada T, Simonetta A, Batterton M, Kinoshita M, Edbauer D, Sheng M (2007) Role of Septin Cytoskeleton in Spine Morphogenesis and Dendrite Development in Neurons. *Current Biology* 17:1752-1758.

- Takayama C, Nakagawa S, Watanabe M, Kurihara H, Mishina M, Inoue Y (1997) Altered intracellular localization of the glutamate receptor channel $\delta 2$ subunit in weaver and reeler Purkinje cells. *Brain Research* 745:231-242.
- Takeuchi T, Miyazaki T, Watanabe M, Mori H, Sakimura K, Mishina M (2005) Control of synaptic connection by glutamate receptor delta2 in the adult cerebellum. *J Neurosci* 25:2146-2156.
- Takeuchi Y, Kimura H, Sano Y (1982) Immunohistochemical demonstration of serotonin-containing nerve fibers in the cerebellum. *Cell Tissue Res* 226:1-12.
- Tanaka M, Ohashi R, Nakamura R, Shinmura K, Kamo T, Sakai R, Sugimura H (2004) Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J* 23:1075-1088.
- Tanaka M, Yanagawa Y, Obata K, Marunouchi T (2006) Dendritic morphogenesis of cerebellar Purkinje cells through extension and retraction revealed by long-term tracking of living cells in vitro. *Neuroscience* 141:663-674.
- Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, Sperner J, Fryns J-P, Schwinger E, Géczi J, Ropers H-H, Kalscheuer VM (2004) Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet* 75:1149-1154.
- Tashiro A, Yuste R (2008) Role of Rho GTPases in the Morphogenesis and Motility of Dendritic Spines. In: *Methods in Enzymology*, pp.285-302. Elsevier. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687907004211>.
- Threadgill R, Bobb K, Ghosh A (1997) Regulation of Dendritic Growth and Remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* 19:625-634.
- Tobaben S, Südhof TC, Stahl B (2000) The G protein-coupled receptor CL1 interacts directly with proteins of the Shank family. *J Biol Chem* 275:36204-36210.
- Tolias KF, Bikoff JB, Burette A, Paradis S, Harrar D, Tavazoie S, Weinberg RJ, Greenberg ME (2005) The Rac1-GEF Tiam1 Couples the NMDA Receptor to the Activity-Dependent Development of Dendritic Arbors and Spines. *Neuron* 45:525-538.
- Tolias KF, Bikoff JB, Kane CG, Tolias CS, Hu L, Greenberg ME (2007) The Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 mediates EphB receptor-dependent dendritic spine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:7265-7270.
- Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N (1993) Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 122:497-511.
- Tsutsui K (2008) Neurosteroids in the Purkinje cell: biosynthesis, mode of action and functional significance. *Mol Neurobiol* 37:116-125.
- Turner A-M, Morris K (2010) Controlling transcription with noncoding RNAs in mammalian cells. *BioTechniques* 48:ix-xvi.
- Tuttle R, Matthew WD (1991) An in vitro bioassay for neurite growth using cryostat sections of nervous tissue as a substratum. *J Neurosci Methods* 39:193-201.
- Tzarfaty-Majar V, López-Aleman R, Feinstein Y, Gombau L, Goldshmidt O, Soriano E, Muñoz-Cánoves P, Klar A (2001) Plasmin-mediated Release of the Guidance Molecule F-spondin from the Extracellular Matrix. *Journal of Biological Chemistry* 276:28233 - 28241.

- U - V -

- Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J (2008) Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68:264-288.

- Vadlamudi RK, Barnes CJ, Rayala S, Li F, Balasenthil S, Marcus S, Goodson HV, Sahin AA, Kumar R (2005) p21-Activated Kinase 1 Regulates Microtubule Dynamics by Phosphorylating Tubulin Cofactor B. *Molecular and Cellular Biology* 25:3726 -3736.
- Valen E et al. (2009) Genome-wide detection and analysis of hippocampus core promoters using DeepCAGE. *Genome Res* 19:255-265.
- Veitch NC (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65:249-259.
- Vessey JP, Karra D (2007) More than just synaptic building blocks: scaffolding proteins of the post-synaptic density regulate dendritic patterning. *J Neurochem* 102:324-332.
- Vincent J, Legrand C, Rabié A, Legrand J (1982) Effects of thyroid hormone on synaptogenesis in the molecular layer of the developing rat cerebellum. *J Physiol (Paris)* 78:729-738.

- W -

- Waller-Evans H, Prömel S, Langenhan T, Dixon J, Zahn D, Colledge WH, Doran J, Carlton MBL, Davies B, Aparicio SAJR, Grosse J, Russ AP (2010) The Orphan Adhesion-PCR GPR126 Is Required for Embryonic Development in the Mouse Ruhrberg C, éd. *PLoS ONE* 5:e14047.
- Wang VY, Zoghbi HY (2001) Genetic regulation of cerebellar development. *Nat Rev Neurosci* 2:484-491.
- Ward Y, Lake R, Yin JJ, Heger CD, Raffeld M, Goldsmith PK, Merino M, Kelly K (2011) LPA Receptor Heterodimerizes with CD97 to Amplify LPA-Initiated RHO-Dependent Signaling and Invasion in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research* 71:7301 -7311.
- Wassef M, Chedotal A, Cholley B, Thomasset M, Heizmann CW, Sotelo C (1992) Development of the olivocerebellar projection in the rat: I. Transient biochemical compartmentation of the inferior olive. *J Comp Neurol* 323:519-536.
- Watanabe F, Miyazaki T, Takeuchi T, Fukaya M, Nomura T, Noguchi S, Mori H, Sakimura K, Watanabe M, Mishina M (2008) Effects of FAK ablation on cerebellar foliation, Bergmann glia positioning and climbing fiber territory on Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 27:836-854.
- Watanabe M (2008) Molecular mechanisms governing competitive synaptic wiring in cerebellar Purkinje cells. *Tohoku J Exp Med* 214:175-190.
- Watanabe M, Kano M (2011) Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells. *European Journal of Neuroscience* 34:1697-1710.
- Waterman-Storer CM, Worthylake RA, Liu BP, Burridge K, Salmon ED (1999) Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol* 1:45-50.
- Webb DJ, Zhang H, Majumdar D, Horwitz AF (2007) $\alpha 5$ Integrin Signaling Regulates the Formation of Spines and Synapses in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 282:6929 -6935.
- Wechsler-Reya R, Scott MP (2001) The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* 24:385-428.
- Wells CM, Walmsley M, Ooi S, Tybulewicz V, Ridley AJ (2004) Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *Journal of Cell Science* 117:1259-1268.
- Whitford KL, Marillat V, Stein E, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Chédotal A, Ghosh A (2002) Regulation of Cortical Dendrite Development by Slit-Robo Interactions. *Neuron* 33:47-61.

- Whittaker CA, Bergeron K-F, Whittle J, Brandhorst BP, Burke RD, Hynes RO (2006) The echinoderm adhesome. *Dev Biol* 300:252-266.
- Wiens KM (2005) Rac1 Induces the Clustering of AMPA Receptors during Spinogenesis. *Journal of Neuroscience* 25:10627-10636.
- Van Wijk E, Van der Zwaag B, Peters T, Zimmermann U, Te Brinke H, Kersten FFJ, Märker T, Aller E, Hoefsloot LH, Cremers CWRJ, Cremers FPM, Wolfrum U, Knipper M, Roepman R, Kremer H (2006) The DFNB31 gene product whirlin connects to the Usher protein network in the cochlea and retina by direct association with USH2A and VLGR1. *Human Molecular Genetics* 15:751-765.
- de Wit J, Sylwestrak E, O'Sullivan ML, Otto S, Tiglio K, Savas JN, Yates JR, Comoletti D, Taylor P, Ghosh A (2009) LRRTM2 Interacts with Neurexin1 and Regulates Excitatory Synapse Formation. *Neuron* 64:799-806.
- Woo W-M, Berry EC, Hudson ML, Swale RE, Goncharov A, Chisholm AD (2008) The *C. elegans* F-spondin family protein SPON-1 maintains cell adhesion in neural and non-neural tissues. *Development* 135:2747-2756.

- X - Y - Z -

- Xie Z, Photowala H, Cahill ME, Srivastava DP, Woolfrey KM, Shum CY, Haganir RL, Penzes P (2008) Coordination of Synaptic Adhesion with Dendritic Spine Remodeling by AF-6 and Kalirin-7. *The Journal of Neuroscience* 28:6079-6091.
- Xie Z, Srivastava DP, Photowala H, Kai L, Cahill ME, Woolfrey KM, Shum CY, Surmeier DJ, Penzes P (2007) Kalirin-7 Controls Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron* 56:640-656.
- Xu J, Xiao N, Xia J (2009) Thrombospondin 1 accelerates synaptogenesis in hippocampal neurons through neuroligin 1. *Nature Neuroscience* 13:22-24.
- Yagi H, Noguchi Y, Kitamura K, Sato M (2009) Deficiency of *Vlgr1* resulted in deafness and susceptibility to audiogenic seizures while the degree of hearing impairment was not correlated with seizure severity in C57BL/6- and 129-backcrossed lines of *Vlgr1* knockout mice. *Neuroscience Letters* 461:190-195.
- Yagi H, Takamura Y, Yoneda T, Konno D, Akagi Y, Yoshida K, Sato M (2005) *Vlgr1* knockout mice show audiogenic seizure susceptibility. *Journal of Neurochemistry* 92:191-202.
- Yamagata M, Sanes JR (2010) Synaptic Localization and Function of Sidekick Recognition Molecules Require MAGI Scaffolding Proteins. *The Journal of Neuroscience* 30:3579-3588.
- Yona S, Lin H-H, Siu WO, Gordon S, Stacey M (2008) Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors. *Trends Biochem Sci* 33:491-500.
- Yoshihara Y, De Roo M, Muller D (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion in Neurobiology* 19:146-153.
- Zencir S, Ovee M, Dobson MJ, Banerjee M, Topcu Z, Mohanty S (2011) Identification of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 as an interaction partner of glutaminase interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun* 411:792-797.
- Zhang L, Goldman JE (1996) Generation of Cerebellar Interneurons from Dividing Progenitors in White Matter. *Neuron* 16:47-54.
- Zhang X, Baader SL, Bian F, Müller W, Oberdick J (2001) High level Purkinje cell specific expression of green fluorescent protein in transgenic mice. *Histochem Cell Biol* 115:455-464.

- Zhou L, Jones EV, Murai KK (2012) EphA signaling promotes actin-based dendritic spine remodeling through the slingshot phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.302802>.
- Ziv NE, Garner CC (2001) Principles of glutamatergic synapse formation: seeing the forest for the trees. *Current Opinion in Neurobiology* 11:536-543.