# Rôle de la protéine Alix dans le système nerveux central : De la neurogenèse à la plasticité synaptique

Marine Laporte

▶ **To cite this version:**

Marine Laporte. Rôle de la protéine Alix dans le système nerveux central : De la neurogenèse à la plasticité synaptique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV007 . tel-01452510

**HAL Id: tel-01452510**
**https://theses.hal.science/tel-01452510**

Submitted on 2 Feb 2017

**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.

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Neurosciences, Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par


## Marine LAPORTE


Thèse dirigée par **Sandrine FRABOULET**

Préparée au sein de **l'équipe Neurodégénérescence et Plasticité** dirigée par le Pr. Rémy SADOUL
au **Grenoble Institut des Neurosciences - Inserm U836**

dans **l'École Doctorale de Chimie et Science du Vivant**

# Rôle de la protéine Alix dans le système nerveux central : de la neurogenèse à la plasticité synaptique

Thèse soutenue publiquement le **13 novembre 2015**, devant le jury composé de :

**M. Frédéric SAUDOU**
PUPH, Universités de Grenoble, Président
**M. Maximilian FURTHAUER**
CR1, Université Nice Sophia Antipolis, Rapporteur
**M. David PERRAIS**
DR2, Université de Bordeaux 2, Rapporteur
**Mme Lydia DANGLOT**
CR1, Université Paris Diderot, Examinateur
**M. Pierre GRESSENS**
DR1, Université Paris Diderot, Examinateur
**M. Rémy SADOUL**
PU, Universités de Grenoble, Examinateur
**Mme Sandrine FRABOULET**
MCU, Universités de Grenoble, Directeur de Thèse

# Remerciements

Mes premiers remerciements vont aux membres de mon jury **Maximilian** Fürthauer, **David** Perrais, **Lydia** Danglot, **Pierre** Gressens et **Frédéric** Saudou qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour votre temps et le regard critique que vous avez porté sur mes travaux.

Sandrine et Rémy… Il va être difficile de résumer ce que je vous dois en quelques lignes. Merci de m'avoir permis de travailler à vos côtés en me confiant l'étude de vos Alix chéries que je suis bien triste de quitter. Merci pour votre confiance, vous avez su me laisser avancer à mon rythme et un peu, comme je l'entendais parfois, tout en étant toujours là quand j'en avais besoin. Votre complémentarité m'a offert le parfait équilibre pour arpenter les hauts sommets de la thèse. **Sandrine** je te remercie pour ton tempérament calme et avisé qui m'a souvent apaisée et canalisée. L'enthousiasme et le courage avec lequel tu te lançais dans chaque nouvelle technique et te plongeais dans la théorie de chaque « nouveau » phénotype de la souris m'ont servi d'exemple à suivre.
**Rémy**, je te remercie pour ta sincérité permanente et ta disponibilité. La simplicité avec laquelle nous pouvions aborder absolument tous les sujets m'a toujours agréablement étonnée. J'ai énormément profité de toutes ces discussions et je te remercie de m'avoir fait profiter de tant de connaissances et de m'avoir transmis le gout de la recherche.
Merci à tous les deux, vous avez été bien plus que de simples directeurs de thèse.

J'adresse également de sincères remerciements à tous les membres de la « famille équipe 2 ». Vous êtes, pour moi, l'exemple que générosité et convivialité riment avec rigueur et qualité scientifique. Je vous remercie des conditions de travail dont j'ai pu bénéficier, aussi bien sur le plan humain que professionnel.
**Chantal**, merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche sous un regard aussi passionné. Je suis arrivée dans l'équipe en 2009 avec la ferme intention de partir en Master pro mais tu étais convaincue je devais faire une thèse… Alors voilà, je t'ai écouté Chantal et je te remercie m'avoir donné la confiance dont je manquais. Grâce à toi, j'ai découvert un monde que j'espère ne pas quitter de si tôt.
**Anne**… Comment résumer mes remerciements en une phrase… « Ola Qué tal ? Qué tal y tu ? Qué tal qué tal… » Merci pour nos fous rires, nos discussions de filles toujours discrètes, les arlequins, merci de m'avoir toujours donné l'impression que j'étais super balaise sur Excel, merci pour ta positive attitude et tes paroles souvent réconfortantes.
Merci aux deux post-doc du labo, **Karine**, pour tes paroles rassurantes et tous tes conseils de post-doc expérimentée (j'ai pas dit vieille !!) sur la vie après la thèse, la joie de voler de ses propres ailes, de découvrir un autre labo, enfin de ne plus être un thésard quoi. Merci à **José** pour ton aide ! Pardon d'avoir si souvent détruit la langue espagnole avec Anne…
Merci à **Fiona** de qui j'ai beaucoup écorché les oreilles au cours de ces 5 années. Merci pour la patience avec laquelle tu m'as reprise, corrigée et ainsi fait progresser en anglais. Merci pour ta gentillesse et ton humour qui m'ont beaucoup fait de bien... Le souvenir du dossier nommé « sperme Marine » reste un de mes plus beaux fous rires. Merci également de m'avoir appris absolument tout de l'histologie (tout, mais surtout que la paraffine c'est mieux !).
Merci **Yves** pour tes conseils et tes explications poussées en statistique où chacune de mes questions menait à la démonstration mathématique de chaque test. Merci à **Fred** pour ton aide quotidienne et la patience avec laquelle tu m'as appris à dompter les souris Alix ko. Merci également à **Karine**, notre gestionnaire adorée, pour ton sourire, ta bonne humeur et ton culot

qui m'ont souvent sortis de situations impossibles, et à **Anne** d'avoir prit le relai avec beaucoup d'efficacité et de dynamisme.
Un grand, que dis-je, un immense merci à **Béa** et **Christine**… Aucun étudiant ne saurait s'en sortir sans l'une de vous dans les parages. Merci pour votre disponibilité illimitée et la gentillesse avec laquelle vous m'avez toujours apporté votre aide. Christine, merci des moments passés ensembles à décortiquer le phénotype des souris, ou encore de m'avoir appris que l'eau du robinet ne s'autoclave pas !! Mais aussi pour tous les à-côtés qui n'ont finalement pas grand chose à voir avec la science. Merci Béa pour toutes nos discussions, plus souvent philosophiques que scientifiques. J'applique régulièrement ta théorie de la fainéantise intelligente, même si des fois ça n'a rien d'intelligent… Tu m'as beaucoup appris pendant cette thèse au cours de laquelle je ne me suis pas construite que scientifiquement.

Merci également aux petits jeunots qui, de leur passage éclaire ont su mettre un peu de soleil et de joie dans mon quotidien : **Galil**, **Matthieu**, **Jessica**, et mes 3 petits poussins **Rachel**, **Céline** et **Laurie**. Merci pour votre bonne humeur et vos questions pertinentes. Merci à **Victoria** et **Florent**, avec qui je n'ai pas forcement partagé que des sourires au café. Merci pour votre implication dans le projet Alix qui demandait l'acharnement et la rigueur dont vous avez fait preuve. Ca a été un plaisir de travailler avec vous. Un dernier merci à **Joseph**. Few words in english to tell you how great it was to have you around for my last months in the lab. It has been a pleasure to work with you, to teach you French (and science) and to learn from you. I wish you all the best you deserve for your phD and afterward.

Enfin je ne pourrais remercier l'équipe 2 sans une mention spéciale aux doctorants Sadouliens. **Mathilde** et **Romain** vous nous avez tenu la main puis passé le relais avec beaucoup de sympathie. Mathilde, merci de m'avoir montré qu'il ne faut jamais baisser les bras ! Romain, merci pour les moments qu'on a partagé à parler ESCRT ou du dernier modèle de chez Volkl. Bonne chance à vous deux ! **Charlotte**, merci d'être mon acolyte des plans machiavéliques de manipulation de haut niveau ! Merci pour ta bonne humeur et particulièrement pour tes délicates attentions ces dernières semaines. Entre la relecture et les petits plats, tu m'as bien materné… Faut dire que tu sais faire maintenant, j'en connais une qui a de la chance de t'avoir pout toute la vie ! Pour finir, **Vincent**… Nos discussions dans la pièce de culture vont me manquer… Heureusement que y'avait un sas parfois… ! Tu as toujours su quand me remonter le moral et quand me laisser faire mon boudin, comme un véritable ami.

Et voilà, j'ai fait une tartine… Mais je ne pouvais pas faire plus court. Bonne continuation à vous tous que je n'oublierai jamais… Nul besoin de tatouage sur la fesse gauche pour garder en mémoire les années passées à vos cotés, le souvenir de ce laboratoire est gravé dans un endroit que les aléas de la vie ne sauraient déformer.

Je remercie également les animaliers pour leur travail qui a largement contribué à mes travaux de thèse. Merci **Fabien**, **Laure**, **Romain**, **Sylvain**, **Pauline** et **Manon** et pardon pour toutes les fois où j'ai fichu le bordel à l'animalerie…

Merci aux membres des autres équipes du GIN qui ont ponctué mon quotidien de bons conseils et de moments sympathique sur la terrasse, autour d'une bière ou au restau U. Merci à **Jacques**, **Toff**, **Eric**, **Annie**, **Marie-Jo**, **Christophe, Nora, Fabien**, **Mireille**, **Sylvie, Alain**, **Isabelle** et **Julie** pour les discussions scientifiques, les encouragements, les blagues du vendredi, les gâteaux d'anniversaire, les échanges de bouquin et les conseils de diététique. Merci à **Yasmina** pour nos superbes collaborations et les bons moments qui vont avec. Je n'oublierai jamais la semaine à

Bordeaux avec **Florence** où votre notoriété à Imaging the Cell me faisait assister à tous les moments les plus sympas ! Un petit merci pour les Bordelais, **Ngoc, Morgane** et **David** pour leur accueil et leur gentillesse pendant mon séjour.

Un remerciement spécial à **Karin S.**, découvreuse du phénotype qui fait la véritable notoriété des souris Alix ko… Mais surtout, pour ta gentillesse et ta générosité qui m'ont toujours beaucoup touchée. Merci pour ton accueil chaleureux à l'occasion des nombreuses soirées que l'on a faites chez vous.
Merci à tous les enseignant chercheurs pour leur confiance lors de mes quatre années d'enseignement : **Stefan**, **Emmanuelle**, **Bertrand**, **Claire**, **Virginie**, **Frank** et bien sur **Fiona**, **Sandrine** et **Rémy**.

Merci également aux copains du GIN, **Hélène**, **Mathieu**, **Mélina**, **Alexia**, **Margaux**, **Ben**, **Chrystelle**, **Julie**, **Max, Sandrine**, **Lucie**, **Muriel**, **Julie-Anne**, **Anne-Cécile**, **Fabienne**, **Soumya**, **Aurélie**… pour tous les joyeux moments, plus nocturne que diurne, qu'on a vécu ensemble dans les bars, sur des skis, dans les bars, à faire les dindes, dans les bars et dans la niche du chien d'Annie… Mention spéciale à **Martalinette** et **Eléa** (alias Kelya) dont le rire cristallin traversait tout le deuxième étage pour venir égayer mes journées. Ne changez rien les filles, vous nous faites beaucoup de bien.
Merci tout particulier à Marc, Lauriane, Marie-Lise et Anouk qui, plus que des co-thesard, sont devenus de vrais amis. **Anouk**, **Marie-Lise**, merci de m'avoir entrainé dans de folles aventures mais aussi de me montrer à quoi ressemble l'ascension vers la sagesse. **Marc** et **Lauriane**, merci pour vos délicates attentions et votre inconditionnelle gentillesse. Merci à **Fannynette**, ma coloc d'amour pour les bons petits plats et les soirées tranquilles où on refaisait le monde sur le canapé en regardant tellement vrai… A nous écouter, on aurait pu diriger nos équipes, le GIN, la France, l'univers… Merci pour tout ça.

**Alexis**, mon chouchou, merci pour tout, je n'ai la place et trop de pudeur pour tout écrire mais tu sais tout ce que tu représentes pour moi. Merci pour nos discussion scientifiques (mais pas que) au Saint-Pierre, d'avoir toujours été là dans les bons et les mauvais moments du M1 jusqu'à mes dernières heures de rédaction !! Qu'on soit bien d'accord, tu es carrément exceptionnel !!

A mes supers copains qui me ramènent à la vrai vie : **Marine**, **Laura**, **Guigui**, **Clairounette**, **Mimi**, **Piloo**, **Anne-Cha**, **Victoria**, **Elsa**, **Zai**, **Ségolène**, **Nico**, **Robinou**, **Laurette**, **Chachaaaa**, **Sarah**, **Chris**, **Chachou**, **John** et **Arthur**, le petit nouveau. Je vous remercie de vos encouragements (surtout ceux venant d'Australie) et d'être restés là malgré mon absence totale de nouvelle, en tout particulier pendant la rédaction !

Merci aussi à **toute ma famille**, de me supporter depuis toujours.
Merci à mes parents d'avoir toujours été la en cas de besoin sans jamais me laisser m'apitoyer sur mon sort. Merci **Yves-Michel** pour tes précieux conseil de vie et **maman**, heureusement que tu étais la pour me coucouner mais aussi me rappeler de… payer mes impôts, de me nourrir, de donner des nouvelles… Merci d'être toujours la quand j'ai besoin de toi. Je remercie également **Morgane**, **Thomas**, **Nathan** et **Maël**, qui me rappellent jour après jour que plus belle ambition dans la vie, c'est d'être heureux.

Et pour finir, merci à **Alex** simplement pour ce que tu es. Je ne serai jamais venu à bout de cette thèse sans toi à mes cotés. Maintenant, prépare toi à me voir débouler dans ta petite vie de Genevois, pour écrire un nouveau chapitre de notre vie.

# Liste des abréviations principales

4AP : 4-aminopyridine
Alg-2 : apoptosis-linked gene 2
Alix : Alg-2 interacting protein X
AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-methylisoazol-4-propionate
ANR : anterior neural ridge
AP2 : adaptor protein 2
BDNF : brain-derived neurotrophic factor
BE : bulk endocytose
bRG : basal Radial glia progenitor (progéniteurs basaux de la glie radiaire)
CIE : clathrin-independent endocytosis
CHMP : charged multivesicular protein
CME : clathrine-mediated endocytosis
CR : Cajal-Retzius
CTxB : Cholera Toxin Chain B
EGC : éminence ganglionnaire caudale
EGF : epithelium growth factor
EGFR : epithelium growth factor receptor
EGL : éminence ganglionnaire latérale
EGM : éminence ganglionnaire médiane
EIAV : equine infectious anemia virus
Ena/VASP : enable/vasodilatator-stimulated phosphoprotein
ESCRT : endosomal sorting complexe required for transport
F-actine : actine filamenteuse
FAK : focal adhesion kinase
FGF : fibroblast growth factor
FGFR : fibroblast growth factor receptor
G-actine : actine Globulaire
GM1 : Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
ILV : intraluminal vesicle
IP : progéniteurs intermédiaires
Ko : knockout
LBPA : Lysobisphosphatidic acid
LTP : long term potentiation
MAP : microtubule associated protein
MEF : mouse embryonic fibroblast
MVE : multivesicular endosome
NEC : neuroepithelial cells (cellules neuroépithéliales)
NGF : neural growth factor
NLG : Neuroligine
NMDA : *N*-méthyl-D-aspartate
NT : neurotransmetteur
PC : plaque corticale
$PIP_2$ : Phosphatidylinositol(4,5)Phosphate
PoA : pre-optic area (Aire pré-optique)
PP : pré-plaque
PPSE : potentiel post-synaptique excitateur

PRD : prolin rich domain
PSD : post-synaptic density (densité post-synaptique)
RGC : radial glial cells (cellules de la glie radiaire)
SHF : stimulation haute fréquence
SNARE : (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor)
SNC : système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
SP : sous plaque
Tsg-101 : tumor susceptibility gene 101
UFE : ultra-fast-endocytosis
VAMP : vesicle-associated membrane protein
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VPS : vesicular sorting protein
VS : vesicule synaptique
Wnt : Wingless Integration site
ZM : Zone marginale
ZSV : Zone sub-ventriculaire
ZV : Zone ventriculaire
Wt : wild type

# SOMMAIRE

**Préambule** ..... 5

**INTRODUCTION** ..... 7

**I. Le système nerveux central : Origine et développement** ..... 8

**1. Introduction générale** ..... 8

**2. Formation des structures cérébrales** ..... 9

2.1. Apparition du tube neural ..... 9

2.2. Organogenèse ..... 9

**3. Mécanismes contrôlant l'organogenèse : Exemple du cortex** ..... 11

3.1. Neurogenèse et gliogenèse ..... 13

3.1.1. Les cellules du télencéphale dorsal ..... 13

*3.1.1.1. Des NEC aux RGC* ..... 13

*3.1.1.2. Des RGC aux neurones et astrocytes* ..... 17

3.1.2. Les cellules non originaires du télencéphale dorsal ..... 22

*3.1.2.1. Les cellules de Cajal-Retzius* ..... 22

*3.1.2.2. Les cellules du télencéphale ventral* ..... 24

*3.1.2.3. Les oligodendrocytes et la microglie* ..... 27

3.2. Migration ..... 27

3.2.1. La migration tangentielle ..... 29

3.2.2. La migration radiaire ..... 29

**4. Organisation en réseaux fonctionnels** ..... 30

4.1. Différenciation des neurones ..... 31

4.1.1. Initiation et élongation ..... 31

*4.1.1.1. Rôle majeur du cytosquelette d'actine* ..... 31

*4.1.1.2. Le cône de croissance : Elément essentiel de la pousse neuritique* ..... 33

4.1.2. Différenciation et croissance axonale ..... 36

*4.1.2.1. Importance de la membrane plasmique* ..... 36

*4.1.2.2. Rôle des molécules extracellulaires* ..... 36

4.2. Contacts neuronaux ..... 39
4.2.1. Guidage axonal ..... 39
4.2.2. Raffinement du réseau ..... 43
4.2.3. Etablissement des synapses ..... 45
*4.2.3.1. Définition et composition d'une synapse* ..... 45
*4.2.3.2. Régulation de la synaptogenèse* ..... 47
**5. Transmission synaptique** ..... 51
5.1. La partie pré-synaptique ..... 54
5.1.1. Relarguage des NT ..... 54
5.1.2. Recyclage des vésicules synaptiques ..... 55
*5.1.2.1. Recyclage dépendant de la clathrine* ..... 55
*5.1.2.2. Voies indépendantes de la clathrine* ..... 57
5.2. La partie post-synaptique ..... 59
5.2.1. Mécanismes moléculaires de la plasticité : Exemple de la LTP ..... 61
5.2.2. Morphologie des épines dendritiques : Rôle essentiel dans la plasticité ..... 64
5.2.3. Acteurs moléculaires de la morphologie des épines dendritiques ..... 65

**II. La protéine Alix** ..... 69
**1. Structure et interactions** ..... 69
**2. Fonctions** ..... 72
2.1. Alix et ESCRT : Les acteurs de la déformation membranaire ..... 72
2.1.1. Découverte des ESCRT dans la voie endosomale ..... 72
*2.1.1.1. La voie endosomale* ..... 72
*2.1.1.2. Mécanismes de déformation de la membrane par les ESCRT* ..... 73
2.1.2. Processus cellulaires contrôlés par Alix et les ESCRT ..... 78
*2.1.2.1. Régulation des ILV…* ..... 78
*2.1.2.2. Cytocinèse* ..... 81
*2.1.2.3. Bourgeonnement viral* ..... 82
*2.1.2.4. Réparation membranaire* ..... 82
2.2. Alix induit la mort cellulaire programmée ..... 85
2.3. Alix est régulée par phosphorylation ..... 87

2.3.1. Adhésion cellulaire ..... 87
2.3.2. Endocytose ..... 88

**III. But de l'étude ..... 91**

**RESULTATS ..... 93**

**1. Rôle d'Alix dans la régulation des voies d'endocytose indépendantes de la clathrine ..... 94**
1.1. Contexte de l'étude ..... 94
1.2. Article 1 – « ALG-2 Interacting Protein X (Alix) is essential for clathrin-independent endocytosis » ..... 96
**2. Rôle d'Alix dans le développement du système nerveux central ..... 139**
2.1. Contexte de l'étude ..... 139
2.2. Article 2 – « Alix is required for development of the mouse brain to normal size » ..... 141
**3. Rôle d'Alix dans la morphologie et la fonction des synapses ..... 181**
3.1. Contexte de l'étude ..... 181
3.2. Etude de la fonctionnalité synaptique chez les souris Alix ko ..... 183
3.2.1. Morphologie des synapses chez la souris Alix ko ..... 183
*3.2.1.1. Déstabilisation du complexe ESCRT-III en absence d'Alix* ..... 183
*3.2.1.2. Morphologie des synapses Alix ko in vivo* ..... 186
3.2.2. Transmission synaptique et plasticité ..... 187
*3.2.2.1. Enregistrements électrophysiologiques in vivo* ..... 187
*3.2.2.2. Recrutement d'Alix sous stimulation* ..... 188
*3.2.2.3. Altération de l'endocytose pré-synaptique* ..... 191

**DISCUSSION ..... 194**

**1. Endocytose clathrine indépendante : Avec ou sans ESCRT ? ..... 195**
**2. L'endocytose clathrine indépendante à l'origine du développement cérébral ? ..... 197**
2.1 Développement embryonnaire ..... 197

2.2 Développement post-natal ..... 200
**3. Alix aux synapses : Endophiline ou ESCRT, pourquoi choisir ?** ..... **203**
3.1. En post avec les ESCRT ..... **203**
3.2. L'endophiline, face aux épines ..... **205**
**Conclusion générale** ..... **206**

**REFERENCES** ..... **208**

**ANNEXES** ..... **226**

Annexe 1 : Protocoles expérimentaux référents à la partie 3 ..... **226**
Annexe 2 : Article 3 – « Regulation of Postsynaptic Function by the Dementia-Related ESCRT-III Subunit CHMP2B » ..... **226**

# Préambule

Alix (ALG-2 Interacting Protein X) est une protéine cytoplasmique ubiquitaire et multifonctionnelle. Elle est impliquée dans divers processus cellulaires allant de l'apoptose à la cytocinèse en passant par le bourgeonnement des virus, la réparation membranaire et la régulation de la voie endosomale. Toutes ces fonctions sont étroitement associées à l'interaction d'Alix avec ses partenaires impliqués dans la déformation des membranes telles que les endophilines A, Tsg-101 et CHMP4B du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Le but de cette thèse a été de caractériser le phénotype des souris déficientes pour la protéine Alix (Alix ko) dans l'espoir de mieux comprendre le rôle physiologique d'Alix. Ainsi, l'étude des mécanismes cellulaires sous-jacents au phénotype de la souris Alix ko et devrait permettre :

1) Une confirmation des fonctions d'Alix, démontrées *in vitro*, dans un contexte physiologique.

2) Une avancée sur la compréhension des mécanismes cellulaires à l'origine des grandes étapes du développement du système nerveux central.

Le phénotype développemental majeur de ces souris, viables et fertiles, est une microcéphalie apparaissant au cours de l'embryogenèse et s'exacerbant avec l'âge. De par sa fonction dans la division et la mort cellulaire ainsi que dans le contrôle de la voie endosomale, Alix pourrait intervenir dans les différentes étapes du développement du système nerveux. La première partie de cette introduction décrit les 2 étapes majeures du développement du système nerveux dont la dérégulation peut aboutir à l'apparition d'une microcéphalie : la neurogenèse et le développement des prolongements neuronaux. Les mécanismes cellulaires sous-jacents faisant un lien avec les fonctions connues d'Alix telles que le contrôle de l'endocytose et de l'exocytose et la régulation du cytosquelette d'actine sont particulièrement développés. Ainsi, le lien entre ces processus et la division des cellules progénitrices, la migration des neuroblastes et la

maturation des prolongements neuronaux sont mis en avant dans les parties « I.3.1 Neurogenèse et gliogenèse » et « I.4.1. Différenciation des neurones ».

Les souris Alix ko adultes présentent également une altération de la fonctionnalité synaptique. Ce phénotype est partiellement associé à la capacité d'Alix à réguler le complexe ESCRT dont certains membres ont récemment été impliqués dans la morphogenèse des épines dendritiques (Annexe 2- Article 3). Notre découverte de la fonction d'Alix dans la régulation des voies d'endocytose indépendantes de la clathrine (Résultats - Article 1) offre également une autre interprétation de ce phénotype à travers une perturbation du recyclage des vésicules synaptiques qui dépend de l'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine. De ce fait, la régulation du recyclage des vésicules synaptiques, la morphologie des épines dendritiques et leur importance sur la fonctionnalité synaptique sont décrites dans les parties « 5.1 La partie pré-synaptique » et « 5.2 La partie post-synaptique ».

# INTRODUCTION

# I. Le système nerveux central : Origine et développement

## 1. Introduction générale

Le cerveau est l'organe essentiel à l'origine de tous les processus vitaux allant des fonctions cognitives supérieures telles que la prise de décision jusqu'aux plus primitives telles que la contraction des muscles.

Chez les mammifères le développement du système nerveux démarre très tôt au cours de l'embryogenèse et ne se termine jamais vraiment. En effet, bien que les étapes du développement à proprement parler soient parfaitement caractérisées, le cerveau est un organe dont la perpétuelle évolution est fonction des expériences et de l'environnement de l'individu. Ces facteurs extrinsèques peuvent ainsi moduler positivement ou négativement le fonctionnement du système nerveux central bien après la fin du développement. Si bien que les causes exactes d'un dysfonctionnement sont souvent impossibles à déterminer et rendent l'origine des pathologies du système nerveux d'une effroyable complexité. La compréhension des mécanismes par lesquels ces facteurs extrinsèques régulent le fonctionnement du système nerveux central (SNC) est autant cruciale qu'elle est impossible à l'échelle du cerveau tout entier.
L'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'échelle du neurone semble donc être une alternative pour appréhender le fonctionnement du cerveau. En effet, alors que les études anatomiques et comportementales ont tout d'abord permis de rendre compte de l'origine du SNC et de son organisation, la régulation de celles-ci ne pouvait être abordée que par l'utilisation de modèles cellulaires.

La suite de ce chapitre sur le système nerveux central traitera donc des mécanismes cellulaires et moléculaires principaux régulant les étapes du développement du cerveau de l'apparition du tube neural à la plasticité synaptique.

## 2. Formation des structures cérébrales

### 2.1. Apparition du tube neural

Le système nerveux central se développe précocement au cours de l'embryogenèse. Chez la souris, au cours de la première semaine de développement, les trois feuillets embryonnaires à l'origine des différents organes se mettent en place. L'endoderme, feuillet le plus interne donnera les viscères, les poumons et le foie ; le mésoderme est à l'origine de la musculature striée, du système vasculaire et des tissus conjonctif ; et enfin l'ectoderme est à l'origine de l'épiderme et du système nerveux central et périphérique. Cette étape de gastrulation mettant en place les feuillets embryonnaires est également caractérisée par l'apparition des axes antéro-postérieur et dorso-ventral de l'embryon. Au terme du septième jour post-fécondation, la région dorsale de l'ectoderme se différencie en neuroectoderme à l'origine du système nerveux, tandis-que les régions latérales donneront naissance à l'épiderme. Cette zone de différenciation, dénommée « plaque neurale » s'épaissit et se replie sur elle même en formant deux sillons responsables de l'apparition de la gouttière neurale. Enfin, les sillons formant la gouttière se rapprochent pour fusionner dorsalement au niveau de la région centrale puis au niveau rostral enfin caudalement dans l'embryon constituant ainsi un tube neural entièrement individualisé duquel dérive le système nerveux central. Certaines cellules spécialisées se désépithélialisent et migrent ensuite à partir de la région dorsale du tube pour former les cellules des crêtes neurales à l'origine du système nerveux périphérique (SNP) (Figure 1). Les mécanismes nécessaires à la mise en place précoce du tube neural ne seront pas décrits dans ce manuscrit.

### 2.2. Organogenèse

Après la fermeture du tube neural, une importante période de divisions cellulaires aboutit à l'épaississement différentiel des parois du tube dans la région caudale et rostrale. Ainsi, la région caudale conserve son aspect tubulaire formant ainsi la future moelle épinière, tandis-que la partie rostrale subit un épaississement inégal aboutissant à la constitution de trois vésicules céphaliques dites « primitives » (Figure 2). Ces trois vésicules forment le prosencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur). Au cours de l'organogenèse, ces

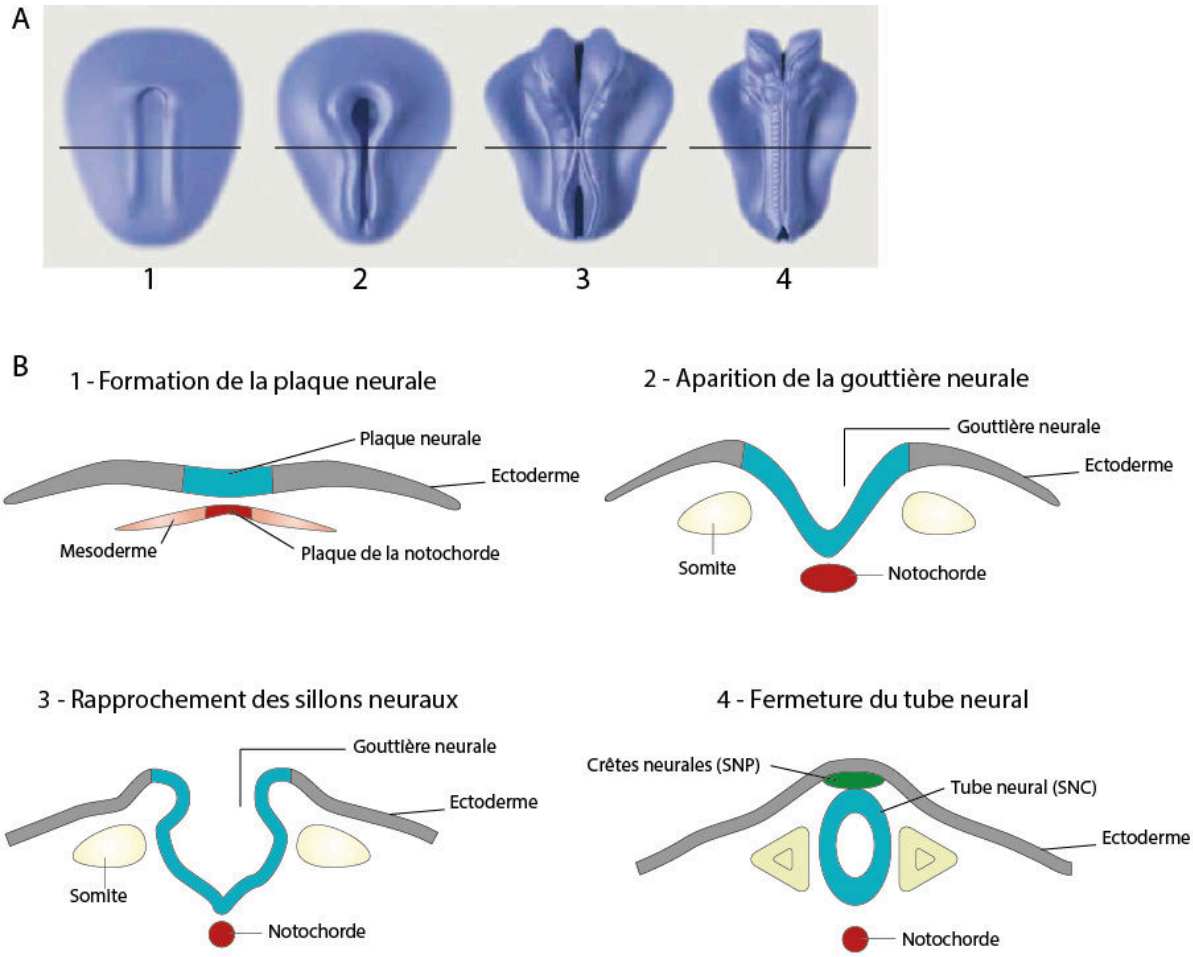



**Figure 1. Fermeture du tube neural**

A) Vue dorsale d'un tube neural en formation

B) Schéma de coupes transversales au niveau des zones indiquées en A, décrivant les étapes d'apparition de la plaque neurale (1) suivie de la formation et le rapprochement des sillons neuraux (2 et 3) puis de la fermeture du tube neural (4). Au cours de la fermeture du tube, les cellules des extrémités de la gouttière neurale migrent pour former les crêtes neurales donnant par la suite le SNP. La notochorde est une structure d'origine mésodermique impliquée dans le développement de l'axe dorso-ventral, les somites formeront le tissu musculaire et la colonne vertébrale. Adapté de (Blom et al., 2006).

trois vésicules vont subir différentes étapes de différenciation communes permettant de former toutes les structures du cerveau adulte. Le prosencéphale évolue en télencéphale et diencéphale responsables de la formation des structures impliquées dans les fonctions cognitives supérieures (hémisphères cérébraux, hippocampe, bulbe olfactif, amygdale et ganglions de la base), dans la sécrétion d'hormones et dans le contrôle de l'activation télencéphalique (thalamus, hypothalamus, neurohypophyse et épiphyse). Le mésencéphale donnera les structures intermédiaires de l'encéphale (substance noire, colliculi supérieurs et inférieurs) permettant d'assurer les connexions entre les régions supérieures et inférieures portées respectivement par le prosencéphale et le rhombencéphale. Ce dernier se subdivise en métencéphale et myélencéphale formant les structures responsables des fonctions primitives (pont, cervelet, bulbe rachidien). L'ensemble de ces structures se développe de manière parallèle selon un processus commun de neurogenèse qui s'étend de la fin de la première semaine embryonnaire à plusieurs semaines post-natales (Figure 2).
L'ensemble des mécanismes permettant l'expansion et la formation de toutes les structures du cerveau sera expliqué en détail à travers l'exemple du télencéphale dont l'organisation est à la fois la plus complexe et la plus étudiée aujourd'hui.

## 3. Mécanismes contrôlant l'organogenèse : Exemple du cortex

Le télencéphale se compose de différentes régions portées par le pallium (télencéphale dorsal) et le sous-pallium (télencéphale ventral). La région antérieur-latérale du pallium donnera naissance au néocortex, tandis-que la région postérieur-médiane donnera naissance à l'hippocampe et au plexus choroïde ventriculaire. Le télencéphale ventral, également composé de différentes régions donnera les éminences ganglionnaires médianes (EGM), latérales (EGL) et caudales (EGC) (Figure 3). Toutes les structures du télencéphale sont finement organisées en couches stratifiées de neurones. Le cortex est composé de six couches de neurones, nommées de I à VI qui se forment selon un ordre défini. Les couches formées précocement (IV, V et VI) vont composer les couches profondes du cortex tandis que celles formées plus tardivement (II et III) formeront les couches superficielles. Seule la couche I fait exception, se formant en premier, elle va donner la couche la plus superficielle du cortex responsable de l'organisation inversée des cinq autres couches.

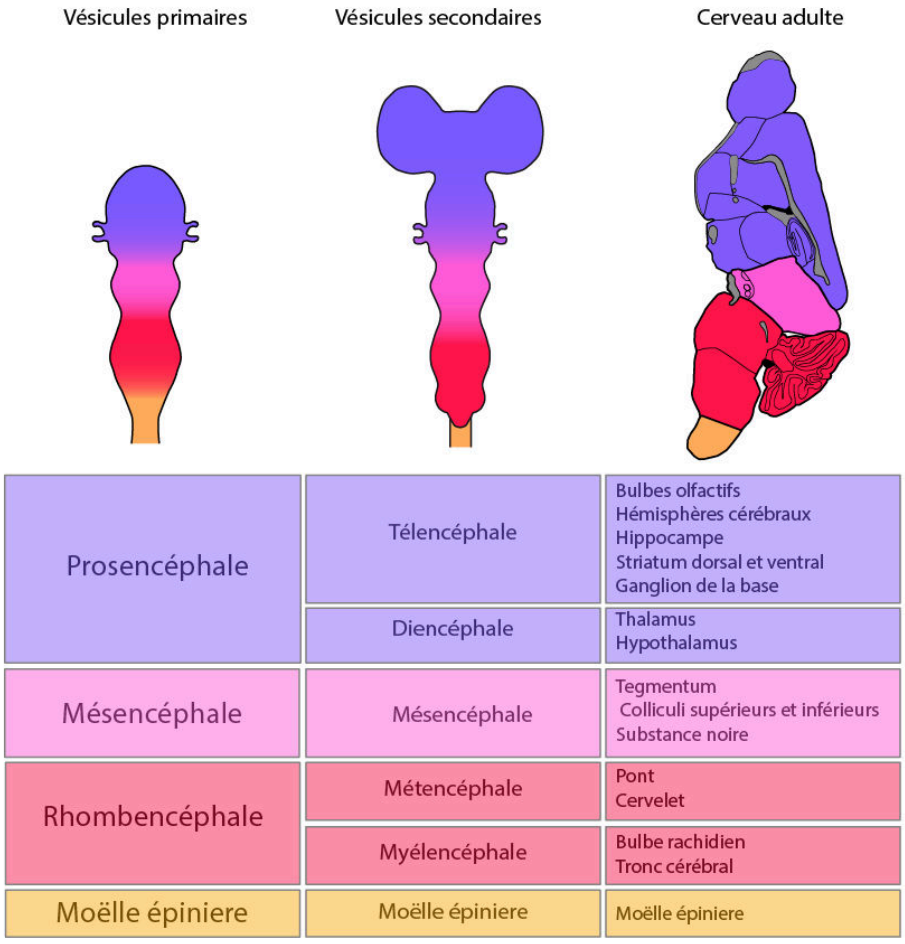



**Figure 2. Représentation schématique de l'origine et du développement des structures cérébrales chez la souris**

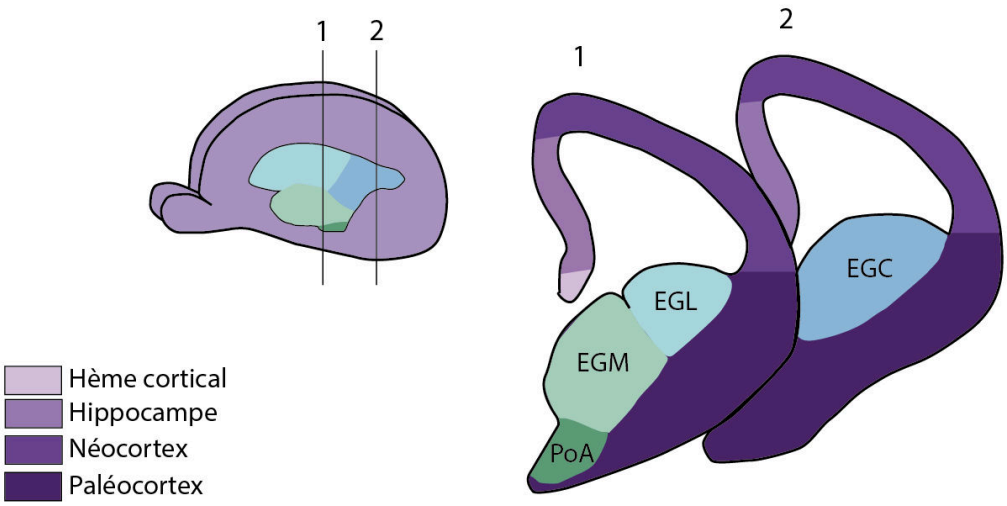



**Figure 3. Représentation schématique des subdivisions du télencéphale embryonnaire**
Le télencéphale se divise en régions fonctionnelles. L'hème cortical, l'hippocampe et le néocortex forment le télencéphale dorsal. Le paléocortex comprenant les éminences ganglionnaires médianes (EGM), latérales (EGL) et caudales (EGC) et l'air préoptique (PoA) constitue le télencéphale ventral.

L'hippocampe et l'ensemble du télencéphale ventral sont composés de trois couches de neurones seulement. La mise en place de ces structures et de ses couches repose sur un ensemble de mécanismes successifs de différenciation et de migration cellulaire décrits ci-après.

## 3.1. Neurogenèse et gliogenèse

### 3.1.1. Les cellules du télencéphale dorsal

#### 3.1.1.1. Des NEC aux RGC

Avant l'apparition du télencéphale, le tube neural est composé d'une monocouche de cellules neuroépithéliales (NEC pour « neuroepithelial cells »). Les NEC possèdent des caractéristiques mixtes de cellules épithéliales et de cellules souches, puisqu'elles sont jointives et polarisées mais également multipotentes avec la capacité de s'auto-renouveler. Leurs corps cellulaires se situent en proximité de la surface ventriculaire duquel elles émettent des prolongements cellulaires en direction de la surface apicale et basale du tube neural formant ainsi le neuroépithélium. De plus les NEC sont également à l'origine de l'ensemble des diverses cellules du système nerveux central. Entre le jour embryonnaire 8 et 10, les NEC s'engagent dans une série de divisions symétriques visant à multiplier le nombre de cellules souches neurales nécessaires à l'expansion latérale du cortex. Le nombre de NEC définissant directement le nombre de futurs neurones, ces premières divisions représentent une étape primordiale du développement du cortex. Une fois le pool de NEC établi, celles-ci entreprennent une première étape de différenciation en donnant naissance aux cellules de la glie radiaire (RGC pour « radial glial cells ») indispensables à la mise en place des futures couches corticales de neurones. Ces cellules gardent les caractéristiques principales des NEC, elles conservent alors leur capacité à proliférer ainsi que des prolongements cytoplasmiques leur permettant d'établir un contact essentiel entre le pôle apical (du coté ventriculaire) et le pôle basal du tube neural grâce à leurs jonctions adhérentes. Ces prolongements cellulaires serviront de matrice de migration aux neurones lors de la mise en place des couches neuronales. En revanche, RGC restreignent leur multipotence et s'engagent vers une voie de différenciation en donnant naissance aux neuroblastes.

La transition NEC – RGC est une étape critique dans le développement du cortex. Elle détermine en effet la capacité des cellules à se renouveler pour étendre le pool de progéniteurs ou à s'engager dans une voie de différenciation pour former les différentes couches corticales. En 1995, Pasko Rakic formulait l'hypothèse que l'expansion corticale observée au cours de l'évolution ne reposait que sur une régulation temporelle des modes de divisions des cellules progénitrices. Les NEC, en se renouvelant par division symétrique, augmentent la surface du cortex tandis que les RGC se divisent majoritairement de manière asymétrique pour donner les neurones, participant autant à l'expansion radiale que latérale du cortex (Rakic, 1995). En parallèle, Verne Caviness appuyait exactement la même hypothèse, ajoutant que cette régulation temporelle dépendait du contrôle du cycle cellulaire (Caviness et al., 1995). Sept ans plus tard, les travaux de Chenn et coll. sur l'implication de Wnt (Wingless Integration site) dans le développement du cortex supportent leurs hypothèses. Les protéines de la famille Wnt sont des protéines secrétées, régulatrices de la croissance et de la détermination cellulaire. Au niveau du système nerveux central, l'inactivation de ces protéines ou de la β-caténine, responsable de la transduction du signal intracellulaire de Wnt, abolit le développement embryonnaire précoce du métencéphale et de l'hippocampe. Au contraire, les souris transgéniques exprimant une forme constitutivement active de la β-caténine présentent une augmentation de la surface totale du cortex sans en affecter l'épaisseur, et donc le nombre de neurones différenciés. Ces résultats indiquent qu'une dérégulation précoce induit une population surnuméraire de NEC augmentant ainsi la surface latérale du cortex sans pour autant affecter l'organisation tardive de celui-ci (Chenn and Walsh, 2002). Cette supposée régulation temporelle du développement du cortex orientera les futurs travaux qui ont caractérisés une voie spécifique de la transition NEC-RGC.

Bien que cette transition soit encore mal comprise, l'activation du récepteur Notch et du récepteur au FGF (Fibroblast Growth Factor) qui déclenche des voies de signalisations partiellement communes à celles de Wnt, ont été impliquées (Figure 4).

Notch induit une cascade de signalisation qui était, jusqu'alors, associée à un maintien de la population des RGC, par l'inhibition de leur différenciation en neurones. Les travaux de Gaiano et coll. ont démontré que les mécanismes par lesquels Notch contrôle les RGC sont beaucoup plus complexes. Tout d'abord, l'expression ectopique de la forme constitutivement active de Notch au niveau du télencéphale murin est suffisante pour

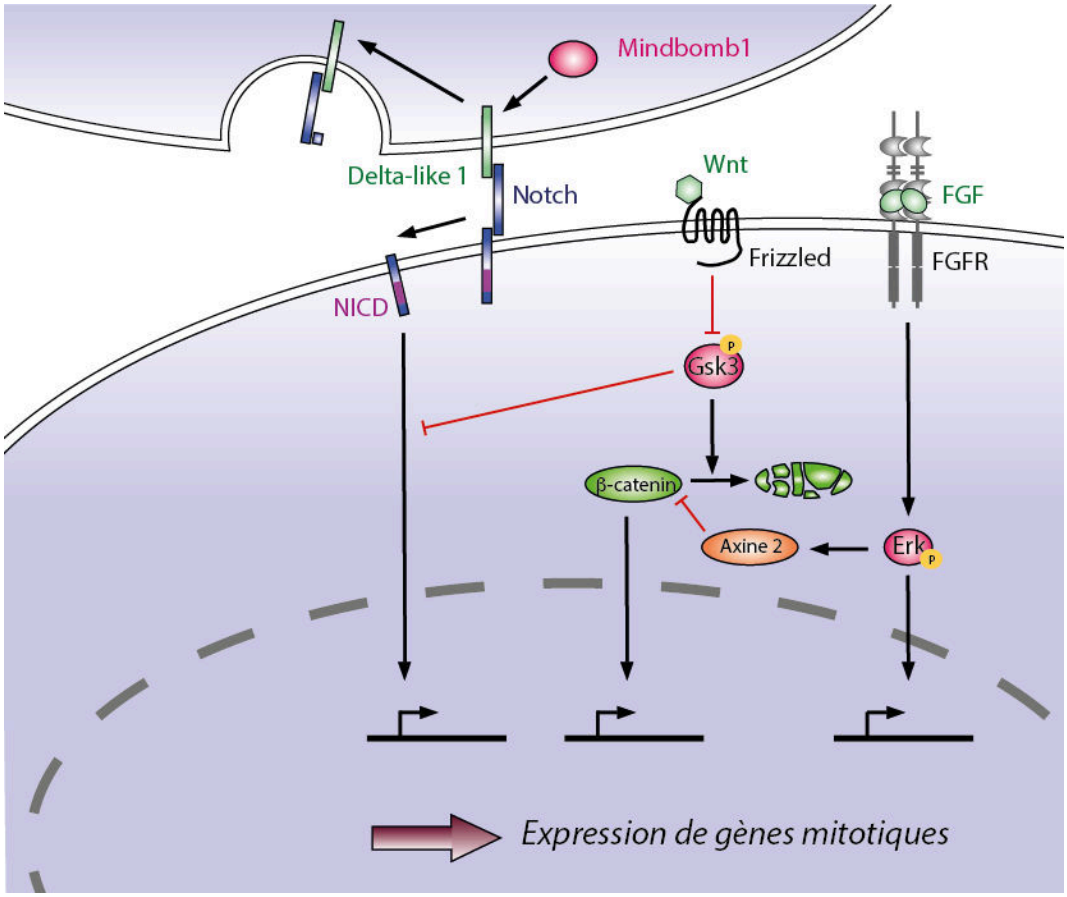



**Figure 4. Communication entre les voies de signalisation pro-mitotiques au sein du SNC**
Sous l'activation de leurs ligands respectifs (Delta-like 1, Wnt et FGF), les récepteurs Notch, Frizzled et le FGF récepteur induisent une cascade de signalisation conduisant à l'activation de gènes promouvant la prolifération cellulaire. Ces 3 voies s'autorégulent les unes les autres et permettent le maintient du pool de RGC tout au long de la neurogenèse.
A noter la particularité de Notch dont le ligand, exprimé à la surface de cellules adjacentes, doit être endocyté pour permettre l'activation de la voie de signalisation Notch.

induire la différenciation des NEC en RGC *in vivo* (Gaiano et al., 2000). L'utilisation de modèles *in vitro*, à partir de progéniteurs neuronaux (NEC ou RGC) ou de neurones en co-culture avec des astrocytes, a permis de décrire les mécanismes impliquant Notch dans cette transition. Ce dernier modèle implique la capacité de Notch à reformer des RGC à partir de cellules différenciées et appuie donc le rôle de Notch dans l'induction de la formation des RGC, et non pas seulement dans le maintient de celle-ci (les neurones et les astrocytes sont en effet les deux types de cellules directement formées par les RGC). Dans ce système de co-culture, il a été montré que la présence des neurones induisaient la transformation des astrocytes en cellules dotées de longs prolongements sur lesquels les neurones peuvent alors migrer, rassemblant ainsi les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des RGC. Ce phénomène de « dé-différenciation » est strictement dépendant de l'activation de Notch à la membrane des astrocytes, orchestrée par l'établissement de contacts directs entre les astrocytes et les neurones. Une fois Notch activé, la partie intracellulaire du récepteur est clivée et transloquée dans le noyaux afin d'induire l'expression de gènes pro-RGC tels que ErbB2 et BLBP (Patten et al., 2003)(Figure 4). Ces travaux appuient la démonstration selon laquelle l'activation de Notch est capable d'induire la formation des RGC. Par ailleurs, des travaux plus récents démontrent une nouvelle fois la fonction de Notch dans ce même processus, en étroite coopération avec le récepteur au FGF. Le rôle des FGF dans la mise en place du cortex est depuis longtemps admis. Parmi les différents récepteurs impliqués, le FGFR2 assure une fonction primordiale dans la transition NEC-RGC. L'utilisation d'une forme constitutivement active du FGFR2 dans des cultures de progéniteurs neuronaux provoque une augmentation du nombre de cellules présentant une morphologie typique des RGC. En parallèle, le traitement des progéniteurs par du FGF2 induit le même phénotype par l'activation d'une voie de signalisation dépendante de Notch lui même (Yoon et al., 2004). Enfin, ces études *in vitro* nécessitant l'expression ectopique de formes constitutivement actives sont corrélées avec l'observation *in vivo* du rôle du FGFR2 et de son ligand FGF10 dans l'établissement des RGC. Une réduction de la transition NEC-RCG est observée chez les souris knockout (ko) pour le FGF10 attestée par un déséquilibre dans le mode de division symétrique et asymétrique (voir partie 3.1.1.2 Des RGC aux neurones et astrocytes) résultant d'une réduction du nombre de RGC au profit du nombre de NEC. Ce retard de la transition NEC-RGC aboutit à une augmentation du nombre de NEC, sans affecter les étapes tardives de la neurogenèse,

conduisant naturellement à une augmentation de la taille du cortex (Sahara and O'Leary, 2009).

Comme nous allons le voir par la suite, certains de ces acteurs sont également impliqués dans la différenciation des RGC en neurones principalement puis en astrocytes.

#### 3.1.1.2. Des RGC aux neurones et astrocytes

Au cours du jour embryonnaire 10-11 (E10-E11), les RGC sont toutes alignées sur la surface ventriculaire et forment la zone ventriculaire (ZV). Elles vont s'engager dans une longue série de divisions asymétriques aboutissant à la formation de l'ensemble des cellules du télencéphale dorsal.

Le terme de division asymétrique est propre aux divisions des cellules progénitrices engagées dans un processus de différenciation cellulaire. Il désigne le fait que, sur les deux cellules filles générées au cours de la division, une va rester identique à la cellule mère en conservant les caractéristiques de cellule progénitrice tandis que la deuxième va s'engager dans la voie de différenciation. Ce mode de division va donc permettre de donner naissances aux cellules neuronales selon le processus appelé neurogenèse et ainsi former toutes les couches du cortex (Figure 5). Dans les premiers stades de la neurogenèse, la division asymétrique des RGC va donner naissance à une RGC et à un neuroblaste. Ce neuroblaste, en passe de devenir un neurone, perd toutes les caractéristiques communes des RGC. Dépourvu de prolongement cytoplasmique et non prolifératif, il va migrer le long de la glie radiaire pour former la sous-plaque (SP), soit la première couche du cortex en devenir où il terminera sa différenciation. Ces étapes de neurogenèse directe permettent la formation des couches les plus profondes du cortex (V et VI chez l'adulte). Les neurones des couches supérieures (II, III et IV chez l'adulte) sont formés par un processus de neurogenèse dite « indirecte ». Lors de leur division asymétrique, les RGC peuvent donner naissance, non pas à des neuroblastes, mais à des progéniteurs intermédiaires (IP). Ces IP partagent certaines caractéristiques des RGC telles que la capacité à proliférer mais ne possèdent plus de prolongements cytoplasmiques les liant aux deux pôles du cortex. Ces IP peuvent alors migrer sur la glie radiaire pour sortir de la ZV et créer une nouvelle zone de prolifération dans la zone sub-ventriculaire (ZSV).

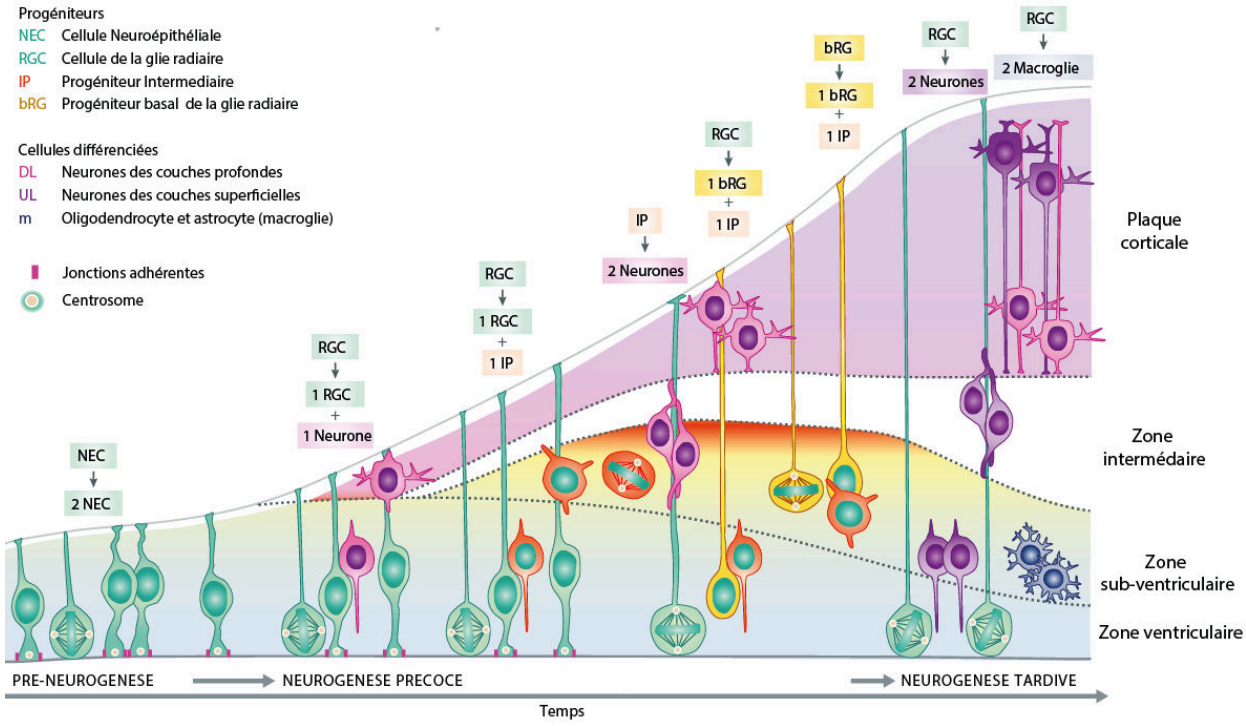



**Figure 5. Développement du télencéphale dorsal au cours de l'embryogenèse**
En amont de la neurogenèse, les NEC se multiplient par divisions symétriques puis se différencient en RGC. Les RGC vont démarrer la neurogenèse en donnant successivement naissance aux neuroblastes des couches profondes, aux IP et aux bRG par division asymétrique. Les RGC permettent également aux neuroblastes et IP de migrer dans la plaque corticale et la zone sub-ventriculaire, avant de disparaitre en donnant naissance aux astrocytes. Adapté de (Paridaen and Huttner, 2014) .

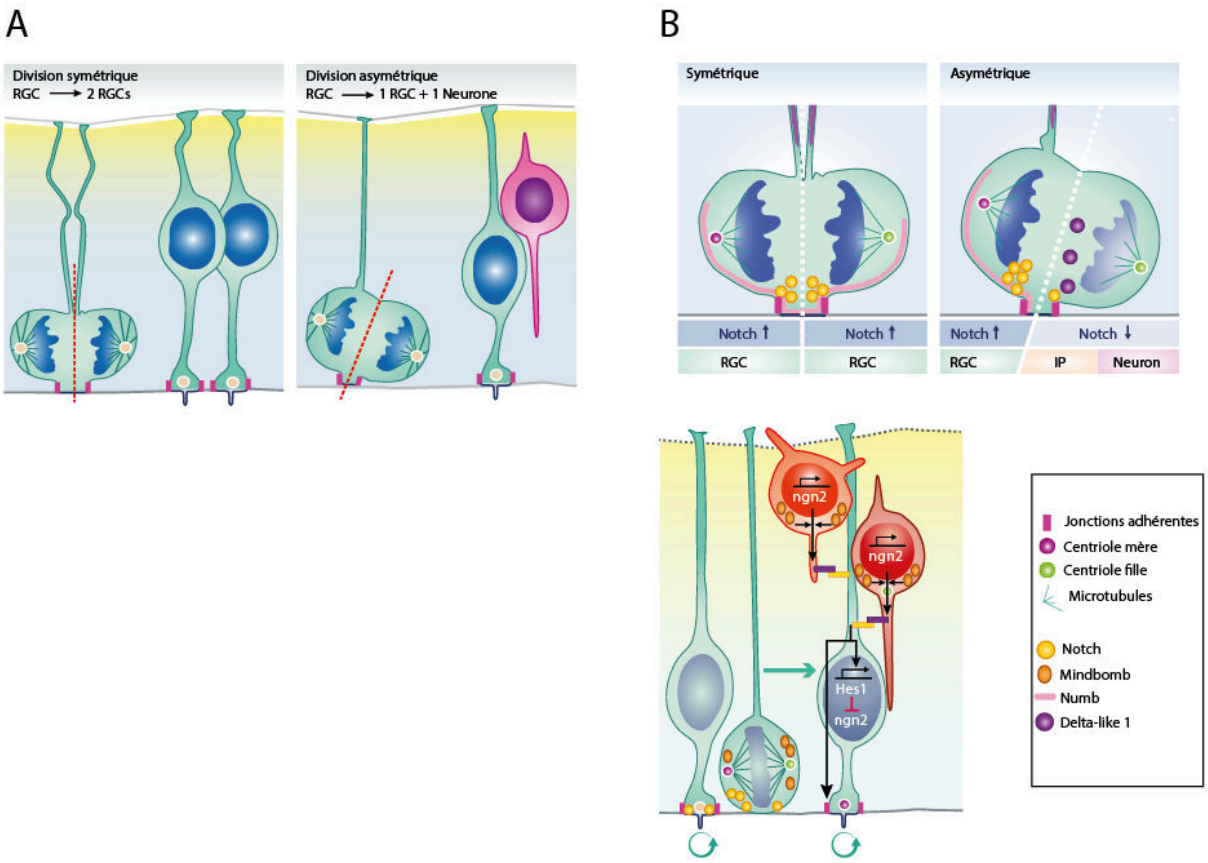



**Figure 6. Contrôle de la détermination cellulaire par le mode de division**

A) Orientation du fuseau mitotique lors de la division symétrique et asymétrique.

B) La répartition inégale des constituants cellulaires permet l'activation de la voie Notch. L'accumulation de Delta-like 1 dans une cellule provoque la répression des gènes mitotiques et une délamination par la perte des jonctions adhérente. Cette cellule se différencie (en neuroblaste ou IP) et interagit avec la deuxième cellule dans laquelle elle permet l'activation du récepteur Notch, et donc le maintien du potentiel mitotique de la RGC.

Adapté de (Paridaen and Huttner, 2014).

La majorité de ces IP vont donner deux neuroblastes par division symétrique afin de former ainsi la plaque corticale (PC). Il existe également une sous population d'IP (10 %) capable de doubler le nombre de neurones en se divisant une première fois pour donner naissance à deux IP qui, eux même se diviseront en neuroblastes (Noctor et al., 2004). Cette complexification de la formation du cortex, impliquant la neurogenèse indirecte n'apparaît que dans le règne des mammifères. Il a plus récemment été montré que d'autres types de progéniteurs intermédiaires, les progéniteurs basaux de la glie radiaire (bRG) jusqu'alors observés chez les primates supérieurs, peuplaient la ZSV des mammifères tels que les rongeurs (Shitamukai et al., 2011). Ces bRG dont la fonction spécifique est encore inconnue font débat dans la littérature. Il semblerait qu'ils remplissent un rôle similaire aux IP avec la particularité de posséder un prolongement basal uniquement, les rattachant à la surface du cortex. Ces progéniteurs se divisent asymétriquement pour donner naissance à un neuroblaste et à un IP (Betizeau et al., 2013). Cet IP peut ainsi donner deux neuroblastes.

A la fin de la neurogenèse, les IP comme les bRG effectuent une dernière division symétrique dite « de suicide » au cours de laquelle ils donnent naissance à deux neuroblastes identiques et donc disparaissent. Enfin, les RGC permettant la migration des neuroblastes dans les différentes couches du cortex appropriée, disparaissent ensuite après leur dernière division symétrique en donnant naissance aux astrocytes (Noctor et al., 2004; Paridaen and Huttner, 2014).

Les cellules du télencéphale dorsal à l'origine des neurones du cortex se divisent de manière symétrique et asymétrique sur une échelle de temps donnée. Le contrôle du mode de division de ces cellules et des RGC en particulier est donc primordial pour le développement correct du cortex. Les mécanismes responsables de la décision entre division asymétrique ou symétrique sont aujourd'hui largement étudiés dans différents modèles. L'orientation du fuseau mitotique et la ségrégation asymétrique des composants cellulaires sont tous deux responsable du type de division.

Chez la souris, il a été montré que les RGC gardent leur prolongement basal pendant la division conservant ainsi une orientation apico-basale. Au cours de la mitose, qui a lieu à la surface apicale, les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale avant d'être répartis à l'identique dans les deux cellules filles (Figure 6A). Les principaux acteurs de cette répartition sont les microtubules qui, naissant des centres organisateurs les centrosomes, vont former le fuseau mitotique. Au cours de la division symétrique,

l'alignement des chromosomes se fait de manière perpendiculaire à la paroi ventriculaire, on parle d'orientation verticale du fuseau mitotique (Figure 6). Cette orientation, contrôlée par l'association des microtubules à la membrane plasmique, a pour conséquence une répartition symétrique des composants cellulaires aboutissant à une division symétrique. Cette division symétrique est nécessaire au maintien du pool de NEC et de RGC, il a d'ailleurs été montré que la mutation du gène *lis1*, responsable de lissencéphalies humaines perturbe l'interaction entre les microtubules et la membrane plasmique aboutissant à une désorientation du fuseau mitotique (Pawlisz et al., 2008). Concernant la division asymétrique, l'orientation du fuseau mitotique est horizontale ou oblique (Figure 6A). L'importance de l'orientation du fuseau a surtout été décrite chez la drosophile et son implication semble beaucoup moins claire chez les mammifères. En revanche, au cours de la division asymétrique, le matériel cellulaire se répartit de manière non égale avant la division cellulaire (Paridaen and Huttner, 2014). Parmi les éléments déterminants, le récepteur Notch se répartit majoritairement dans la cellule fille redonnant une RGC. L'absence de Notch dans la deuxième cellule fille favorise l'expression de Delta-like 1 et Mindbomb, tous deux responsables de l'activation trans-cellulaire de Notch (Figure 4). Cette ségrégation permet d'induire l'activation de la voie Notch dans la RGC afin d'assurer le maintien de l'état prolifératif des RGC par l'expression de gènes pro-RGC et l'inhibition de gènes pro-neuraux et pro-astrocytaires (Figure 6B). De l'autre coté, cette ségrégation permet d'initier la délamination et la différenciation du neuroblaste qui réprime l'expression de Notch grâce à la présence de Delta-like 1(Figure 6B). L'activation de Notch résulte donc de la présence des cellules différenciées qui établissent des contacts cellulaires avec les RGC permettant l'interaction de Notch avec son ligand (Nelson et al., 2013a). Il a été montré que l'inhibition de l'expression de Delta-like 1 ou de son régulateur Mindbomb provoque une déplétion des RGC et une différenciation neuronale précoce démontrant ainsi la coopération indispensable des RGC et des neuroblastes / IP (Yoon et al., 2008).

L'implication de la voie Notch a principalement été décrite dans la neurogenèse directe précoce, même si de récents travaux montrent également l'expression de Delta-like 1 dans les IP, suggérant un rôle plus tardif (Nelson et al., 2013a). La voie Wnt, en revanche, semble spécifiquement impliquée dans le contrôle de la neurogenèse tardive. L'activation de la voie canonique de Wnt (Figure 4) au niveau du télencéphale provoque

une différenciation neuronale précoce des IP aboutissant à la réduction et à la désorganisation du néocortex (Munji et al., 2011).

Enfin, les dernières étapes de la neurogenèse consistent en la différenciation des RGC en astrocytes. Tout au long de la neurogènese, les RGC doivent être maintenues pour permettre la migration radiaire des neuroblastes. Une répression de l'expression des gènes pro-astrocytaires tels que le gène codant pour la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) est assurée par l'activation de Notch (Patten et al., 2003; Sardi et al., 2006). La migration des derniers neuroblastes signe l'arrêt de l'activation de la voie Notch, permettant ainsi la différenciation terminale des RGC en astrocytes.

### 3.1.2. Les cellules non originaires du télencéphale dorsal

La description du développement cortical ci-dessus décrit uniquement le devenir des cellules formées directement au sein du télencéphale dorsal comprenant les neurones corticaux dit « pyramidaux », de part la forme de leur corps cellulaire observé chez l'adulte, et des astrocytes. Cependant, de nombreuses cellules n'appartenant à aucune de ces deux classes, formées dans différentes régions, peuplent également le télencéphale dorsal.

#### 3.1.2.1. Les cellules de Cajal-Retzius

Les tous premiers neurones à coloniser le télencéphale dorsal, en amont de la mise en place des couches corticales, sont les cellules de Cajal-Retzius (CR). Ces neurones sont formés par division asymétrique des RGC dans différentes régions du cerveau : l'hème et l'anti-hème qui se trouvent de part et d'autre du télencéphale dorsal selon l'axe médio-latéral dans la région caudale et de l'ANR (Anterior Neural Ridge) dans la région rostrale (Bielle et al. 2005; García-Moreno, López-Mascaraque, and De Carlos 2007) (Figure 7). Au cours de la neurogenèse précoce, entre E10 et E11, les cellules CR vont migrer de manière radiale au sein des régions dont elles sont originaires afin d'atteindre le pôle basal du cortex. Rapidement, elles vont ensuite migrer de manière tangentielle au sein du télencéphale dorsal formant ainsi la pré-plaque (PP), qui deviendra la zone marginale (ZM) après l'arrivée des premiers neuroblastes, puis la couche I du futur cortex. Cette couche I, est la première formée mais également la plus

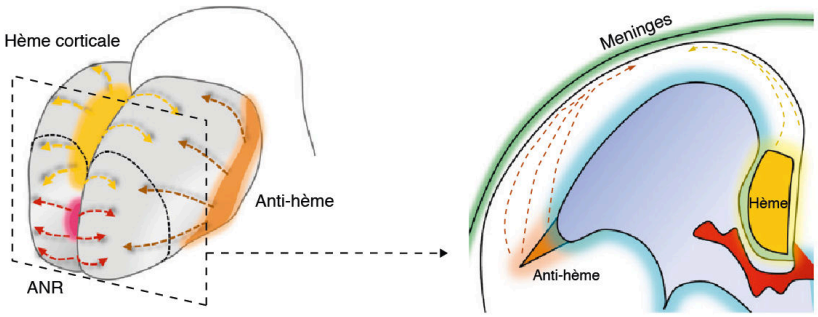



**Figure 7. Origine des cellules de Cajal-Retzius**
Les cellules sont produites dans trois zones distinctes externes au télencéphale dorsal qu'elles colonisent (flèches pointillées) avant le commencement de la neurogenèse pour former la couche I. Adapté de (Tiberi et al., 2012)

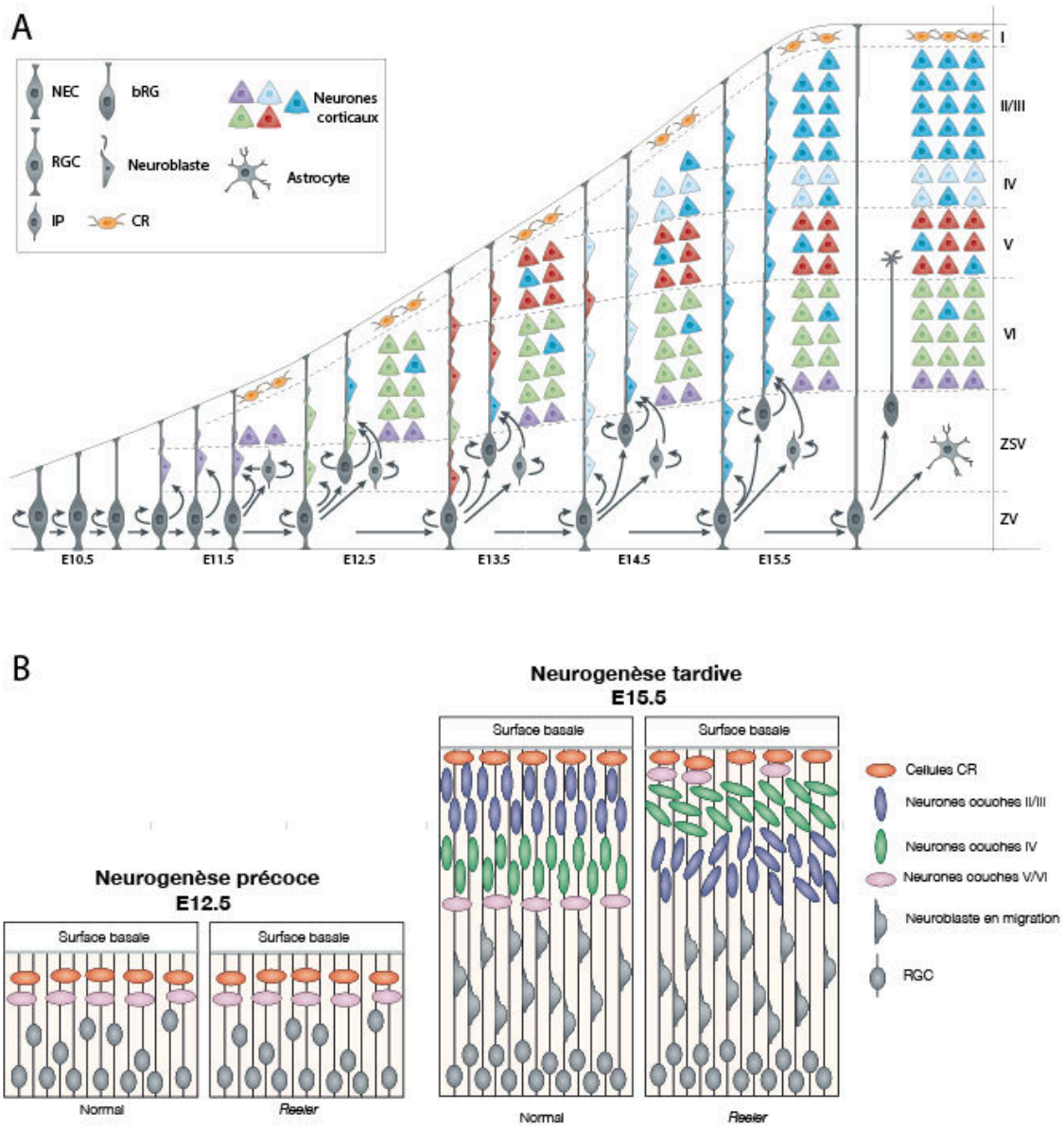



**Figure 8. Mise en place des couches corticales sous le contrôle des cellules de Cajal Retzius**
A) Mise en place des couches « inversée » caractéristique du télencéphale dorsal. Les premiers neurones formés (ici en violet) constituent la couche la plus profonde. Ils migrent sur les prolongements des RGC jusqu'à la couche I où les cellules CR inhibent leur migration par expression de la glycoprotéine Reelin. Les neuroblastes néoformés migrent à leur tour en les remplaçant dans les couches superficielles où ils sont également stoppés par la Reelin. Ainsi les neurones formés en dernier se retrouvent dans la couche la plus superficielle.
B) Exemple des défauts de migration observés chez la souris ko pour la Reelin (mutant « Reeler »). L'absence de la Reelin provoque un encombrement de la couche I empêchant les neuroblastes néoformés de passer au dessus des suivants et résulte d'une organisation où les premiers neurones formés se retrouvent dans les couches les plus superficielles. Adapté de (Greig et al., 2013).

superficielle du cortex (Garcia-Moreno et al., 2007). Il s'agit de la seule couche qui ne respecte pas l'organisation corticale caractéristique en couche « inversée ». Et pour cause, cette couche est elle-même responsable de cette organisation particulière. En effet, une fois en place, les cellules CR expriment à leur surface la glycoprotéine Reelin qui va orchestrer cette migration inversée des neuroblastes. Les premiers neuroblastes vont migrer jusqu'à la zone marginale et former la sous-plaque qui deviendra les couches VI et V chez l'adulte. Ils seront ensuite remplacés par l'arrivée des neuroblates de la future couche IV, eux même délogés par ceux de la couche III et II établissant la plaque corticale (PC). Ainsi, les derniers neurones formés se retrouvent dans les couches les plus superficielles du cortex, juste en dessous de la couche I (Figure 8). Le rôle de la Reelin serait d'inhiber la migration des neuroblastes quand ils arrivent à proximité de la ZM. Stoppés par l'action répulsive de la glycoprotéine, les cellules formant la sous-plaque se détachent des RGC et se différencient. Les neuroblastes allant former la plaque corticale migrent également sur les RGC et sont à leur tour stoppés en bordure de la ZM. L'absence de Reelin lève l'inhibition de la migration des premiers neuroblastes qui s'accumulent au niveau de la ZM. Cette accumulation provoque la formation d'une dense couche de cellules au travers de laquelle les neuroblastes de la PC ne peuvent plus passer et s'accumulent donc en dessous (Frotscher, 1998; Tissir and Goffinet, 2003) (Figure 8).

A la fin de la neurogenèse, les dernières RGC disparaissent aboutissant à la mort des cellules CR peu après la naissance, chez la souris. Une certaine proportion de cellules CR persiste après la naissance jusqu'à l'âge adulte où elles joueraient un rôle sur la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe, cependant la fonction exacte de ces cellules reste encore énigmatique.

#### 3.1.2.2. Les cellules du télencéphale ventral

Parmi les cellules colonisant le cortex en cours de développement, les neurones formés au sein des structures du télencéphale ventral telles que la EGM et la EGL atteignent le télencéphale dorsal par migration tangentielle.

Le télencéphale ventral est formé de quatre structures transitoires bien définies : l'aire antérieure préoptique (PoA) et les trois éminences ganglionnaires. L'éminence ganglionnaire latérale (EGL) et l'éminence ganglionnaire médiane (EGM) sont positionnées sur la partie antérieure du télencéphale, et l'éminence ganglionnaire

caudale (EGC) résulte de la fusion postérieure de la EGL et de la EGM. Il a été démontré que l'ensemble de ces structures, à l'exception de la EGL, est responsable de la formation des interneurones corticaux inhibiteurs au cours de la neurogenèse embryonnaire (Wonders and Anderson, 2006)(Figure 3 et 9). Bien que les mécanismes régulant la formation de ces neurones ne soit pas clairement établie, leur provenance a bien été caractérisée.

La EGM est la source principale d'interneurones, elle est responsable de la formation d'environ 60% des interneurones du cortex. Ces neurones provenant de la EGM expriment en grande partie la parvalbulmine et la somatostatine, deux marqueurs principaux des interneurones (Wonders and Anderson, 2006)(Figure 9). Une faible proportion des neurones provenant de la EGM expriment également la calrétinine et le neuropeptide Y (NPY), davantage caractéristiques des interneurones provenant de la EGC. Cette dernière est responsable de la formation de 30 à 40% des interneurones du cortex (Miyoshi et al., 2010). Les interneurones issus de la EGM vont principalement coloniser les couches profondes du cortex tandis que ceux issus de la EGC seront préférentiellement localisés dans les couches supérieures formant ainsi deux populations d'interneurones distincts chez l'adulte (Miyoshi and Fishell, 2011)(Figure 9).

L'aire antérieure préoptique (PoA), mise en évidence plus récemment, aboutit également à la production des interneurones corticaux exprimant le NPY, principalement localisés sur les couches supérieures du télencéphale dorsal (Figure 9).

La EGL, quant à elle, ne semble pas contribuer de façon majeure à la génération des interneurones du cortex, bien qu'une étude de 2001 ait montré que le cortex de rat contient des neurones inhibiteurs provenant de la EGL. Cette structure est impliquée dans la formation des neurones striataux et des bulbes olfactifs (Wonders and Anderson, 2006)(Figure 9).

La provenance différentielle des interneurones a permis de créer une diversité importante, témoignée par l'expression de gènes différents définissant ainsi plusieurs groupes d'interneurones aux caractéristiques morphologiques et chimiques variées. Cette diversité est importante pour la régulation fine de la transmission synaptique des neurones matures.

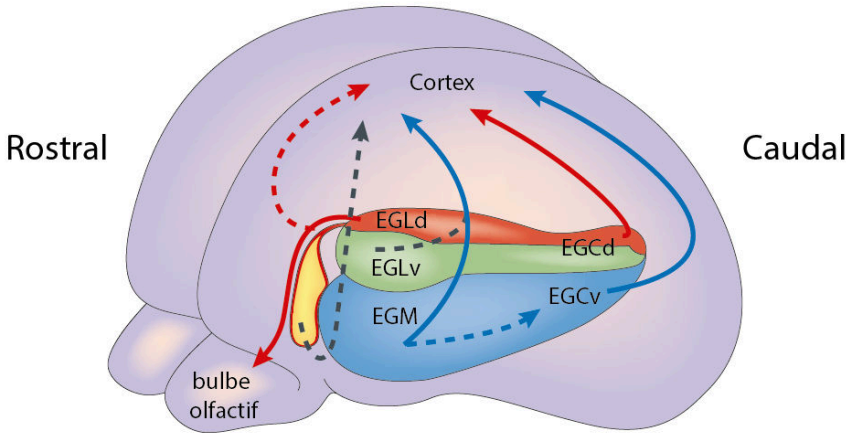



**Figure 9. Origine des interneurones corticaux**
Observation en coupe transversale des principales aires responsables de la production des interneurones et les régions qu'ils colonisent. L'éminence ganglionnaire latérale, responsable de la formation des neurones striataux et du bulbe olfactif, participe très peu à la production des neurones inhibiteurs corticaux. Les flèches de couleur représentent les sous population d'interneurones allant coloniser le télencéphale dorsal. La grande majorité étant produite par les éminences ganglionnaires caudale et médiane, avec une petite participation de l'air pré-optique (représentée en jaune). Adapté de (Wallingford et al., 2013; Wonders and Anderson, 2006)

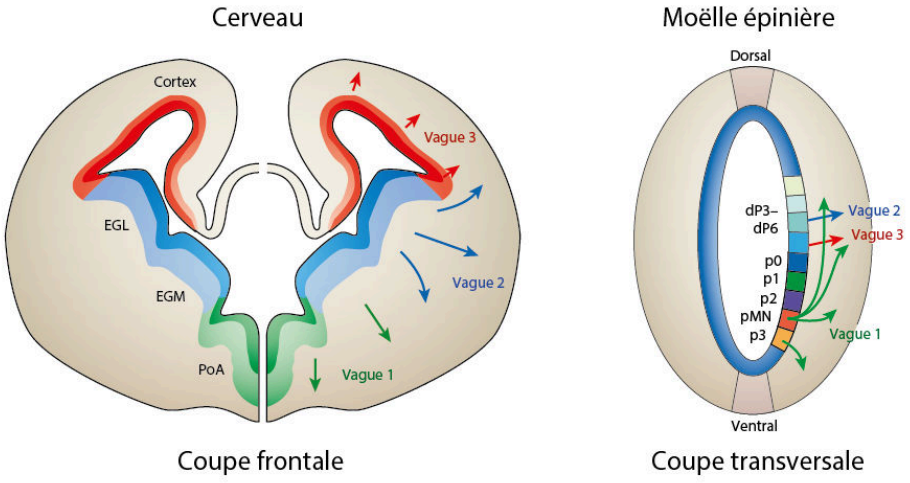



**Figure 10. Production spatio-temporelle des oligodendrocytes**
Les oligodendrocytes sont produits au cours et à la suite de la neurogenèse au niveau du télencéphale ventral et dorsal, ainsi que dans la moelle épinière. 3 vagues successives permettent la production des oligodendrocytes à E12,5 (vague 1), E15,5 (vague 2) et dans les jours suivant la naissance (vague 3). Adapté de (Rowitch and Kriegstein, 2010)

#### 3.1.2.3. Les oligodendrocytes et la microglie

Les oligodendrocytes font partie de la famille des cellules gliales, avec les astrocytes et la microglie. Ces cellules sont responsables de la myélinisation des axones matures permettant une augmentation de l'efficacité de la propagation du potentiel d'action (voir partie 5. Transmission synaptique).

Les 4 aires du télencéphale ventral décrites précédemment (EGM, EGL, EGC et PoA) sont impliquées dans la formation partielle des oligodendrocytes. Cependant, leur origine de ne se limite pas au télencéphale ventral puisqu'elles sont également produites dans la moelle épinière et le télencéphale dorsal à différents moments du développement. On parle de « vague de production » des oligodendrocytes. Trois vagues successives à E12,5 , E15,5 et après la naissance vont prendre place dans le télencéphale et la moelle épinière (Rowitch and Kriegstein, 2010)(Figure 10). Il a été montré que les deux premières séries d'oligodendrocytes disparaissaient environ 10 jours après la naissance et qu'elles étaient remplacées par la troisième, suggérant des fonctions distinctes entre les oligodendrocytes embryonnaires et post-nataux (Kessaris et al., 2006). Cependant, malgré une origine spatiale différente, les oligodendrocytes dérivent tous des RGC sous le contrôle du morphogène Sonic hedgehog (shh) (Rowitch and Kriegstein, 2010).

Enfin, de toutes les cellules appartenant au système nerveux central, seule la microglie n'est pas originaire du neuroepithélium. Les cellules d'origine hématopoïétique dérivent des macrophages produits dans le système immunitaire au niveau de la moelle osseuse. Les cellules envahissent le système nerveux central en amont de la neurogenèse, lorsque la barrière hémato-encéphalique n'est pas encore formée, et se positionne au niveau de l'hème cortical. Elles assurent un rôle prépondérant dans le développement du cortex en éliminant les cellules infectieuses ou ayant subies des phénomènes de mort cellulaire, pouvant avoir lieu au cours du développement embryonnaire. Elles ont, en effet, à l'image des macrophages, la capacité de migrer à travers le cortex afin de détecter les cellules défectueuses qu'elles peuvent phagocyter.

### 3.2. Migration

Suite à la division asymétrique des progéniteurs, les cellules en voie de différenciation doivent migrer, guidées par les facteurs extrinsèques, afin de prendre place au sein du cortex et de démarrer leur maturation. Trois types de migration existent :

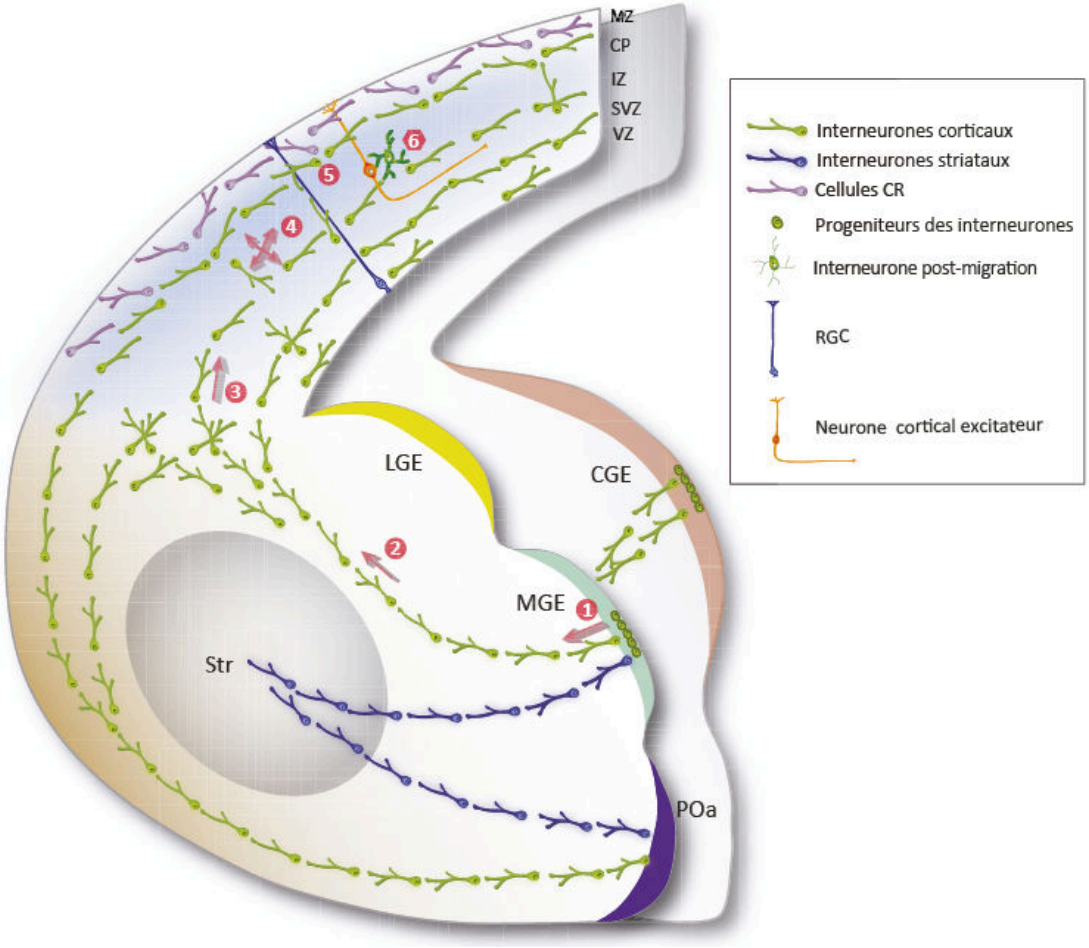



**Figure 11. Migration tangentielle puis radiaire des interneurones corticaux**
Les interneurones effectuent leur migration en plusieurs étapes (se référer au manuscrit pour la description des étapes). Adapté de (Guo and Anton, 2014).

La migration radiaire, la migration tangentielle et la migration axophilique. La migration axophilique, est le mécanisme par lequel se fait la migration tardive de certains neurones du SNC. Par exemple, les neurones sécrétant l'hormone gonadotrope migrent le long des axones des neurones olfactifs déjà différenciés comme guide pour atteindre l'hypothalamus. Ce manuscrit ne décrira que la migration radiaire et tangentielle utilisées par les neurones pyramidaux et les interneurones corticaux respectivement.

### 3.2.1. La migration tangentielle

La migration tangentielle est la première voie utilisée par les interneurones formés dans la EGM et la EGC (Figure 11-1) qui migrent selon des routes définies vers le cortex à partir E12,5. Au niveau de la EGL, les interneurones en migration contournent le striatum en développement en passant dorsalement ou ventralement autour de celui-ci (Figure 11-2). Cet effet est assuré par les neurones striataux via l'expression de la sémaphorine 3A. Cette protéine assure une répulsion des interneurones permettant de les diriger vers le télencéphale dorsal (voir partie 4.2.1 Guidage axonal) (Marin et al., 2001). Cette répulsion scinde les interneurones en deux populations distinctes qui arrivent dans le télencéphale dorsal en évitant la PC dans un premier temps et colonisant la ZM en surface et la ZSV en profondeur (Lavdas et al., 1999)(Figure 11-3,4). Une fois la migration tangentielle terminée, les interneurones adoptent une nouvelle morphologie leur permettant de démarrer une migration radiaire pour rejoindre leur destination finale au sein de la plaque corticale où ils se différencient (Figure 11-5,6).

### 3.2.2. La migration radiaire

Le deuxième type de migration est utilisé par les neurones formant les couches corticales II à VI du néocortex. Une fois formés, les neuroblastes présents initialement dans la VZ et la ZSV vont entreprendre une migration perpendiculaire au ventricule pour gagner les différentes couches du cortex. Pour ce faire, les neuroblastes développent une morphologie bipolaire leur permettant d'avancer en direction de leur cible vers la surface basale du cortex. Les premiers neuroblastes formés dans la ZV et la ZSV émettent un prolongement dit « antérieur » directement relié avec la surface basale du cortex et un prolongement dit « postérieur » encore attaché à la surface apicale ventriculaire. Cette morphologie permet au neuroblaste de migrer par translocation

somale (ou nucléaire) où l'intégralité du soma se déplace le long des prolongements établis par le neuroblaste lui même (Nadarajah et al., 2001). Lorsque le soma a atteint sa place dans le cortex, les processus antérieurs et postérieurs se détachent et le neuroblaste peut ainsi terminer sa différenciation en neurone dans la sous-plaque (SP). Ce mode de migration disparaît rapidement avec l'épaississement du mur cortical au profit de la migration assistée par les RGC. De manière similaire, les neuroblastes vont adopter une morphologie bipolaire polarisée. Cependant, comme le prolongement antérieur ne peut désormais plus interagir avec la surface basale du cortex, le neuroblaste se fixe au prolongement basal d'une RGC via certaines molécules d'adhésions. Guidé par la glie radiaire, le neuroblaste va ainsi pouvoir initier une migration de locomotion en direction de la surface basale du cortex (Nadarajah et al., 2001). Comme nous l'avons vu précédemment, la Reelin exprimée par les cellules CR assure le contrôle des étapes terminales de cette migration (Tissir and Goffinet, 2003). La N-cadhérine, une molécule d'adhésion homophilique, assure également une fonction primordiale dans cette migration radiaire. Il a été montré que des perturbations de l'internalisation et du recyclage des protéines transmembranaires impacte fortement la migration radiaire *in vivo* (Kawauchi et al., 2010). Le cycle internalisation-recyclage de la N-cadhérine permet une avancée du neuroblaste régulée par le cytosquelette d'actine et les microtubules. L'arrivée à la ZM entraine le détachement du neuroblaste où il entame sa différenciation en neurone.

## 4. Organisation en réseaux fonctionnels

Au terme des étapes de neurogenèse et de migration neuronale, la différenciation des cellules spécialisées prend place. Comme mentionné précédemment, les neuroblastes ont perdu toute propriété proliférative et donnent des neurones incapables de se diviser. Après la naissance chez la souris, seule la différenciation morphologique du neurone est donc responsable de l'expansion générale du cortex.

Afin de mettre en place un réseau fonctionnel efficace, les neurones vont alors se différencier en développant des prolongements membranaires spécifiques appelés neurites, responsables de l'établissement des contacts neuronaux. Ces neurites vont ensuite se différencier fonctionnellement en dendrites ou axones dont l'interaction permettra le passage d'une information nerveuse dans un sens donné. Les axones vont

être responsables de l'émission de l'information tandis que les dendrites sont responsables de la réception uniquement au point de contact axo-dendritique, aussi appelé synapse.
Chacune de ces étapes est primordiale à la mise en place d'un réseau de communication ordonné nécessaire au bon fonctionnement du SNC.
Ce chapitre s'attache à décrire les mécanismes régulateurs de la mise en place de cette communication neuronale et traitera à la fois de la différenciation neuronale, de la croissance et du guidage axonal et de la transmission synaptique.

## 4.1. Différenciation des neurones

Suite à leur détachement de la glie radiaire, les neuroblastes commencent à émettre de nombreux prolongements membranaires à partir du corps cellulaire leur donnant ainsi un aspect multipolaire.
Cette morphologie caractéristique des neurones a été décrite pour la première fois en 1888 par Ramon y Cajal dont les observations ont permis de mettre en évidence la présence de neurones isolés extrêmement polarisés et dotés de nombreux processus membranaires ramifiés. Depuis cette description, les mécanismes contrôlant cette différenciation ont été largement étudiés. Des études, pour la plupart, faites *in vitro* ont mis en évidence 3 étapes majeures dans le développement des prolongements membranaires appelés « neurite » : l'initiation, l'élongation et la différenciation (Figure 12).

### 4.1.1. Initiation et élongation

#### 4.1.1.1. Rôle majeur du cytosquelette d'actine

Après leur détachement de la glie radiaire, les neurones vont initier le développement des neurites primaires, issus du corps cellulaire. Parmi les différents acteurs moléculaires de cette initiation, les protéines du cytosquelette jouent un rôle prépondérant (Dehmelt and Halpain, 2004). L'initiation d'un neurite est d'ailleurs caractérisée par une accumulation d'actine filamenteuse (F-actine) et de faisceaux de microtubules au niveau du point de départ du futur neurite (Figure 13A). Dans un premier temps, l'apparition de filopodes est causée par la réorganisation de l'actine. L'ensemble des données de la littérature s'accorde cependant sur le rôle essentiel des

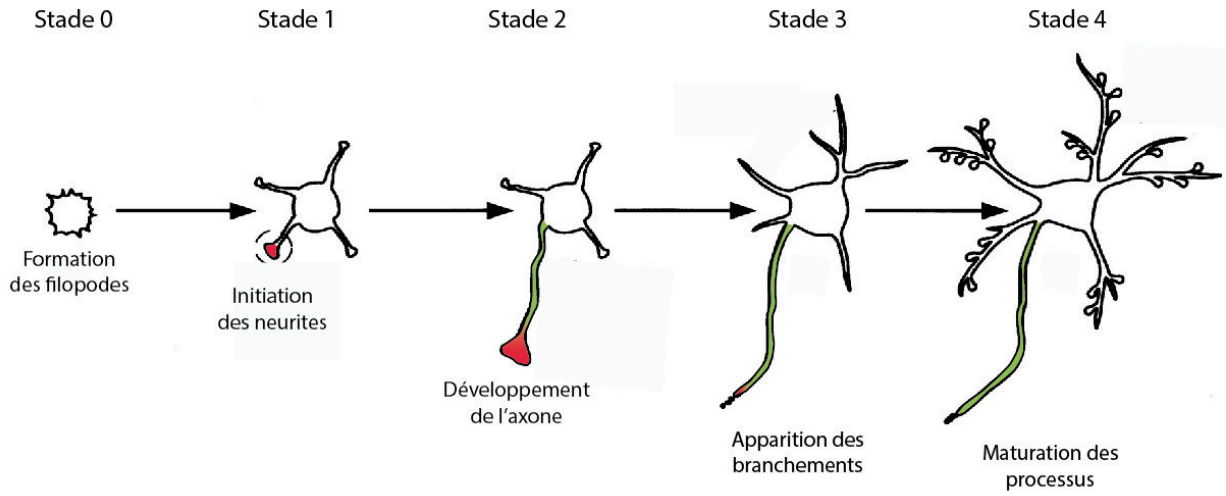



**Figure 12. Différenciation de neurones en culture**
Stades de développement identifiés *in vitro* allant de l'étalement du neurone (Stade 0) à l'apparition des épines dendrites sur les neurones matures (Stade 4). Les stades 1, 2 et 3 sont bien caractérisés par l'extension des neurites sous la dépendance du cône de croissance (1), l'apparition de l'axone (2) et le développement de branchements dendritiques et axonaux (3). Le cône de croissance et l'axone sont représentés en rouge et vert respectivement.

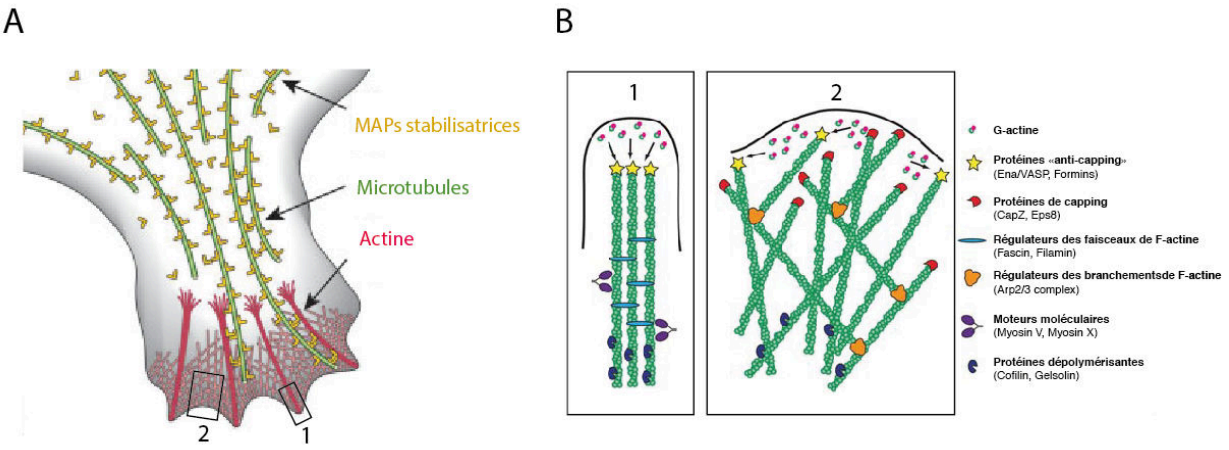



**Figure 13. Organisation moléculaire du cytosquelette au sein du cône de croissance**
A) Représentation schématique du cytosquelette au niveau du cône de croissance. Les microtubules sont stabilisés par la présence MAP (microtubule associated proteins) régulatrices. Elles permettent la stabilisation des microtubule et leur interaction avec le cytosquelette d'actine à l'extrémité du cône.
B) Organisation moléculaire de l'actine dans les filopodes (1) et les lamellipodes (2) du cône de croissance. Dans les filopodes la F-actine est organisée en faisceaux par la fascine et la filamine. Dans les lamellipodes, la F-actine est majoritairement branchée pour étendre la surface du cône. Ces branchements sont régulés par le complexe Arp2/3. Dans les deux cas, la polymérisation de la F-actine est favorisée par la présence du complexe Ena/VASP aux extrémités + prévenant l'association des protéines coiffe. De plus, la Cofiline et la Gelosine reforment des monomères de G-actine afin d'augmenter la vitesse de polymérisation. Adapté de (Dent et al., 2011).

protéines régulatrices de l'actine sur l'organisation et la dynamique des filopodes (Figure 13). Certaines ont plus spécifiquement été impliquées dans l'initiation lui même du filopode telles que les complexes Arp2/3 et Ena/VASP (Enable/vasodilator-stimulated phosphoprotein). Arp2/3 permet de nucléer des nouveaux filaments de F-actine à partir de filaments pré-existant formant un réseau de F-actine branchée (Figure 13B). Ena/VASP est un complexe de 3 protéines « anti-capping » favorisant la polymérisation de l'actine en bloquant l'interaction des protéines de « capping » aux extrémités de la F-actine (Figure 13B). L'initiation du filopode passe par un renflement de la membrane plasmique formé par un enrichissement de F-actine branchée marquée par la présence du complexe Arp2/3. Ce complexe est rapidement remplacé par le complexe Ena/VASP et la Fascine qui vont respectivement augmenter la polymérisation de la F-actine et former des faisceaux caractéristiques du filopode (Svitkina et al., 2003). Les travaux sur la souris invalidée pour Ena/VASP démontrent l'importance de ce complexe dans le développement des neurites *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'absence de Ena/VASP provoque un blocage du développement des axones des neurones issus du cortex ainsi qu'une réduction drastique de l'initiation des neurites causée par une incapacité des neurones en culture à former des filopodes (Kwiatkowski et al., 2007).
Enfin, l'extension des microtubules dans les filopodes riches en actine est une étape fondamentale dans la formation des neurites. Cette extension est notamment rendue possible grâce à certaines protéines assurant un « crosslink » entre l'actine et les microtubules telle MAP2c (Microtubule-associated-protein 2c) (Figure 13A). MAP2c permet l'alignement de microtubules sur les filaments d'actine présents dans les filopodes assurant ainsi une continuité entre les deux cytosquelettes. De ce fait, les microtubules peuvent envahir le filopode et, stabilisé par MAP2c, s'organiser sous forme de faisceaux afin de développer les neurites (Dehmelt et al., 2003).

#### 4.1.1.2. Le cône de croissance : Elément essentiel de la pousse neuritique

Au cours de l'élongation, le cône de croissance prend forme à l'extrémité de chaque neurite. Cette structure, dont la morphologie, la dynamique et l'adhésion sont intégralement contrôlées par les protéines du cytosquelette est absolument nécessaire à l'élongation et à la différenciation du neurite (Figure 13).

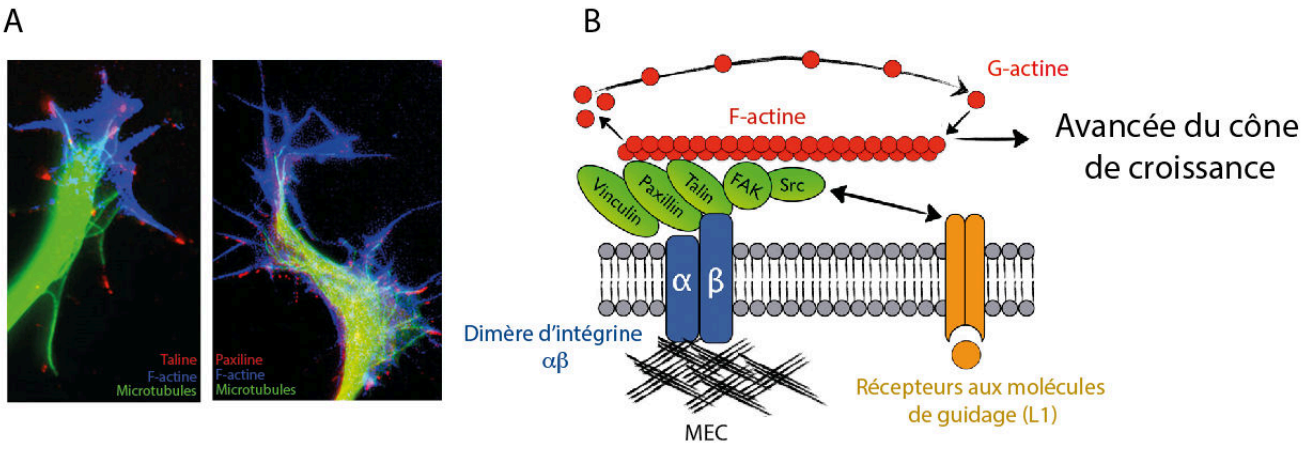



**Figure 14. Organisation des récepteurs membranaires au cône de croissance**

A) Cône de croissance montrant la présence des protéines de capture liant la F-actine à la membrane.

B) Organisation moléculaire du cône de croissance. Les intégrines et les molécules d'adhésion sont directement associées à l'environnement extracellulaire et permettent l'adhésion du cône de croissance. Elles lient également des protéines cytoplasmiques séquestrant la F-actine, favorisant ainsi sa polymérisation (Paxiline, Vinculine, FAK et Src). Adapté de (Gomez and Letourneau, 2014).

En plus des composants du cytosquelette, le cône de croissance est également enrichi en protéines transmembranaires permettant une interaction avec la matrice extracellulaire (MEC) (Figure 14). Certaines protéines de liaison à la F-actine telles que la Vinculine, la Taline, et l'α-actinine assurent une connexion entre la F-actine la membrane plasmique via les intégrines (Gomez and Letourneau, 2014). Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires capables d'interagir directement avec la laminine via leur domaine extracellulaire et les protéines de liaison à l'actine via leur domaine cytoplasmique (Figure 14). Toujours organisées en dimères, elles permettent une régulation de l'adhésion cellulaire (Kreiner et al., 2008). Au niveau neuronal, plusieurs évidences montrent que l'expression en surface de dimère contenant au moins l'intégrine-β1 régule directement la pousse neuritique (Rehberg et al., 2014; Tomaselli et al., 1993). Par ailleurs, l'activation des intégrines, permettant leur interaction avec le cytosquelette d'actine, nécessite leur rassemblement membranaire ou « clustering » (Gupton and Gertler, 2010; Ivins et al., 2000). Le « clustering » des intégrines, dont les mécanismes restent obscurs, pourrait être contrôlé par les microdomaines membranaires. Ces microdomaines, ou radeaux lipidiques correspondent à des régions de la membrane plasmique souvent enrichies en cholestérol et gangliosides. Ils ont la particularité de concentrer différents complexes protéiques nécessaires à l'établissement des neurites en modulant la dynamique de l'actine (Chen et al., 2003). Parmi les différents gangliosides assurant une fonction dans le développement neuronal, GM1 (Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα3)Galβ4GlcCer) a été particulièrement impliquée dans la pousse neuritique. Sous l'influence directe de la laminine, GM1 induit la formation de complexes protéiques contenant les intégrines (Ichikawa et al., 2009). Toute modification de GM1 (surexpression ou répression) entraine un déficit de la pousse neuritique causé par une perturbation de la cascade de signalisation des intégrines (Ichikawa et al., 2009; Nishio et al., 2004).

L'ensemble de ces données nous indique que la modification de la membrane plasmique joue également un rôle déterminant dans le contrôle de la pousse neuritique. Par ailleurs, le renouvellement des protéines de la surface par les processus d'endocytose-recyclage est essentiel à l'avancement du cône de croissance (Bonanomi et al., 2008; Rehberg et al., 2014). Plusieurs études initiées chez la drosophile ont ainsi démontré que l'inhibition de l'expression du couple dynamine 1/ Amphiphysine 1, toutes deux

impliquées dans l'endocytose, réduisait la croissance neuritique (Kim and Wu, 1987) (Torre et al., 1994) (Mundigl et al., 1998).

### 4.1.2. Différenciation et croissance axonale

#### 4.1.2.1. Importance de la membrane plasmique

Une fois les neurites primaires formés, les neurones vont se polariser en donnant naissance à un neurite particulier : l'axone. Par opposition, tous les autres neurites seront ensuite appelés « dendrites ». Suite à cette différenciation, ces deux types de processus développent des caractéristiques différentes. L'axone est composé de microtubules dits « stabilisés » lui allouant une vitesse de pousse importante nécessaire pour atteindre les neurones cibles au sein du cerveau. Les dendrites, dont la vitesse de pousse est 5 à 10 fois inférieure, développent davantage de filopodes dynamiques et instables permettant de sonder l'environnement extracellulaire. La polarisation de l'axone est en partie contrôlée par des modifications de la membrane de l'axone et du cône de croissance. Plus précisément, l'arrivée de vésicules d'origine golgienne ou endosomale permet un apport de membrane nécessaire à la croissance de l'axone. Ces vésicules, transportées par les microtubules le long de l'axone, fusionnent avec la membrane plasmique au niveau du cône de croissance par un mécanisme dépendant des protéines VAMP (Vesicle-associated membrane protein) de la famille SNARE (détail sur le fonctionnement de la machinerie dans la partie 4.3.1.1 Relargage des NT) (Martinez-Arca et al., 2000; Villarroel-Campos et al., 2014). En plus d'apporter de la membrane plasmique, ces vésicules variées apportent également divers cargos favorisant la polarisation neuronale tels que la protéine L1 (ou NgCAM). L1 est une protéine transmembranaire impliquée dans la croissance axonale par le remodelage de la F-actine au niveau du cône de croissance (Burden-Gulley et al., 1997). Il a été montré que cette protéine, initialement présente sur toute la surface neuronale est sélectivement concentrée dans l'axone au cours de la maturation des neurones par un processus dépendant de l'endocytose de L1 et de son transport antérograde endosomal guidé par les microtubules jusqu'au cône de croissance de l'axone (Wisco et al., 2003; Yap et al., 2008).

#### 4.1.2.2. Rôle des molécules extracellulaires

La différenciation de l'axone est également contrôlée par les molécules extracellulaires telles que le NGF (Neural Growth Factor) et le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) et leurs récepteurs TrkA et TrkB (Hengst et al., 2009; Shelly et al., 2007). Ces deux récepteurs sont responsables de l'activation de voies de signalisations contraires activant différentes protéines associées aux microtubules (MAP pour « Microtubule associated protein ») (Conde and Caceres, 2009; Polleux and Snider, 2010; Sakakibara and Hatanaka, 2015).

Le BDNF va augmenter la dynamique des microtubules en déstabilisant l'interaction de Tau et Doublecortine avec les microtubules, deux MAP responsables de leur stabilisation (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007). Cette première étape de déstabilisation des microtubules permet une réorganisation spécifique nécessaire au transport vésiculaire antérograde et rétrograde (Reed et al., 2006). Le NGF va induire, à l'inverse, une stabilisation des microtubules responsable de la croissance de l'axone (Zhou et al., 2004). La stabilisation des microtubules favorise le transport vésiculaire antérograde mentionné précédemment, nécessaire à la croissance axonale (Garvalov et al., 2007; Toriyama et al., 2012).

Par la suite, les dendrites et l'axone vont développer des branchements, ce processus consiste en la formation d'un nouveau processus sur un prolongement cellulaire préexistant. Ce phénomène, permet la complexification de la circuiterie neuronale dont le nombre d'interaction par neurone peut atteindre plusieurs milliers. Les branchements proximaux (proches du soma) sont initiés par la division du cône de croissance en deux cônes indépendants partageant le même neurite. Cette division, provoquée par une réduction de la mobilité dans la partie distale du cone au profit de la partie proximale qui développe de nombreuses protrusions, aboutit à la formation d'un nouveau neurite (Letourneau et al., 1986). Ce mécanisme est étroitement corrélé aux molécules extracellulaires inhibitrices (Oakley and Tosney, 1993). Il existe également un autre mécanisme dit « par défaut » responsable des ramifications distales (éloignées du soma) particulièrement impliqué dans les branchements dendritiques. Les neurones matures émettent, en effet, de nombreux filopodes nécessaires à la formation de contact neuronaux (voir partie 4.2 Contact neuronaux) longs de plusieurs micromètres. En cas d'absence de cible dans ce périmètre, la présence de filopode va alors induire la déformation de la membrane plasmique, la dynamique du cytosquelette d'actine et enfin l'attraction des microtubules donnant ainsi naissance à un nouveau neurite. Ce

mécanisme peut également être contrôlé par les facteurs extracellulaires tels que le NGF (Gallo and Letourneau, 1998).

Enfin, les dendrites et axones matures vont terminer leur croissance à la recherche de cibles afin d'établir des contacts indispensables à la communication neuronale sur laquelle repose tout le fonctionnement du système nerveux.

## 4.2. Contacts neuronaux

Au cours de leur croissance et de leur maturation, les neurones vont établir des contacts cellules-cellules via leur axone et leurs dendrites formant un réseau organisé chez l'adulte à l'origine de la communication neuronale. Cette architecture complexe du SNC est à l'origine des premières observations de Camillo Golgi imaginant que le cerveau était composé d'un unique et même réseau de fibre. Santiago Ramon y Cajal, par la même technique que Golgi, démontra quelques années plus tard que le cerveau était composé d'entités individuelles interconnectées par leurs nombreuses ramifications (Figure 15). De cette théorie émerge le concept de synapse comme lieu privilégié de la communication neuronale. Les avancées technologiques du XXème siècle ont permis de démontrer fermement l'existence de point de contact entre l'axone du neurone émettant l'information et de la dendrite du neurone recevant l'information.
Afin de permettre cette communication neuronale, les neurones doivent, en premier lieu, trouver leur cible via l'extension de l'axone, parfois sur de longue distance au sein du système nerveux en développement et enfin établir le dit contact synaptique.

### 4.2.1. Guidage axonal

*In vivo*, l'axone est guidé tout au long de sa croissance en direction de cellules cibles spécifiques afin de mettre en place un réseau neuronal organisé. A titre d'exemple, les neurones corticaux émettent des projections vers différentes structures cérébrales établissant des contacts cortico-corticaux, cortico-striataux, cortico-thalamiques, ou encore cortico-pontiques. La formation de ces contacts est assurée par une orientation efficace de l'axone vers ces cibles et repose sur la présence de molécules de guidage extracellulaires et sur la capacité de l'axone à y répondre. Le guidage de l'axone implique principalement les mêmes acteurs que pour l'initiation et la croissance de l'axone c'est-à-dire la dynamique du cytosquelette et de la membrane plasmique au sein du cône de croissance. Au cours des 50 dernières années, de nombreuses molécules de guidage axonal ont été découvertes (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011). Pourtant, aujourd'hui encore, leur fonction précise et les voies de signalisations déclenchées ne sont pas toutes clairement établies.

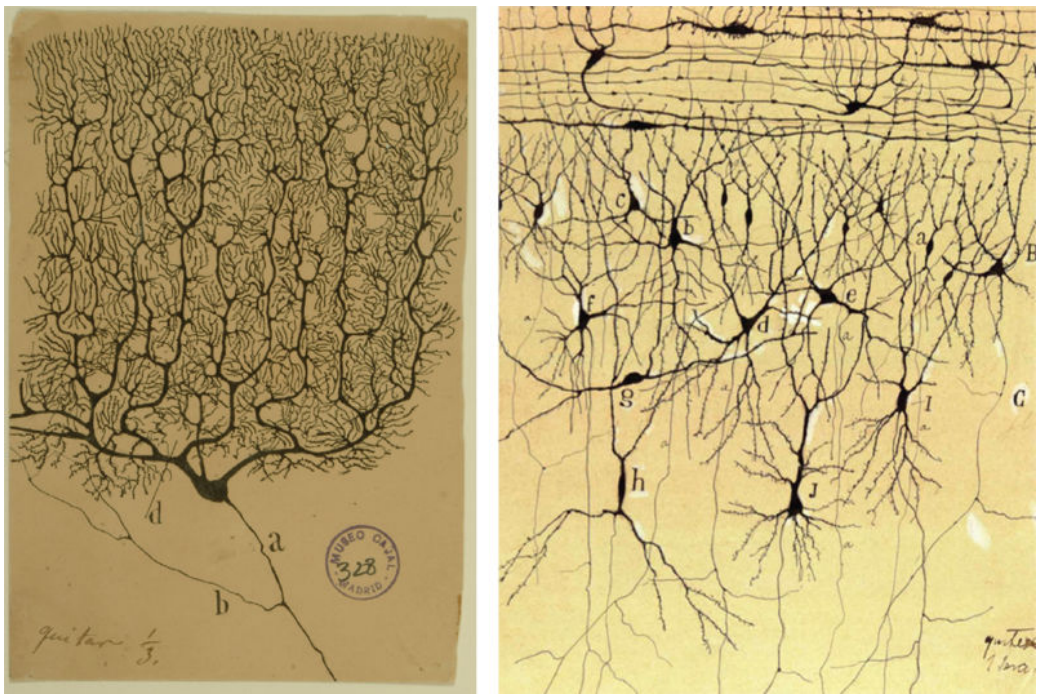



**Figure 15. La théorie neuronale par Santiago Ramon y Cajal.**
Dessin provenant de l'article original publié en 1888, dans lequel Cajal postula pour la première fois que les cellules du système nerveux sont des entités indépendantes. Cervelet de poussin.

Nous savons que ces molécules peuvent être sécrétées par les neurones cibles et exercer ainsi une action attractive ou répulsive à distance, ou bien associées à la membrane de la cellule cible assurant ainsi un guidage de proximité (Figure 16). L'action des molécules de guidage cible principalement la régulation de l'adhésion du cône de croissance. Par exemple, Netrin-1 et Semaphorine3A (Sema3A) induisent toutes les deux l'activation de voies de signalisations activant certaines kinases tels que FAK (Focal Adhesion Kinase) et Src. Ces deux kinases régulent l'assemblage et le désassemblage des points d'adhésion focaux, formés de complexes protéiques comprenant les intégrines, les protéines de capture et la F-actine assurant l'adhésion du cône de croissance à la MEC. Le contrôle du recyclage des points d'adhésion focaux permet au cône de croissance de répondre positivement (maintien des adhésions focales) ou négativement (retrait des adhésions focales) aux molécules attractives (Netrin-1) ou répulsives (Sema3A) respectivement (Bechara et al., 2008; Li et al., 2004). Ce recyclage est assuré par l'endocytose de récepteurs membranaires tels que les intégrines. De plus, l'endocytose des récepteurs membranaires contrôle également la réponse aux molécules de guidage répulsives. Par exemple, l'application de Sema3A sur des neurones en culture induit l'endocytose de ses co-récepteurs Neuropiline 1 et L1 aboutissant à une désensibilisation asymétrique du cône de croissance (Castellani et al., 2004). Nrp1/L1, pouvant également assurer une fonction attractive, doivent être retirés de la surface du cône soumis à la sema3A afin de ne pas induire de signalisation contradictoire. Il a été montré par ailleurs que la présence extracellulaire des ligands attractifs (tels que L1 lui même) ou le retrait de la Sema3A permettait l'expression en surface de ces co-récepteurs, par blocage de l'endocytose ou recyclage rapide à la membrane plasmique (Castellani et al., 2004; Piper et al., 2005). Enfin, l'importance de la macropinocytose, une forme d'endocytose permettant un retrait important de membrane plasmique, dans la répulsion du cône de croissance a également été mise en évidence. Cette mobilisation rapide et efficace de la membrane plasmique favorise les mouvements répulsifs du cône de croissance. Ce retrait de membrane s'accompagne d'une dépolymérisation massive de la F-actine, également responsable de la rétraction du cône (Kabayama et al., 2009). A l'inverse, certaines molécules attractives favorisent l'avancée du cône de croissance (Lucas et al., 1998; Shekarabi et al., 2005)(Figure 16). Toutes ensembles, ces molécules permettent un adressage des axones coordonné et programmé au sein du système nerveux

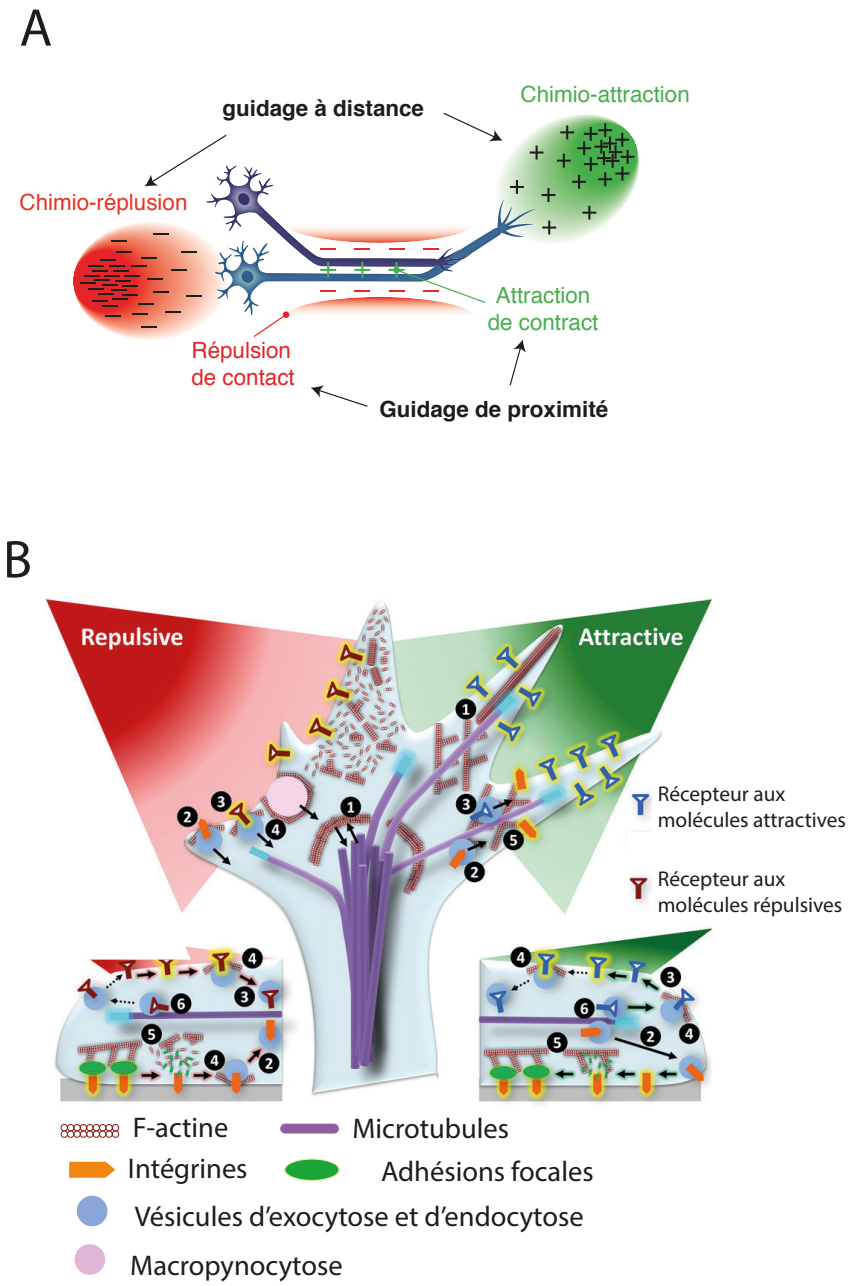



**Figure 16. Le cône de croissance au cœur du guidage axonal**
A) Modes d'action des molécules de guidage qui peuvent établir des répulsions et des attractions de contact ou sur de longues distances (chimio –répulsion ou –attraction)
B) Processus moléculaires mis en place au sein du cône de croissance en réponse aux molécules répulsives et attractives. A droite : les molécules attractives vont provoquer une augmentation de la polymérisation des microtubules et de la F-actine (1). Ainsi, le transport vésiculaire jusqu'au cône est facilité (5, 6) permettant l'apport de membrane et les récepteurs transmembranaires nécessaires à l'avancée du cône de croissance (2, 3, 5). Enfin un phénomène d'endocytose permet le recyclage des points d'adhésion focaux (4). A gauche : les molécules répulsives provoquent l'effet inverse par la dépolymérisation du cytosquelette (1), elles ralentissent le transport et l'exocytose des molécules d'adhésion (5). Au contraire, les molécules répulsives provoquent des phénomènes d'endocytose massive favorisant le collapse du cône (4). Adapté de (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011).

### 4.2.2. Raffinement du réseau

Avant l'établissement définitif des contacts neuronaux, les molécules de guidage effectuent une dernière étape de raffinement nécessaire à la maturation du réseau neuronal. Cette étape de raffinement est vue comme un évènement régressif du développement du système nerveux allant de l'élimination de certaines connexions à la disparition de prolongements entiers parfois via l'induction de l'apoptose des neurones. Deux mécanismes sont responsables de l'élimination d'axones surnuméraires et des connexions non efficaces : l'élagage ou le « pruning » et la mort cellulaire programmée plus connue sous le nom d'apoptose.

Le pruning des axones est un processus de rétractation ou de dégénérescence d'un axone ou d'une collatérale, menant à sa disparition complète sans altérer pour autant la survie du neurone émettant l'axone. Ce phénomène, touchant tous types de neurones aussi bien au niveau du SNC que du SNP, a été particulièrement étudié dans les neurones ganglionnaires de la rétine. Ces neurones projettent leurs axones et leurs collatérales au niveau des colliculi supérieurs dans le mésencéphale. De manière étonnante, les axones de ces neurones semblent coloniser l'intégralité des colliculi avant d'être dirigés en une zone restreinte respectant une carte rétinotopique précise (Figure 17). Les nombreux travaux sur la mise en place du système visuel ont montré que cette réorganisation était étroitement liée aux molécules de la famille des ephrines assurant le guidage et le pruning des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (Hindges et al., 2002). Depuis, les ephrines ainsi que les sémaphorines ont été impliquées dans le pruning des neurones corticaux et hippocampiques chez les mammifères en agissant directement sur la déstabilisation de la F-actine (Vanderhaeghen and Cheng, 2010).

Le deuxième mécanisme permettant le raffinement du réseau repose sur l'induction de la mort des neurones par apoptose. L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée qui peut être déclenchée par des facteurs intra ou extracellulaires (les voies apoptotiques sont détaillées en Figure 33). L'induction de l'apoptose est dépendante de l'activation des caspases (cystein aspartate proteases). Ces protéases entrainent la mort cellulaire par divers processus tels que la fragmentation de l'ADN et le clivage de facteurs de survie entrainant leur dégradation (Figure 33). Les hypothèses stipulant que l'apoptose développementale est indispensable à l'organisation et la fonctionnalité du système nerveux reposent sur l'étude de souris déficientes pour les

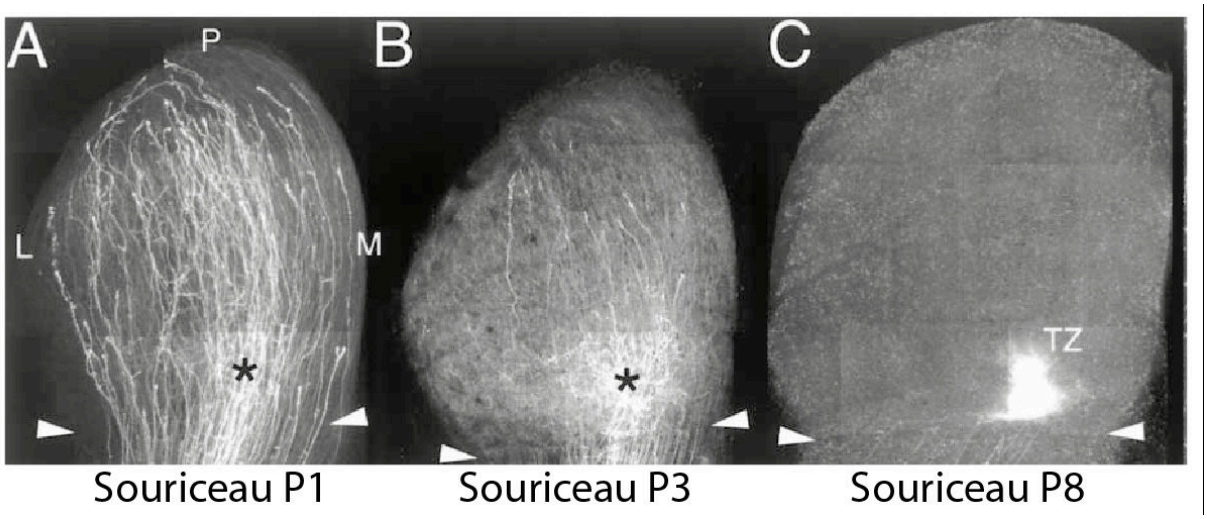



**Figure 17. Exemple de pruning chez la souris**

Evolution des axones des neurones ganglionnaires de la rétine projetant sur les colliculi supérieurs. Les souriceaux sont reçoivent une injection de dye lipidique fluorescent dans la rétine à la naissance, permettant de suivre l'évolution des axones de ces neurones au cours du temps. Les neurones projettent en premier lieu dans tout le colliculus (A). Ils sont ensuite « élagués » (« prunés ») pour ne se concentrer que dans une zone restreinte du colliculus. Ce phénomène de pruning, assuré par les ephrines, est responsable de la mise en place des cartes rétinotopique du système visuel. Adapté de (Hindges et al., 2002).

différents effecteurs de l'apoptose (caspase 3 et 9, APAF1, Bax et Blc2). Ces souris présentent pourtant des phénotypes contradictoires ne permettant pas de statuer sur le rôle de l'apoptose développementale (Hyman and Yuan, 2012). Seules les souris ko pour la caspase 9 démontrent une augmentation du parenchyme cérébral et une réduction de l'apoptose développementale observée chez les embryons (Kuida et al., 1998). Alors qu'aucun lien tangible n'a pu être établi entre le guidage axonal et le déclenchement de l'apoptose chez ces mutants, l'inhibition de l'expression des molécules de guidage de la famille des ephrines et des sémaphorines provoque une réduction de l'apoptose développementale (Ben-Zvi et al., 2008). A l'inverse, la surexpression de l'ephrine A5 provoque une augmentation de l'apoptose neuronale *in vivo* et l'ajout d'ephrine soluble sur des neurones corticaux suffit également à induire leur apoptose (Depaepe et al., 2005).

Cette absence de phénotype robuste peut s'expliquer par une redondance fonctionnelle des différents inducteurs de l'apoptose. Cependant, au regard de la littérature, il n'est pas impossible que la fonction associée à l'apoptose développementale ne soit pas aussi déterminante à l'organisation du SNC des mammifères qu'elle peut l'être chez les organismes inférieurs tels que le poulet, le nématode ou encore la drosophile. Une étude plus exhaustive des mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose neuronale serait nécessaire pour statuer sur cette interrogation.

### 4.2.3. Etablissement des synapses

#### 4.2.3.1. Définition et composition d'une synapse

L'établissement des synapses chimiques entre un axone et la dendrite d'un autre neurone nécessite la mise en place de structures spécialisées. L'axone va développer des boutons axonaux représentant la partie pré-synaptique de la synapse, tandis que la partie post-synaptique est caractérisée par la présence d'une densité post-synaptique (PSD pour « post-synaptic density ») à la membrane plasmique de la dendrite. Dans la plupart des synapses excitatrices, la partie post-synaptique prend la forme de protubérances membranaires appelées « épines dendritiques », alors que les synapses inhibitrices en sont dépourvues.

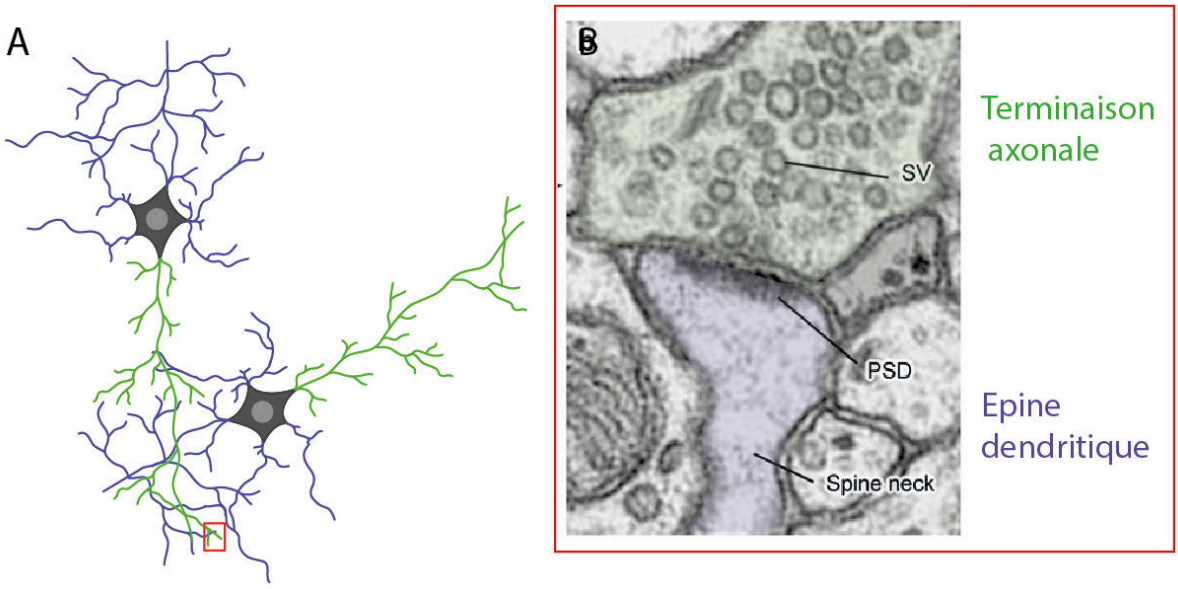



**Figure 18. La synapse est la zone de communication fonctionnelle entre deux neurones**
A) Représentation schématique de neurones. Les neurones sont des cellules polarisées qui émettent des prolongements dendritiques (violet) et un prolongement axonal ramifié (vert). La synapse est la jonction qui permet classiquement le passage de l'information nerveuse entre l'extrémité axonale d'un neurone présynaptique et l'extrémité dendritique d'un neurone post-synaptique
B) Morphologie d'une synapse du système nerveux central observée en microscopie électronique à transmission sur laquelle on peut visualiser une terminaison axonale (en vert) remplie de vésicules synaptiques (sv) et une épine dendritique (violet) caractérisée par une densité post-synaptique (PSD) et d'un cou (spine neck) la reliant au dendrite.
Adapté de (Sheng and Hoogenraad, 2007).

Dans le cas des synapses excitatrices, les boutons axonaux permettent la transmission d'un signal à la partie post-synaptique par l'exocytose d'un neurotransmetteur, le glutamate, chargé à l'intérieur de vésicules synaptiques (VS) (Figure 18).
Un ensemble 60 protéines différentes orchestre le relargage du glutamate en plusieurs étapes comprenant l'acheminement et la séquestration des vésicules au niveau du bouton axonal, le chargement des neurotransmetteurs (NT) dans les VS, la fusion des vésicules avec la membrane plasmique au niveau de la zone active du bouton permettant le relargage des NT et enfin la reformation des vésicules à partir de la membrane (Wilhelm et al., 2014). De son coté, l'épine dendritique, responsable de la réception de l'information, est composée d'au moins autant de protéines permettant l'activation de voies de signalisations en réponse aux NT. Brièvement, les NT fixent et activent des récepteurs canaux rassemblés à la surface de l'épine au niveau de la densité post-synaptique qui laissent passer des ions sodiques ($Na^+$), induisant ainsi la dépolarisation de la membrane post-synaptique, l'activation de cascades de signalisation et ainsi la transmission du signal (Figure 18).
Les principaux constituants du bouton axonal et de l'épine dendritique assurant une fonction dans la transmission synaptique sont résumés dans les tableaux 1 et 2 et la Figure 19.

#### 4.2.3.2. Régulation de la synaptogenèse

La synaptogenèse permet la mise en place des deux plateformes protéiques indispensables de la transmission du signal : la zone active de la partie pré-synaptique et la densité post-synaptique. La zone active représente la zone de fusion des VS, elle est constituée d'un ensemble de protéines structurales et fonctionnelles permettant notamment l'accrochage et la fusion des VS avec la membrane du bouton axonal. La densité post-synaptique est également composée de complexes protéiques assurant à la fois, le maintien de la structure de l'épine dendritique, le rassemblement des recepteurs post-synaptiques et la transduction du signal (Figure 19)(tableau 1 et 2).
La synaptogenèse est étroitement dépendante de la dynamique du cytosquelette d'actine qui permet la modification structurale des deux entités synaptiques. L'établissement du bouton axonal est caractérisé par un enrichissement en F-actine (Zhang and Benson, 2001).

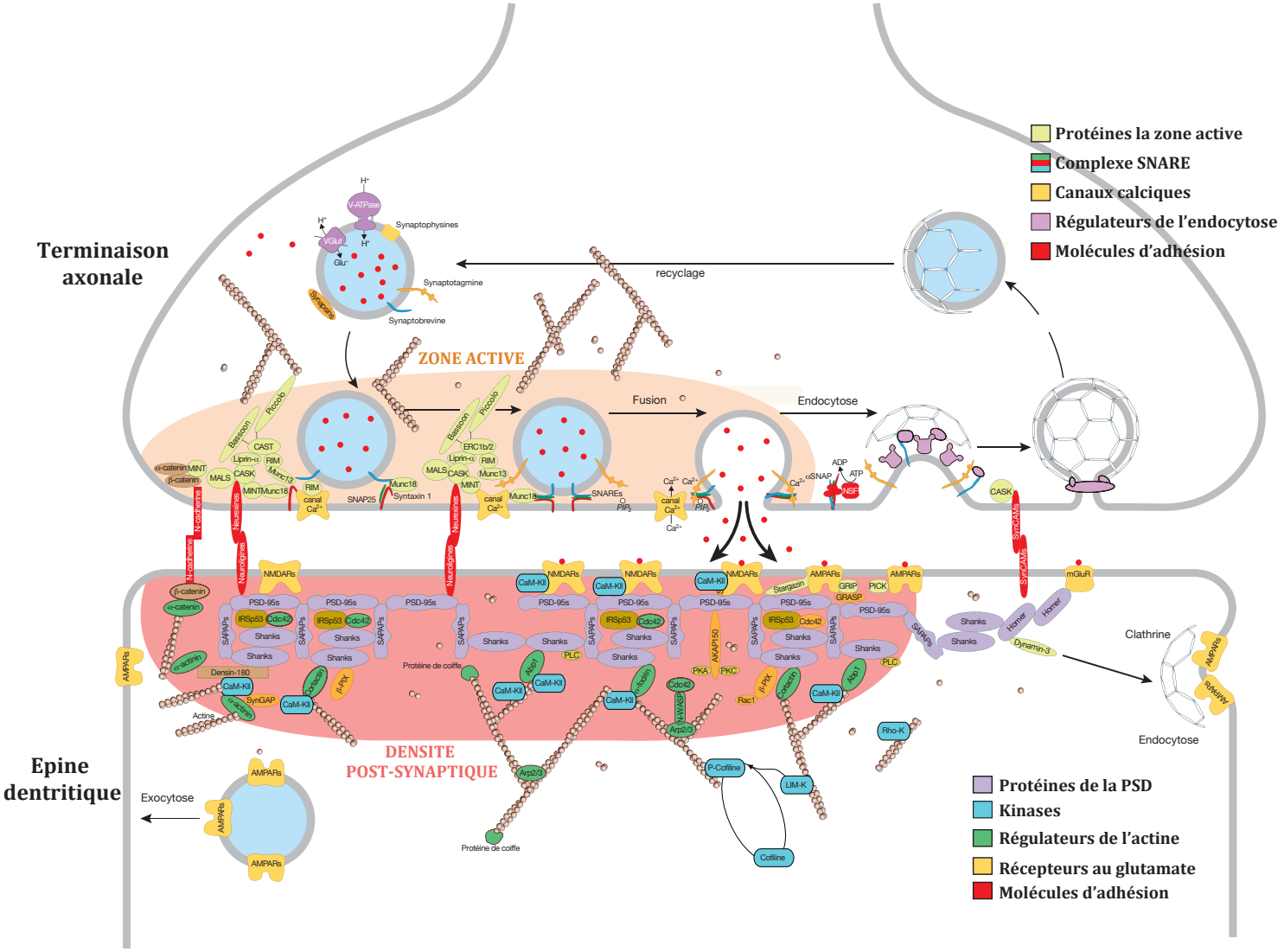



**Figure 19. Organisation moléculaire d'une synapse**

Les principales protéines et leurs fonctions sont listées dans les tableaux 1 (protéines pré-synaptiques) et 2 (protéines post-synaptiques). Adapté de (Chua et al., 2010).

Il a été montré que l'actine assure plusieurs fonctions au niveau du bouton, à commencer par une fonction structurale similaire à celle assurée au niveau du cône de croissance. De plus, la présence de la F-actine permet le recrutement et la séquestration des vésicules synaptiques au niveau de la zone active (Nelson et al., 2013b; Zhang and Benson, 2001). En parallèle, l'actine joue également un rôle majeur dans le développement des épines dendritiques à commencer par l'initiation des filopodes, décrits comme les précurseurs des épines (Portera-Cailliau et al., 2003). La présence du complexe Arp2/3 aux extrémités des filopodes permet d'en augmenter la surface du filopode à son extrémité donnant la forme caractéristique des épines dendritiques matures. Celles-ci sont, en effet, composées d'une fine protrusion réminiscente du filopode appelée le « cou » de l'épine et sur lequel trône une partie renflée appelée « tête » de l'épine. La variation du ratio entre le diamètre de la tête et du cou a permis d'établir une classification des épines observées en microscopie électronique (Bourne and Harris, 2008; Harris et al., 1992)(Figure 20). Ces changements morphologiques s'accompagnent d'un recrutement de deux protéines de la PSD (Skank1b et PSD95) induisant une stabilisation du filopode en épine dendritique (Arstikaitis et al., 2011; Hayashi et al., 2009).

Le bouton axonal et l'épine dendritique, souvent décrits comme deux compartiments isolés sont étroitement dépendants l'un de l'autre. Une association physique assurée par les neuroligines (NLG1-2-3), la β-neurexin et la N-cadhérine de la famille des molécules d'adhésion est nécessaire au développement de la partie pré- comme de la partie post-synaptique.

La NLG1, protéine transmembranaire présente uniquement au niveau de la membrane post-synaptique, induit une maturation simultanée des deux composantes de la synapse puisque sa surexpression induit le recrutement d'un de ses interacteurs direct, PSD-95 au niveau de l'épine mais également le recrutement de clusters de vésicules pré-synaptiques (Arstikaitis et al., 2011). Ce recrutement de vésicules synaptiques et le relargage des NT sont assurés par la β-neurexin. Cette protéine transmembranaire présente uniquement à la membrane pré-synaptique peut interagir avec NLG1 via son domaine extracellulaire et avec les protéines structurales de la zone active (Craig and Kang, 2007)(Figure 19). Malgré l'importance de ces protéines démontrée principalement *in vitro*, le triple ko des NGL1-2-3 ne présente aucune altération dans la formation des synpases (densité, morphologie, développement) mais seulement

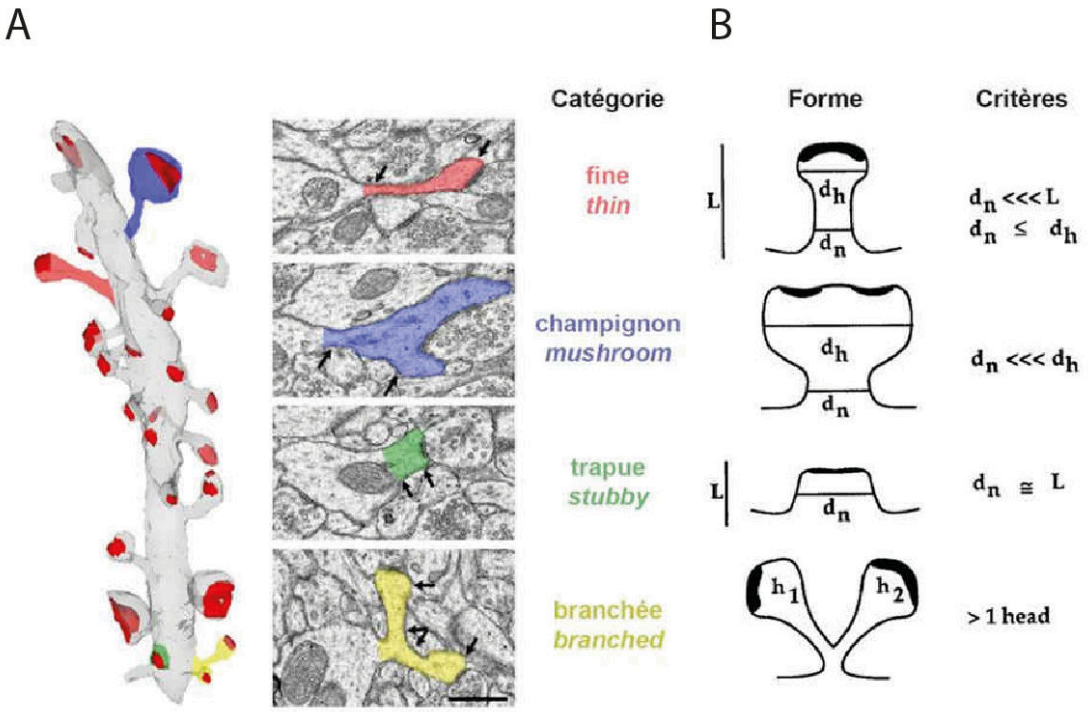



**Figure 20. Diversité morphologique des épines dendritiques.**
A) Reconstruction tridimentionnelle d'un dendrite de neurone d'hippocampe représentant la diversité morphologique des épines dendritiques (PSD représentée en rouge). Les 4 types d'épine caractéristiques sont illustrés en microcopie électronique à transmission (Fine, champignon, trapue et branchée). Adapté de (Bourne and Harris 2008)
B) Représentation schématique des quatre catégories d'épine dendritiques et de leurs critères de classification. L : longueur, dn : diamètre du cou, dh : diamètre de la tête. Adapté de (Harris et al., 1992).

une perturbation de la transmission synaptique (Varoqueaux et al., 2006). Cette absence d'effet dans la formation des synapses suggère une redondance fonctionnelle potentiellement assurée par d'autres molécules d'adhésion également impliquées dans la formation des contacts synaptiques telle que la N-cadhérine.

La N-cadhérine, uniquement exprimée dans le SNC, est une protéine formant des interactions homophiliques trans-synaptiques. Exprimées aussi bien au niveau de l'axone que des dendrites, elles assurent un réarrangement de la F-actine permettant la mise en place et le maintien des synapses. En pré-synaptique, la N-cadhérine forme un complexe avec les protéines β-pix et scribble permettant d'activer la polymérisation de la F-actine et ainsi de recruter les vésicules pré-synaptiques (Sun and Bamji, 2011). Au niveau post-synaptique, la N-cadhérine permet l'activation de la α-catenin qui module indirectement la dynamique du cytosquelette d'actine (Figure 19). *In vitro*, l'inhibition des fonctions de la N-cadhérine ou de la α-catenine suffit à réduire le nombre de synapses et entraine la présence de long filopodes dendritiques immatures associées à une perte des protéines synaptiques (Chazeau et al., 2015; Togashi et al., 2002).

Tout comme pour la neuroligine, les souris ko N-cadhérine, malgré une désorganisation massive du cortex, ne présentent aucun défaut dans l'établissement des synapses (Kadowaki et al., 2007). Ces deux complexes semblent donc assurer une fonction similaire, expliquant l'absence d'effet majeur dans la formation et le maintien des synapses chez les souris déficiences pour l'une ou l'autre des deux protéines. Des expériences *in vitro* ont par ailleurs montré que ces deux protéines agissent en coopération dans la régulation de la formation des synapses (Aiga et al., 2011; Stan et al., 2010).

Enfin, la synaptogenèse et plus précisément, la stabilisation des épines dendritiques semble également dépendre de l'activité électrique des neurones pré- et post-synaptiques (De Roo et al., 2008).

## 5. Transmission synaptique

Les neurones matures, comme toutes les cellules, expriment à leur surface des canaux potassiques et pompes Na/K responsables du potentiel membranaire. Cependant, ils ont la particularité d'exprimer, au niveau des axones, des canaux sodiques et potassiques dépendants du voltage autrement-dit dont l'ouverture dépend de la valeur

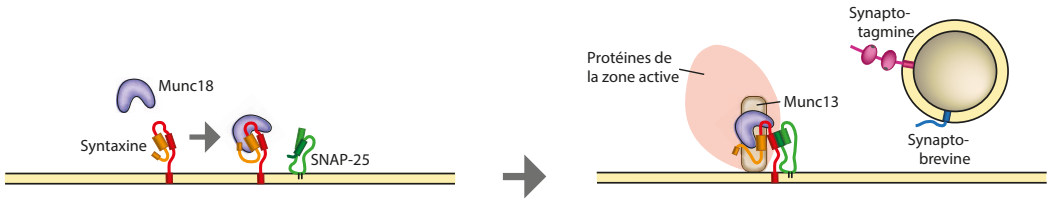
| Protéine | Fonction | Interaction |
|---|---|---|
| **Molécules d'adhésion** | | |
| β-Neurexine | Recrutement des VS | CASK, synaptotagmine |
| N-cadhérine | Organisation de la F-actine | β-caténine |
| **Protéines de la zone active** | | |
| Munc13 | Confinement des canaux $Ca^{2+}$ | RIM |
| Munc18 | Arrimage des VS | Syntaxine, VAMP2 |
| CASK | Recrutement des VS | β -Neurexine |
| RIM | association canaux $Ca^{2+}$-VS | canaux $Ca^{2+}$, VS (via Rab3) |
| Piccolo | Couplage exocytose-endocytose | Voir légende |
| Bassoon | Couplage exocytose-endocytose | Voir légende |
| **Régulateurs de la fusion** | | |
| VAMP2 (Synaptobrévine) | Fixation des vésicules sur les SNARE membranaire | Munc18, SNAP25 |
| Syntaxine | Fusion des vésicules synaptiques | SNAP25, Munc18 |
| SNAP25 | Fusion des vésicules synaptiques | VAMP2, Syntaxine |
| **Complexe SNARE** | | |
| Canaux calciques | Entrée de Calcium extracellulaire | $PIP_2$, Synaptotagmine |
| $PIP_2$ | Recrutement de synaptotagmine | Synaptotagmine |
| Synaptotagmine | Régulateur de la fusion des vésicules | $PIP_2$, Munc13, β -Neurexine |
| **Régulateurs de l'endocytose** | | |
| AP2 / AP180 / Stonine 2 | Reconnaissance des cargos à endocyter | AP2, cargos |
| Clathrine | Formation de la vésicule d'endocytose | AP2, Dynamine |
| Amphiphysine / Endophiline | Déformation membranaire, recyclage de la clathrine | AP2, Synaptojanine |
| Dynamine | Scission du cou de la vésicule | Amphiphysine, Endophiline |
| Synaptojanine | Recyclage de la clathrine | Endophiline, $PIP_2$ |

| Protéine | Fonction | Interaction |
|---|---|---|
| **Molécules d'adhésion** | | |
| NLG-1 | Assemblage de la PSD | PSD-95 |
| N-cadherine | Organisation de la F-actine | β-caténine |
| **Protéines d'échafaudage** | | |
| PSD-95 | Structure la PSD – Séquestre les GluN-R | NLG-1, GluN-R, GKAP |
| Shank1 | Associe la PSD à la F-actine | GKAP, Homer, cortactine |
| Homer | Structure la PSD – Séquestre les mGluR | Shank1, mGluR |
| SAPAP | Structure la PSD | PSD-95, Shank1 |
| **Récepteurs au glutamate** | | |
| GluA-R | Entrée Na+ | PSD-95 (via stargazine) |
| GluN-R | Entrée Na+ et Ca2+ | PSD-95, CamKII |
| mGlu-R | Activation protéine G | Homer |
| **Actine et protéines régulatrices** | | |
| G-actine | Forme la F-actine | F-actine |
| F-actine | Stabilise la PSD | ABP, Cofiline |
| Cortactine (ABP) | Active Arp2/3 | F-actine, Shank1b |
| α-actinine (ABP) | Cross-link la F-actine | F-actine |
| α-catenin (ABP) | Associe l'actine à la membrane | F-actine, β-catenin |
| Arp2/3 (ABP) | Nucléation de filaments branchés | F-actine |
| Protéine de coiffe (ABP) | Stabilise la F-actine | F-actine |
| Cdc42 | Stimule polymérisation de F-actine | N-WASP |
| N-WASP | Active Arp2/3 | Arp2/3, Cdc42 |
| **Protéines Kinases** | | |
| CamKII | Signalisation calcique | GluN-R, F-actine |
| Cofilin | Sectionne la F-actine | F-actine |
| Rho | Stimule polymérisation de F-actine | F-actine |
| LIM | Active la cofilin | F-actine |

**Tableaux 1 et 2. Fonctions et interactions des principales protéines du bouton axonal (Tableau 1) et de l'épine dendritique (Tableau 2)**

Bassoon interagit indirectement avec RIM via la proteine ERC1b/2. Piccolo interagit également avec ERC1b/2 et indirectement avec la Stonine 2 via les protéines régulatrice de l'actine

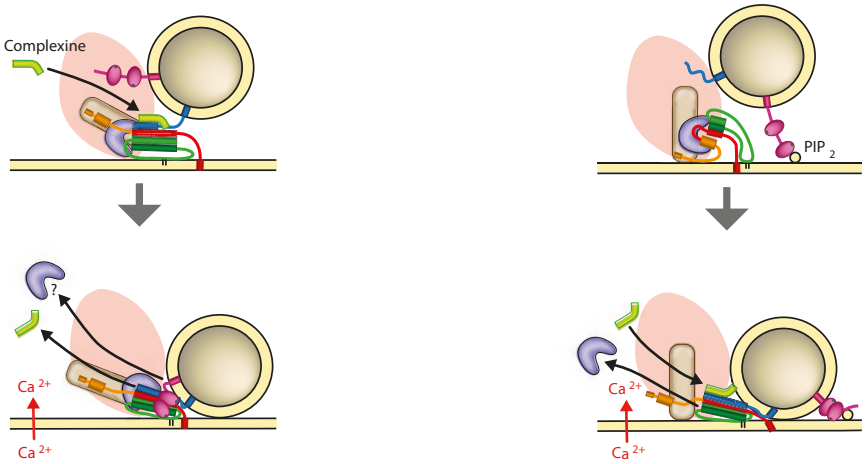
1. Activation du complexe t-SNARE membrnaire par les protéines de la zone active




2. Association des complexe t-SNARE/v-SNARE

2a. La complexine maintient le complexe t-SNARE en conformation inactive

2b. Munc18 inhibe l'interaction t-SNARE/v-SNARE




3. fusion de la vésicule suite à l'entrée de calcium

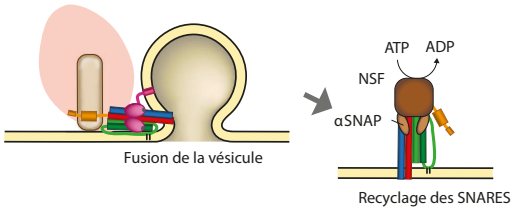



**Figure 21. Etapes de l'arrimage et de la fusion des vésicules synaptiques par les complexes SNARE**
Adapté de (Jahn and Fasshauer, 2012).

du potentiel membranaire. Les canaux $Na^+$, sensibles aux modifications du potentiel de repos, vont s'ouvrir en cas d'augmentation de celui-ci et ainsi permettre l'entrée massive de $Na^+$ à l'intérieur de l'axone inversant le potentiel de membrane de -60mV à +40mV. Cette dépolarisation de la membrane a pour conséquence directe d'induire l'ouverture des canaux $K^+$ plus lents, permettant ainsi la sortie des ions $K^+$ et donc le retour du potentiel de repos. La dépolarisation de la membrane se propage le long de l'axone par l'ouverture successive des canaux $Na^+$ et $K^+$ voltage-dépendent jusqu'aux boutons axonaux.

## 5.1. La partie pré-synaptique

### 5.1.1. Relarguage des NT

L'arrivée du potentiel d'action dans le bouton pré-synaptique déclenche l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants permettant la fusion des vésicules chargées en neurotransmetteurs avec la membrane plasmique. Les neurotransmetteurs (NT) ainsi libérés dans la fente synaptique vont engendrer des réponses variées de la partie post-synaptique en fonction de leur nature. Il existe plusieurs types de neurotransmetteurs déclenchant des réponses post-synaptiques excitatrices ou inhibitrices, en d'autres termes, qui augmentent ou diminuent la probabilité de déclencher un potentiel d'action dans le neurone post-synaptique. Parmi les nombreux NT relargués dans le SNC, les deux principaux impliqués dans la communication au sein du télencéphale sont le glutamate excitateur et le GABA (Gamma-Aminobutyric Acid) inhibiteur.

**La machinerie SNARE et ses partenaires permettent l'exocytose**

Les vésicules synaptiques (VS) portent de nombreuses protéines membranaires permettant leur chargement en neurotransmetteur, leur fusion et leur recyclage (Takamori et al., 2006). Les protéines de la machinerie SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor) présentes au niveau des VS et de la membrane plasmique sont directement responsables de la fusion des vésicules. Elles sont composées de la synaptobrévine (ou VAMP-2 pour vesicle associated membrane protein 2) positionnée sur les VS (v-SNARE), de la syntaxine et de SNAP-25 présentes au niveau de la membrane plasmique (t-SNARE). Ces 3 protéines sont suffisantes pour induire la fusion de la vésicule synaptique de la manière suivante :

La synaptobrévine peut former un complexe avec SNAP-25 et la syntaxine au niveau de la membrane plasmique. L'association de ces protéines suite à l'entrée de calcium permet le rapprochement des deux membranes aboutissant à une hémi-fusion de la membrane plasmique et vésiculaire libérant ainsi les neurotransmetteurs. Le calcium est l'élément déclencheur de la fusion des vésicules, cependant les mécanismes de régulation mis en place par les part les protéines de la pré-synapse ne sont pas encore clairement établis (Figure 21). A ce stade, la vésicule peut se détacher de la membrane plasmique et retourner dans le pool de vésicule synaptique. Ce phénomène appelé « kiss and run », non décrit dans ce manuscrit, ne semble pas majoritaire dans le système nerveux chez les mammifère (Granseth et al., 2006). Dans la majorité des cas, la vésicule fusionne complètement avec la membrane plasmique et devra être recyclée par un processus d'endocytose.

Bien que des modèles *in vitro* aient montré que les SNARE étaient suffisantes pour induire une fusion membranaire, le déclenchement de la fusion des vésicules suite à l'entrée de calcium *in vivo* nécessite l'intervention de protéines accessoires. Parmi les protéines impliquées, la synaptotagmine présente sur les vésicules synaptiques assure une fonction importante dans la fusion des deux membranes. En présence de calcium, cette protéine a la capacité d'interagir avec le $PIP_2$ (Phosphatidylinositol (4,5)Phosphate) présent au niveau de la membrane plasmique. L'entrée de calcium déclenchée par l'arrivée du potentiel d'action permet donc l'association entre la synaptotagmine et le $PIP_2$, rapprochant suffisamment les membranes pour provoquer la fusion (Jahn and Fasshauer, 2012).

### 5.1.2. Recyclage des vésicules synaptiques

Une fois la vésicule fusionnée, les protéines de la zone active permettent un couplage « exocytose-endocytose » afin d'assurer un recyclage rapide des vésicules synaptiques (Haucke et al., 2011).

#### 5.1.2.1. Recyclage dépendant de la clathrine

Le modèle principal de couplage exocytose-endocytose a été décrit avec l'arrivée de la microscopie électronique. Il repose sur la reformation des vésicules synaptiques à partir de la membrane plasmique sous l'action de la clathrine et de ses partenaires. De nombreuses études morphologiques, biochimiques, structurales et génétiques

démontrent le rôle essentiel de l'endocytose médiée par la clathrine (CME pour clathrin mediated endocytosis) et de ses principaux partenaires pour le recyclage des vésicules synaptiques (Kononenko and Haucke, 2015). Les principales expériences caractérisant la machinerie nécessaire au recyclage par CME reposent sur l'observation du recrutement de protéines au niveau de la membrane synaptique après l'arrivée d'un potentiel d'action. L'invalidation de l'expression de ces gènes à permis de montrer que la clathrine est recrutée par des adaptateurs protéiques capables de reconnaître les protéines à internaliser. Le complexe AP2 (Assembly Protein Complex 2) est un élément central de la CME puisqu'il permet non seulement de reconnaître les cargos à internaliser mais également de recruter d'autres protéines adaptatrices, les protéines à domaine BAR et la clathrine toutes deux impliquées dans la déformation de la membrane. Au niveau du SNC, AP2 est accompagné de la stonine 2 et de AP180 pouvant reconnaître différents cargos vésiculaires tels que VGLUT-1, la synaptotagmine et VAMP2 (Diril et al., 2006; Koo et al., 2011; Voglmaier et al., 2006). Les protéines à domaines BAR telles que l'amphiphysine et les endophilines A sont ensuite recrutées par les adaptateurs. Bien que ces protéines soient capables de déformer la membrane, aucune évidence ne permet d'affirmer leur implication dans les phases précoces de l'endocytose. Elles sont en revanche requises pour recrutement de la dynamine qui assure la scission du cou de la vésicule via son activité GTPase (Di Paolo et al., 2002) (Milosevic et al., 2011). L'endophiline permet également le recrutement de la phosphatase synaptojanine 1 qui, suivie de Hsc70 et auxiline, assurent le désassemblage du manteau de clathrine des vésicules néoformées. La clathrine, ainsi libérée, sera utilisée pour reformer de nouvelles vésicules (Figure 22).

Pourtant l'échelle de temps nécessaire à la reformation des vésicules par la CME (plusieurs secondes) est en inadéquation avec la rapidité de la fusion des vésicules synaptiques (quelques millisecondes). De plus, bien que l'implication de ces protéines dans le recyclage des vésicules ait été largement démontrée, l'invalidation leur expression (mutation ou délétion) n'abolit pas totalement la formation des vésicules. L'apparition de formes intermédiaires d'endocytose suggère un blocage partiel de la CME, pourtant l'absence de certaines protéines laisse parfois l'efficacité du recyclage intact. Ces observations poussent à envisager la mise en place d'un mécanisme compensant l'absence de la CME.

#### 5.1.2.2. Voies indépendantes de la clathrine

Il est aujourd'hui admis que d'autres processus permettent le recyclage des vésicules présynaptiques de manière indépendante de la clathrine. Deux principales voies indépendantes de la clathrine (CIE pour clathrin independent endocytosis) ont été proposées : l'endocytose de masse (BE pour bulk endocytosis) et l'endocytose ultra-rapide (UFE pour ultra-fast endocytosis). L'UFE, récemment caractérisée par le groupe de E.M. Jorgensen, correspond à la formation de larges vésicules non recouvertes de clathrine, quelques millisecondes après une stimulation unique. La BE, quant à elle, a été principalement caractérisée par les groupes de M.A. Cousin, P. De Camilli, et V. Haucke. Elle correspond à la formation de structures de type endosomal d'un diamètre de l'ordre de 100-500 nm, formées suite à une série de stimulation à haute fréquence (Figure 23). Dans le deux cas, les travaux ont démontré parallèlement la présence de figures d'endocytose dont la vitesse de formation et la taille étaient incompatibles avec la formation des cages de clathrine (Clayton et al., 2008) (Watanabe et al., 2013). Par la suite, il a été montré que la formation de ces structures étaient indépendantes de la présence de certains composants de la CME notamment la clathrine et ses partenaires tels que AP2 et la stonine 2 (Kononenko et al., 2013; Kononenko et al., 2014; Wu et al., 2014) mais qu'elle pouvait nécessiter l'intervention de l'endophiline et de la dynamine 1 et 3, et de l'actine (Clayton et al., 2009; Kononenko et al., 2014; Watanabe et al., 2013).

Une fois formées, ces structures ont la capacité de redonner des vésicules qui reconstituent le pool de vésicules présynaptiques nécessaire à la transmission neuronale, particulièrement en condition de forte stimulation (Cheung et al., 2010). Il semblerait que cette étape soit étroitement dépendante des protéines impliquées dans la CME d'où la complexité des résultats expérimentaux (Figure 23-Fiv). En effet, la perturbation de la fonction de la clathrine, de AP1, 2 et 3 impactent fortement sur la reformation de vésicules à partir des structures issues de l'UFE et de la BE (Cheung and Cousin, 2012; Kononenko et al., 2014; Watanabe et al., 2014).

Concernant la BE, une contradiction est à noter quant à la dépendance de la dynamine 1 et 3. Alors que la majorité des travaux démontrent l'implication de ces protéines dans les voies indépendantes de la clathrine, les travaux de Wu et coll. démontrent que l'absence de la dynamine 1 et 3 favoriserait plutôt la BE en inhibant la CME. De plus, ils

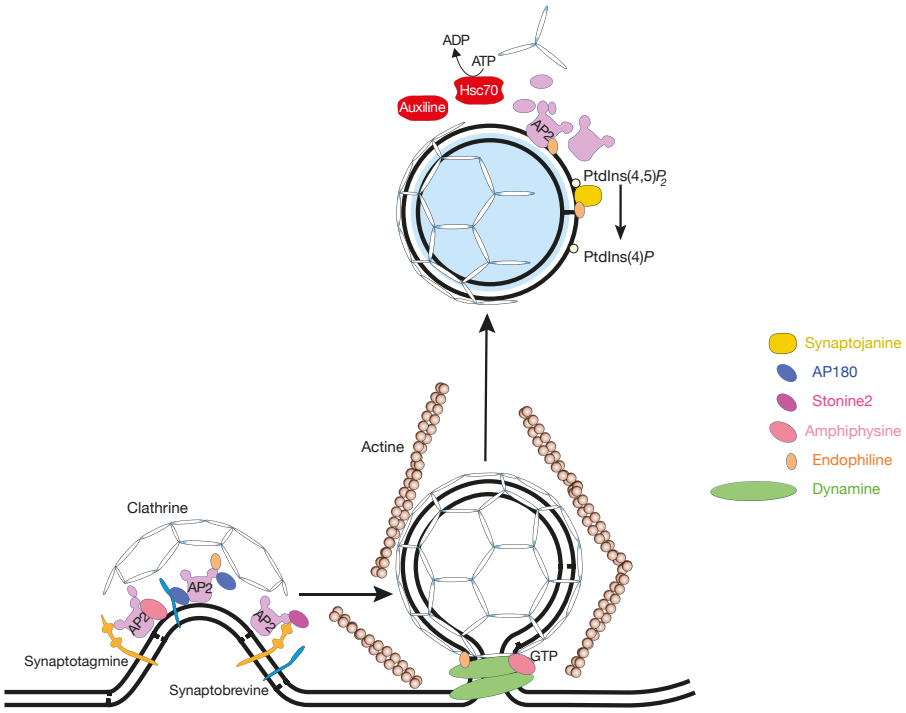



**Figure 22. Représentation schématique de l'endocytose dépendante de la clathrine à la partie présynaptique**

Les protéines adaptatrices AP2, AP180 et Stonine 2 permettent de reconnaître les protéines à endocyter et ainsi recrutent la clathrine qui va induire la formation de la vésicule d'endocytose. Les protéines à domaine BAR (amphiphysine et endophiline) permettent le recrutement de la dynamine qui va permettre la scission du cou de la vésicule. Enfin l'endophiline permet le recrutement de la synaptojanine et démentiellement du manteau de clathrine. Adapté de (Chua et al., 2010).

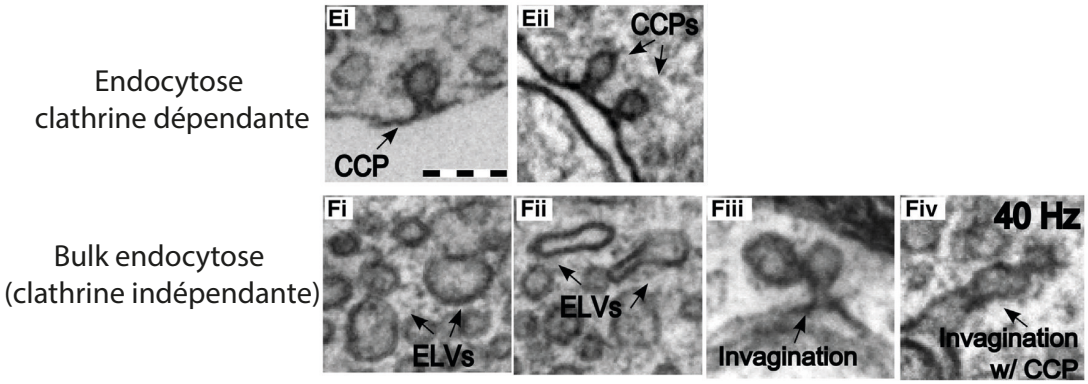



**Figure 23. Endocytoses dépendante et indépendante de la clathrine à la partie présynaptique observées en microcopie électronique à transmission.**

Le panel du haut (Ei-ii) montre la formation de vésicules entourées d'un manteau de clathrine de taille régulière (CCP : clathrin-coated pits). Bar d'échelle :100 nm.

Le panel du bas (Fi-iv) montre la formation de structures type endosome non entouré de clathrine de taille et de forme variable (ELV : endosome like vesicle). La photo Fiv montre la reformation d'une vésicule synaptique à partir d'un ELV. Ce processus dépend de la présence de la clathrine comme l'atteste la présence du manteau identiques à ceux visible en Ei-ii. Adapté de (Kononenko et al., 2014).

stipulent que l'étape de recyclage des vésicules synaptiques se fait indépendamment de la clathrine et de l'actine (Wu et al., 2014). Cette dichotomie pourrait indiquer la présence de deux voies distinctes, cependant, les protocoles de stimulation utilisés par Wu et coll. , déclenchant aussi bien la voie indépendante que dépendante de la clathrine, ne permettent pas de conclure clairement si l'apparition de bulk endosomes déclenchée en absence de dynamine 1, 3 n'est pas qu'une conséquence pathologique du blocage de la CME.

Ces récents travaux mettent en lumière la complexité du recyclage des vésicules synaptiques impliquant au moins 4 voies différentes dépendante de l'activité neuronale: le « kiss and run », l'endocytose dépendante de la clathrine et les voies indépendantes de la clathrine que sont l'UFE et la BE (Figure 24). Ces différentes voies semblent être finement régulées par la fréquence de stimulations et démontrent une capacité de la partie présynaptique à s'adapter à l'activité neuronale. En condition basale, le « kiss and run » et la CME sont majoritaires au niveau présynaptique, tandis qu'en condition de forte activité, les voies CIE, plus rapides prennent le relai pour permettre de restaurer le pool de vésicules synaptiques. L'UFE, n'étant pas déclenchée par des stimulations à haute fréquence, pourrait avoir une fonction purement mécanique dans le retrait de la membrane plasmique excédentaire apportée lors de l'exocytose.

## 5.2. La partie post-synaptique

Suite au relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, ceux ci vont induire la dépolarisation de la membrane post-synaptique par l'ouverture de canaux ioniques. Pour ce faire, les NT se fixent aux récepteurs transmembranaires exprimés au niveau des épines dendritiques. Deux grandes classes de récepteurs existent : les récepteurs ionotropiques ou récepteurs canaux permettant le passage d'ions de part et d'autre de la membrane plasmique et les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G activant une signalisation qui, à son tour, va déclencher l'ouverture des récepteurs canaux. La transmission synaptique excitatrice est principalement assurée par les récepteurs ionotropiques de la famille des récepteurs AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methylisoazol-4-propionate) ou NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate). Suite à la fixation du glutamate, ils permettent l'entrée sélective de $Na^+$ et, pour les récepteurs NMDA uniquement, du calcium. L'entrée d'ions $Na^+$ dans l'épine dendritique va

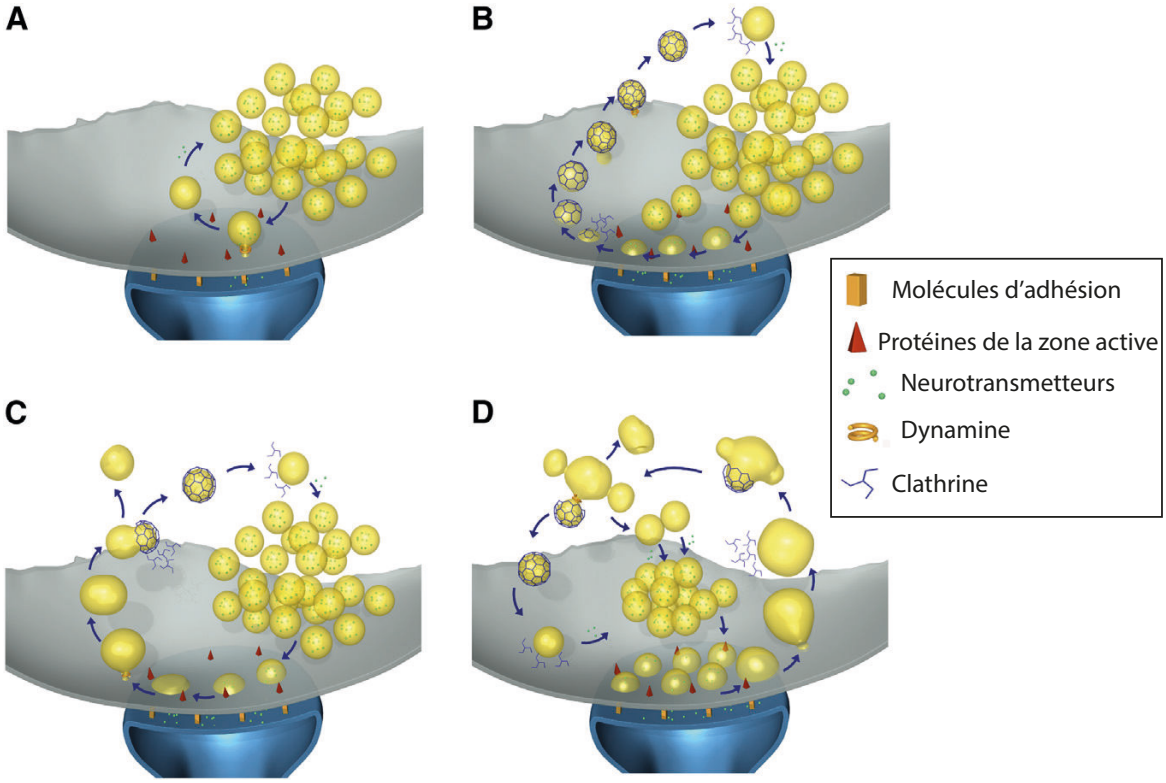



**Figure 24. Représentation schématique des modèles actuels de recyclage des vésicules synaptiques**
A) Modèle du « kiss-and-run »
B) Reformation des vésicules synaptiques par la voie dépendante de la clathrine
C-D) Reformation des vésicules synaptiques par les voies indépendantes de la clathrine. C) Modèle de la « ultra-fast endocytosis ». D) Modèle de la « Bulk endocytosis »
Adapté de (Kononenko and Haucke, 2015).

entrainer une dépolarisation membranaire appelée potentiel post-synaptique excitateur (PPSE). La sommation de ces PPSE dendritiques peut induire le départ d'un potentiel d'action axonal, où sont exprimés les canaux voltage dépendants (Figure 25A). La transmission synaptique repose donc majoritairement sur la fonction des récepteurs ionotropiques qui sont également des acteurs essentiels de la plasticité synaptique.

### 5.2.1. Mécanismes moléculaires de la plasticité : Exemple de la LTP

La plasticité synaptique se définie comme la capacité des synapses à adapter leur efficacité de transmission en fonction de leur propre activité. Cette plasticité permet d'induire une augmentation (potentialisation) ou une réduction (dépression) de l'efficacité de la transmission synaptique. Ces modifications peuvent être transitoires (short-term) ou persistantes (long-term) comme l'ont montré Bliss et Lomo qui ont découvert qu'une stimulation à haute fréquence sur les axones de la voie perforante de l'hippocampe permettait d'augmenter de manière durable (plusieurs heures) l'amplitude des PPSE observés au niveau des neurones du gyrus denté pour une stimulation similaire à celle précédant la stimulation haute fréquence (Bliss and Lomo, 1973). Ils nommèrent ce phénomène potentialisation à long terme (LTP pour long-term potentiation), qui s'oppose au phénomène inverse, la dépression à long terme (LTD pour long-term depression) correspondant à une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique provoquée par des stimulations de basse fréquence (Dudek and Bear, 1992).

La LTP, particulièrement étudiée au niveau de l'hippocampe, est suspectée d'être l'origine moléculaire des processus cognitifs d'apprentissage et de mémorisation. La célèbre expérience de la piscine de Morris à suffit à démontrer que l'induction de la LTP au niveau de l'hippocampe était indispensable à la mémorisation spatiale. Dans cette expérience, il a montré que l'injection d'un inhibiteur des récepteurs NMDA chez le rat suffisait à altérer l'induction de la LTP et la performance des animaux lors de la réalisation d'une tâche de mémorisation spatiale (Morris et al., 1986). Ces expériences démontraient pour la première fois une fonction directe de la LTP dans les processus de mémorisation.

Aujourd'hui, l'implication des récepteurs NMDA dans le déclenchement et le maintien de la LTP a été clairement établie au niveau de l'hippocampe. De nombreuses études ont

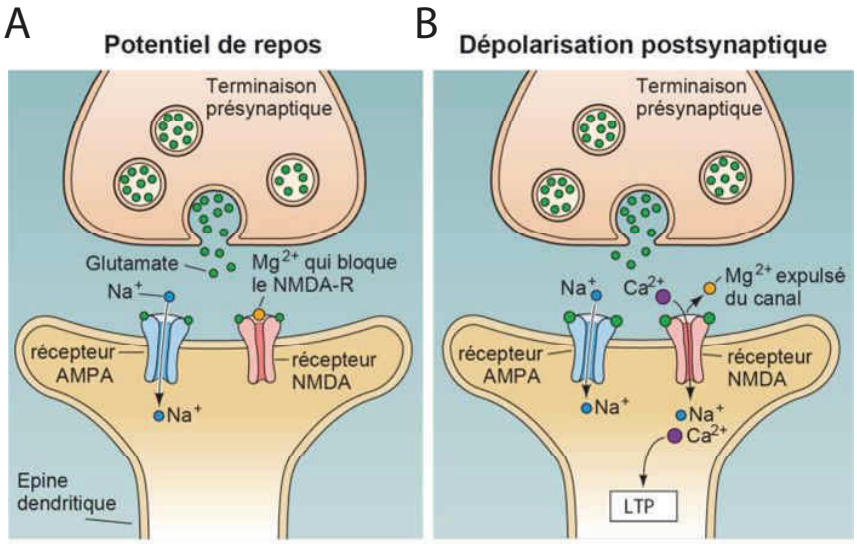



**Figure 25. Transmission synaptique basale et induction de la LTP**

A) Représentation schématique de l'induction d'un PPSE en condition basale. L'ouverture des canaux AMPA provoque l'entrée de $Na^+$ induisant une dépolarisation de la membrane plasmique post synaptique. Les récepteurs NMDA, obstrués par la présence du $Mg^{2+}$ ne laissent pas passer de $Na^+$

B) Représentation schématique de l'ouverture des canaux NMDA laissant passer $Na^+$ et $Ca^{2+}$. L'ouverture de ces canaux nécessite une dépolarisation de la membrane post-synaptique permettant la libération du $Mg^{2+}$ et ainsi l'ouverture du canal.

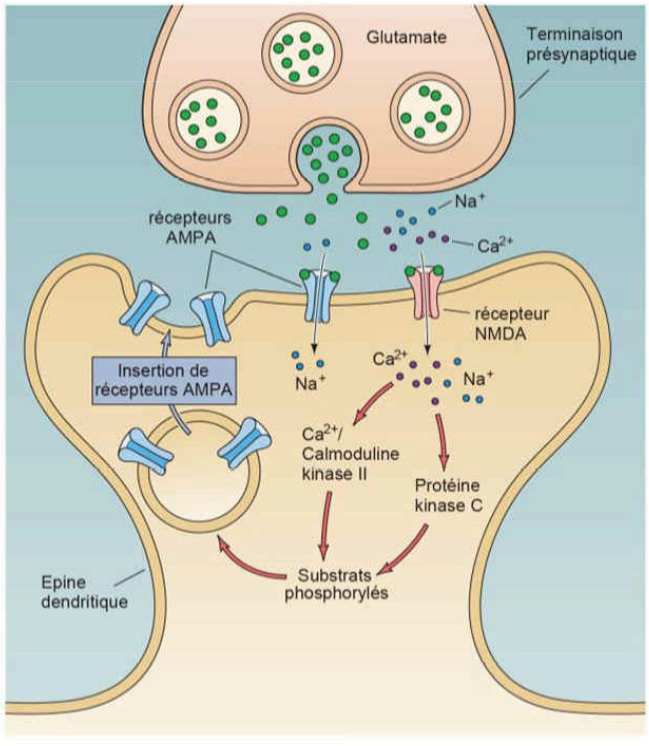



**Figure 26. Le Ca2+ est l'élément déclencheur de la LTP**

L'augmentation de la concentration de $Ca^{2+}$ dans la tête de l'épine déclenche des cascades de signalisation via la CamKII notamment, aboutissant l'établissement de la LTP (augmentation du nombre récepteur AMPA et de leur conductance).

montré que le blocage spécifique du récepteur NMDA empêchait la potentialisation sans pour autant affecter le déclenchement de PPSE (Collingridge et al., 1983). Les récepteurs NMDA, perméables au $Na^+$ et au $Ca^{2+}$ sont des récepteurs dépendants du voltage, obstrués par la présence d'un ion $Mg^{2+}$ au potentiel de membrane de repos. Leur ouverture dépend de la coïncidence de deux phénomènes : La dépolarisation de la membrane post-synaptique permettant d'expulser l'ion $Mg^{2+}$ et la fixation du glutamate présent dans la fente synaptique déclenchant l'ouverture du canal (Figure 25B).

Ce phénomène est expérimentalement provoqué lors d'une stimulation à haute fréquence entrainant une libération de glutamate rapprochée dans le temps. Le glutamate va en premier lieu induire l'ouverture des canaux AMPA qui vont permettre le déclanchement d'un PPSE. Celui-ci va élever le potentiel de membrane permettant la libération du récepteur NMDA de son $Mg^{2+}$ dans une fenêtre temporelle coïncidant avec une nouvelle arrivée de glutamate dans la fente synaptique. Ainsi, l'ouverture des récepteurs NMDA induit une entrée de $Na^+$ et de $Ca^{2+,}$ responsables de l'induction de la LTP. Le calcium se comporte comme un messager secondaire déclenchant des cascades de signalisations responsables de l'induction et du maintien de la LTP dans le temps. De nombreuses études ont démontré l'implication du calcium et caractérisé les voies de signalisation médiée par celui-ci. Il induit notamment la phosphorylation de la CamKII ($Ca^{2+}$/calmodulin-dependent protein kinase II)et de la PKC (Protein Kinase C), deux kinases abondantes au niveau de l'épine dendritique capables de modifier l'amplitude des PPSE via les récepteurs AMPA. L'inhibition de l'action du calcium ou de l'une de ces deux kinases suffit à abolir la LTP (Lynch et al., 1983) (Silva et al., 1992)(Figure 26).

Dans un premier temps, ces kinases peuvent induire la phosphorylation d'une sous-unité du récepteur AMPA augmentant ainsi la conductance du canal et donc l'entrée de $Na^+$ (Derkach et al., 1999). Parallèlement, l'activation de ces kinases au cours de la LTP provoque également l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA au niveau de la membrane de l'épine par l'induction de l'exocytose d'endosomes de recyclage portant ces récepteurs (Hayashi et al., 2000; Kopec et al., 2006; Park et al., 2004).

Enfin, la CamKII associée au calcium est recrutée au niveau de la densité post-synaptique où elle interagit avec la sous-unité NR2B du récepteur NMDA. Cette interaction provoque une auto-activation de la CamKII la rendant indépendante du calcium et semble nécessaire à l'apprentissage et à la mémorisation (Bayer et al., 2001; Halt et al., 2012). L'augmentation du nombre de récepteurs AMPA ayant chacun une

conductance plus importante associée à l'auto-activation de la CamKII explique l'élévation prolongée de l'amplitude des PPSE et ce, indépendamment de la quantité de glutamate libéré.

Ces phénomènes de plasticité synaptique prennent place dans les premières secondes après l'induction la LTP, cependant, puisqu'elle est à l'origine des phénomènes de mémorisation, cette potentialisation doit pouvoir perdurer sur une période plus longue jusqu'à l'échelle de la vie de l'individu. Cette consolidation dans le temps de la LTP est strictement dépendante de la synthèse protéique (Frey et al., 1988). De nombreuses évidences ont montrées un rôle la voie ERK dans la synthèse protéique par traduction locale dans la dendrite ou via l'activation de facteurs de transcription nucléaires. Cette synthèse protéique régulée par l'induction de la LTP augmente ainsi l'expression de protéines telles que la CamKII elle même, mais également des régulateurs du système endosomal et de la machinerie d'exocytose, ou encore des régulateurs de la dynamique du cytosquelette (Impey et al., 2004; Leal et al., 2014; Thomas and Huganir, 2004).

Ce dernier a en effet une fonction cruciale à jouer dans la plasticité synaptique, particulièrement sur le plan structural. En effet, les épines dendritiques engendrent des modifications morphologiques nécessaires au maintien de la LTP sous-tendues par un certain nombre d'acteurs moléculaires y compris le cytosquelette d'actine.

### 5.2.2. Morphologie des épines dendritiques : Rôle essentiel dans la plasticité

Comme mentionné précédemment, les épines dendritiques arborent des morphologies différentes caractérisées par la taille du cou et de la tête de celles-ci (Figure 20). Il a été clairement établi que ces différences de morphologie étaient directement corrélées à l'efficacité de la transmission synaptique. Plus précisément, le rapport entre le diamètre de la tête et celui du cou est un fort indicateur de l'efficacité d'une épine dendritique, qui sera d'autant plus importante que ce ratio est grand. D'un point de vu moléculaire, cela s'explique par le fait que la taille de la PSD est directement proportionnelle à celle de la tête de l'épine. De plus, il a été démontré que le nombre de récepteur AMPA augmentait avec la taille de la PSD, que cette augmentation était corrélée à une meilleure sensibilité au glutamate et donc potentiellement à une plus grande efficacité de transmission (Kasai et al., 2003; Takumi et al., 1999). Cependant, la taille de la tête n'est pas le seul paramètre responsable de l'efficacité synaptique qui est également sensible à la taille du

cou. Le cou, dont le diamètre et la longueur peuvent être variables d'une épine à une autre, représente une barrière de diffusion importante pour les molécules solubles. De ce fait, l'épine dendritique se comporte comme un compartiment subcellulaire isolé du reste du neurone où une signalisation se met en place. Il existe d'ailleurs une relation directe entre l'activité neuronale et la vitesse de protéines car la stimulation des récepteurs AMPA diminue la diffusion des molécules de l'épine vers la dendrite (Bloodgood and Sabatini, 2005).

L'ensemble de ces résultats démontre que les mécanismes sous-jacents de la LTP incluent l'induction de cascades de signalisations confinées dans l'épine par l'établissement d'une barrière de diffusion et une réorganisation de sa composition protéique (Figure 27). De nombreux travaux ont mis en évidence la présence de protéines capables d'induire des changements morphologiques de l'épine. La suite de ce chapitre se focalisera sur ces protéines, et sur leur possible rôle dans l'établissement cette barrière de diffusion.

### 5.2.3. Acteurs moléculaires de la morphologie des épines dendritiques

**Actine et microtubules**

Les éléments du cytosquelette sont, ici encore, essentiels au maintien de la LTP. Plusieurs travaux s'accordent à dire que l'actine joue un rôle prépondérant dans le maintien de la LTP à court et long terme à travers des modifications morphologiques de la synapse et par l'induction de voie de signalisations. L'induction *in vivo* de la LTP par stimulation haute fréquence de la voie perforante de l'hippocampe de rat induit une augmentation de la F-actine dans les épines de la couche moléculaire du gyrus denté perdurant jusqu'à 5 semaines post-LTP. L'utilisation de latrunculine A, dépolymérisant la F-actine, inhibe le maintien de la LTP au long terme sans affecter la transmission synaptique basale (Fukazawa et al., 2003). Des études *in vitro* ont démontré que l'induction de la LTP provoque l'augmentation du volume de la tête de l'épine et qu'un enrichissement des régulateurs activant la polymérisation de l'actine (Rho A, Cdc42 et Cofiline) est observé spécifiquement dans ces épines (Chen et al., 2007; Murakoshi et al., 2011).

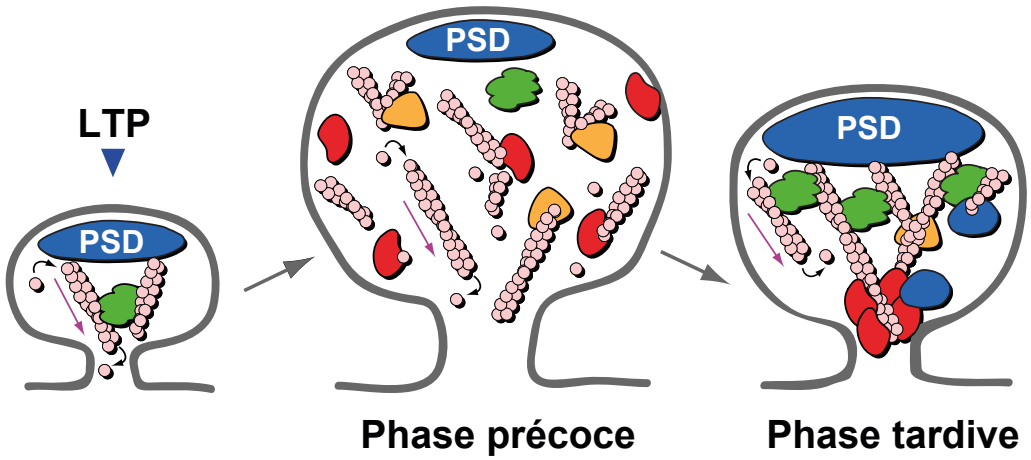



**Figure 27. Représentation schématique des changements morphologiques des épines dendritiques au cours de la LTP**

Dans les phases précoces de la LTP, la tête de l'épine gonfle de manière transitoire par un réarrangement du cytosquelette d'actine. Dans les phases plus tardives, l'épine potentialisée stabilisée est caractérisée par une augmentation du rapport entre le diamètre de la tête de celui du cou. Elle comprend un dense réseau de F-actine stable, associée aux protéines de la PSD. Adapté de (Bosch et al., 2014).

L'inhibition de la signalisation de ces protéines résulte irrémédiablement en un blocage de l'augmentation de l'épine au cours de la LTP, établissant un fort lien entre la polymérisation de l'actine et ces changements morphologiques (Bosch et al., 2014; Murakoshi et al., 2011). Enfin, ces mêmes auteurs démontrent que ce blocage est associé avec une réduction de la séquestration de la Cofiline au sein de l'épine, initialement observée après l'initiation de la LTP (Bosch et al., 2014). Ces résultats mettent en avant l'implication possible de l'actine dans l'établissement d'une barrière de diffusion au niveau du cou même si aucune évidence directe n'a vraiment été établie. Avec l'actine, les microtubules enrichis au niveau du cou de l'épine, assurent également une fonction morphologique au niveau de l'épine. La présence de microtubules associés à la protéine EB3 au niveau de l'épine coïncide avec une augmentation du volume de l'épine. De plus, p140Cap est un interacteur de EB3 et de la cortactine, qui établit un lien direct entre actine et microtubules. L'effondrement des épines dendritiques et l'incapacité des neurones ko pour p140Cap à maintenir un LTP suggèrent une association importante des deux cytosquelettes dans la plasticité synaptique (Repetto et al., 2014).

**Septines**

Les septines sont des interacteurs de l'actine et du cytosquelette capable de se polymériser et de former des réseaux protéiques à la surface des membranes sous l'activation du GTP. Au niveau du SNC, elles se localisent à la base des épines dendritiques dont elles assurent le développement (Xie et al., 2007). De part leur localisation, elles sont plus à même de moduler la morphologie du cou de l'épine que l'actine et les microtubules. Pour autant, aucune étude n'a démontré l'implication des septines dans la régulation de la transmission synaptique. En revanche, une étude récente a montré que les septines assurent une fonction dans l'établissement d'une barrière de diffusion au niveau du cou de l'épine. L'utilisation de vidéo-microscopie permettant de suivre les mouvements d'une sous-unité du récepteur AMPA démontre que la mobilité du récepteur est inversement corrélée à la présence de septine à la base du cou de l'épine (Ewers et al., 2014). Ces travaux placent ainsi les septine comme candidat idéal pour jouer un rôle dans la morphologie des épines dendritiques. Cependant, leur fonction lors de l'induction et le maintien de la LTP reste à démontrer.

**Protéines à domaine BAR**

Une dernière classe de protéine semble importante dans la régulation de la morphologie des épines dendritiques de part leur capacité à imposer une courbure à la membrane plasmique. En effet, les épines dendritiques présentent une morphologie atypique imposant des contraintes à la membrane plasmique trop importante pour être strictement dépendante du cytosquelette. Certaines protéines possèdent des domaines dits « BAR » (Bin Amphiphysin Rsv) pouvant se fixer directement à la membrane plasmique afin de lui imposer une courbure. Il existe différents types de domaines BAR pouvant induire une déformation soit concave (F-BAR) soit convexe (I-BAR) de la membrane plasmique. Ce dernier est particulièrement intéressant compte tenu de la déformation convexe induite au niveau du cou de l'épine dendritique. D'ailleurs, la protéine IRSp53 (Insuline Receptor Substrate 53) est une protéine à domaine I-BAR associée à PSD95 et impliquée dans la fonction des épines dendritiques. Elle contrôle la morphologie des épines dendritiques par des voies de signalisation dépendantes de l'actine (Choi et al., 2005). Cependant, le rôle exact de IRSp53 dans la transmission synaptique reste encore énigmatique. Les travaux sur les souris IRSp53 ko montrent un défaut de comportement chez les souris associées à une augmentation de la transmission synaptique mais une absence d'altération morphologique des épines dendritiques (Kim et al., 2009).

Cette liste, loin d'être exhaustive, reflète la complexité de la régulation de la transmission synaptique. Il est impossible d'associer une fonction spécifique et définie à chacun des acteurs de la transmission et la plasticité synaptique. Bien au contraire, tous ces acteurs variés agissent en étroite coopération pour établir une balance parfaite entre stabilité et plasticité. La plus subtile des modifications peut suffire à déstabiliser cet équilibre et conduire à la désorganisation massive du réseau neuronal.

# II. La protéine Alix

Alix (Alg-2 Interacting Protein X) ou AIP1 (Apoptosis Interacting Protein 1) est une protéine ubiquitaire initialement mise en évidence comme un partenaire d'Alg-2 (Apoptosis linked gene 2) chez les mammifères (Missotten et al., 1999). En parallèle, son homologue chez le xénope a été identifié comme un substrat des protéines kinases Src et Fyn (Che et al., 1999).

Très conservée chez les mammifères, Alix est également exprimée chez le poulet, le xénope, le zebrafish, le nématode et la drosophile avec une homologie de séquence allant de 40 à 85%. Chez la levure, la protéine BRO-1 est souvent référencée comme un homologue d'Alix, cependant, la conservation des séquences entre ces deux protéines se limite à son domaine N-terminal: le domaine BRO-1 (Figure 28).

Cette conservation de la protéine d'Alix chez tous les eucaryotes a permis une étude extensive de ses nombreuses fonctions dans différents modèles au cours des 15 dernières années. Ces travaux ont également permis d'identifier les multiples partenaires d'Alix et leurs rôles dans les différents processus cellulaires dans lesquels elle est impliquée. En revanche, les mécanismes moléculaires par lesquels Alix assure ces fonctions sont encore bien mal compris.

Ce chapitre aura pour but de donner une description des processus cellulaires dans lesquels Alix et ses différents partenaires sont impliqués et de mettre en lumière les mécanismes moléculaires connus par lesquels Alix assure ses fonctions.

## 1. Structure et interactions

Alix est une protéine cytosolique de 868 acides aminés codée par le gène *pdcd6ip* (ou *alix*) porté par le chromosome 3 (chez la souris). Elle est composée de 3 domaines distincts : Le domaine BRO N-terminal, le domaine V dans la partie centrale et enfin le domaine riche en proline C-terminal (PRD pour Prolin Rich Domain)(Figure 28). La différence de structure de ces 3 domaines permet à Alix de former des interactions avec une multitude de partenaires dont les fonctions sont listées dans le tableau 3.

Le domaine BRO s'étend du début de la protéine jusqu'à l'acide aminé 358, il est composé de 3 hélices en « épingle à cheveux » ($\alpha$ helical hairpin) dans lesquelles sont

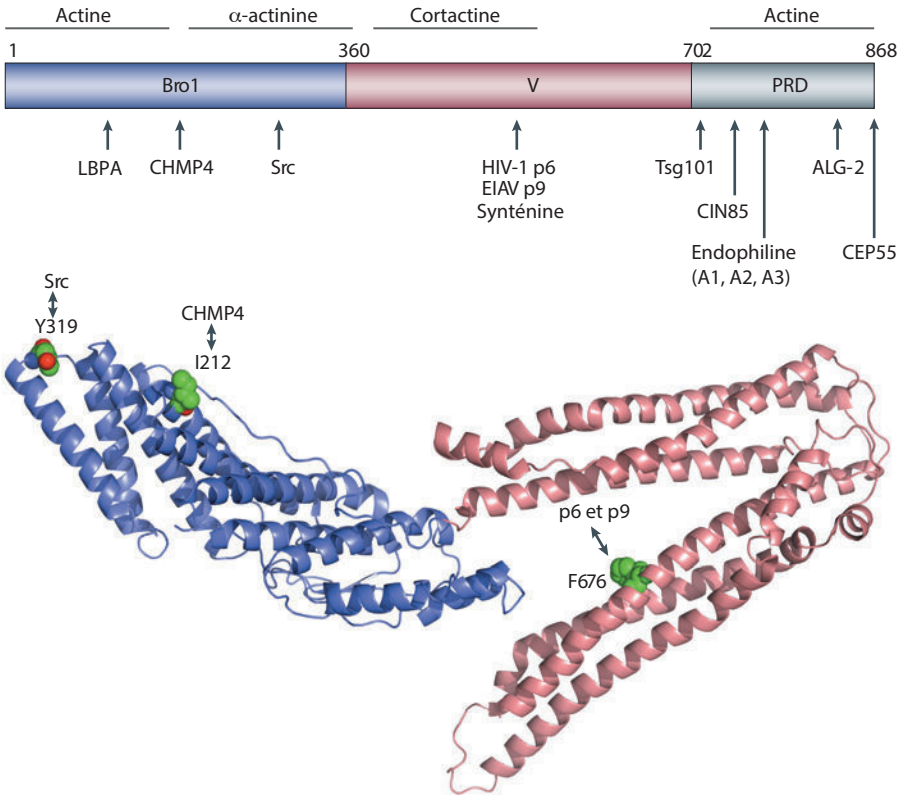



**Figure 28. Structure et partenaires de la protéine Alix**
Représentation schématique des 3 domaines (BRO, V et PRD) d'Alix et de ses interacteurs directs et cristallographie des domaines BRO et V d'Alix. Les poches hydrophobes permettant la fixation de Src, CHMP4 et les protéines P6 et P9 GAG virales sont représentées en vert.
Adapté de (Fujii et al., 2009)

logés deux poches hydrophobes autour de l'acide aminé Ile212 et du Phe319 (Fisher et al., 2007). Ces deux poches permettent respectivement l'interaction d'Alix avec Src et CHMP4 (CHarged Multivesicular body Protein 4) (Katoh et al., 2003; Schmidt et al., 2004). Le domaine BRO-1 permet également à Alix de lier le lipide LBPA (Lysobisphosphatidic acid) et ainsi de favoriser son interaction avec les membranes endosomales via les acides aminés Lys104 et Phe105. Il a également été montré que les acides aminés Asp97 et 178, conférant une capacité d'Alix a lier le calcium semblent aussi importants (Bissig et al., 2013; Matsuo et al., 2004).

Le domaine V, compris entre les acides aminés 362 et 702, est composé de deux bras qui se replient sur eux mêmes et confèrent à la protéine la capacité de dimériser. Au centre du deuxième bras, une poche hydrophobe a été identifiée comme étant le site de liaison aux protéines GAG des virus du VIH et de l'EIAV (Strack et al., 2003b). L'interaction entre Alix et la synténine va également se faire via ce domaine (Baietti et al., 2012).

| Partenaire | Motif minimum sur Alix | Fonction associée |
|---|---|---|
| CHMP4 | $I_{212}$ | Cytocinèse, bourgeonnement viral |
| LBPA | $LF_{104-105}$ et $Q_{97}Q_{178}$ | Back fusion des ILV |
| Src | $Y_{319}$ | Adhésion cellulaire et endocytose de l'EGFR |
| P6 et P9 des GAG | $F_{676}$ | Bourgeonnement viral |
| Synténine | $F_{676}$ | Régulation des exosomes |
| Actine | Région 1-167 | Adhésion cellulaire |
| Cortactine | Région 167-436 | Adhésion cellulaire |
| α-actitine | Région 436-605 | Adhésion cellulaire |
| TSG-101 | $PSAP_{717-720}$ | Cytocinèse, bourgeonnement viral |
| CIN85 | $PTPAPR_{740-745}$ | Endocytose de l'EGF-R et apoptose |
| Endophilines | $PPAKPQPPARPPPP_{748-761}$ | ? |
| Alg2 | $PPYPTYPGYPGYPGY_{802-813}$ | Apoptose |
| CEP55 | $GPP_{800-802}$ | Cytocinèse |

**Tableau 3. Motifs minimums d'interaction entre Alix et ses différents partenaires**

Certains éléments du cytosquelette d'actine interagissent également avec Alix au niveau de ces deux domaines. Même si aucune étude structurale n'a été réalisée, des expériences utilisant des formes tronquées du domaine BRO et du domaine V ont permis d'identifier que l'actine, la cortactine et l'α-actinine pouvaient se lier directement à Alix (Pan et al., 2006).

Enfin, le PRD, qui n'a pu être cristallisé est composé des 166 derniers acides aminés d'Alix. Il est enrichi en prolines et en tyrosines et présente de nombreux motifs de liaisons aux domaines SH3 (Src Homology 3). De ce fait, ce domaine lie la grande majorité des partenaires d'Alix que sont TSG-101 (Tumor susceptibility gene 101), CIN85 (Cbl-interacting protein of 85kDa), les endophilines A1-2-3, CEP55 (Centrosomal protein 55) et enfin Alg-2 (Chatellard-Causse et al., 2002; Chen et al., 2000; Morita et al., 2007; Shibata et al., 2004; Strack et al., 2003b)(Tableau 3 et Figure 28).

# 2. Fonctions

## 2.1. Alix et ESCRT : Les acteurs de la déformation membranaire

Alix, et son homologue chez la levure BRO-1, sont des régulateurs des complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complexe Required for Transport) et VPS (Vesicular Protein Sorting) respectivement. Ensemble, ils assurent plusieurs fonctions vitales à la cellule reposant sur des mécanismes de déformations membranaires.

Chez la levure, les VPS sont des protéines régulatrices de l'adressage des hydrolases acides à la vacuole. Parmi les 60 VPS, 17 d'entre elles provoquent des anomalies de la vacuole lorsqu'elles sont mutées (Raymond et al., 1992). Plus précisément, ces mutants présentent tous l'apparition de corps multilamellaires aberrants provenant d'un défaut de la formation des endosomes multivésiculés (MVE pour « multivesicular endosomes »), un des composants majeur de la voie endosomale.

### 2.1.1. Découverte des ESCRT dans la voie endosomale

#### 2.1.1.1. La voie endosomale

Toutes les cellules expriment à leur surface des récepteurs permettant la réception puis l'intégration de signaux extracellulaires variés. La régulation de leur signalisation se fait par un renouvellement perpétuel de ces protéines via la voie endosomale. Les

récepteurs sont internalisés dans une vésicule d'endocytose qui fusionne rapidement avec les premiers éléments de la voie endosomale : les endosomes précoces (Figure 29-1). Ces endosomes peuvent être réacheminés vers la membrane plasmique et recycler les récepteurs par leur fusion avec la membrane, ou bien être emmenés vers la voie de dégradation lysosomale.

Dans ce cas, les endosomes s'engagent dans une voie de maturation par la formation de vésicules intra-luminales (ILV pour « intraluminal vesicles ») vers l'intérieur de l'endosome (Figure 29-2). Cette vésiculation conduit à l'isolement des récepteurs du cytosol et donc à l'arrêt de leur signalisation. Chargés d'ILV, ils prennent alors le nom d'endosomes multivésiculés (MVE), et fusionnent avec les lysosomes libérant ainsi leur contenu de vésicules à l'intérieur du lysosome (Figure 29-3). Les hydrolases acides lysosomales dégradent alors les récepteurs contenus dans les ILV. Les MVE sont également capables de fusionner avec la membrane plasmique libérant ainsi dans le milieu extracellulaire les ILV qui prennent alors le nom d'exosomes (Figure 29-4).

Chez les mammifères, il semblerait que la formation des ILV soit étroitement dépendante de la fonction des protéines ESCRT, par homologie avec le rôle des protéines VPS. En effet, les MVE retrouvés chez les 17 mutants VPS chez la levure étaient caractérisés par une absence d'ILV, impliquant donc les VPS dans la formation de ces vésicules spécifiquement (Raymond et al., 1992).

Depuis, les études sur les ESCRT ont permis d'établir un modèle de déformation de membrane expliquant la formation des ILV.

#### 2.1.1.2. Mécanismes de déformation de la membrane par les ESCRT

La machinerie ESCRT est formée de quatre complexes composés de protéines cytosoliques de différentes natures, pouvant être recrutés de manière séquentielle à la membrane afin d'en induire la déformation. Les complexes ESCRT-0, I, II et III sont accompagnés de protéines accessoires telles que Alix et Vps4 importantes dans la régulation de l'assemblage de ces complexes (Tableau 4).

L'assemblage des ESCRT, tel qu'on le connaît aujourd'hui repose en majeure partie sur des travaux effectués à partir des VPS de levure. Néanmoins, ces travaux ont permis d'établir un modèle solide repris par tous les travaux réalisés chez les mammifères, où la majorité des fonctions physiologiques associées aux ESCRT ont été décrites. Nous

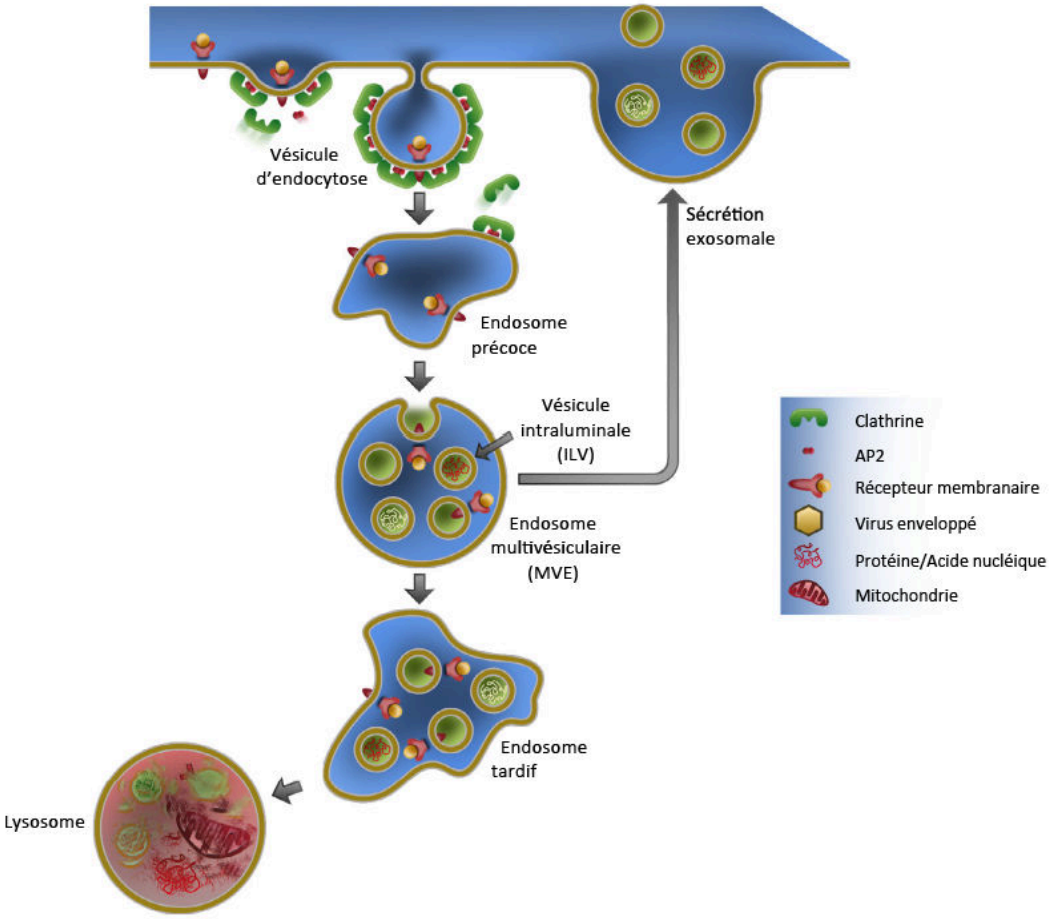



**Figure 29. Représentation schématique de la voie endolysosomale**
Les protéines de surface sont internalisées dans des vésicules d'endocytose (ici, dépendante de la clathrine) et transportées jusqu'aux endosomes précoces où elles sont triées. Les protéines destinées à la dégradation vont être internalisées dans des vésicules intraluminales à l'intérieur des MVE puis acheminées jusqu'aux lysosomes où elles seront dégradées. Certains MVE peuvent également retourner à la membrane plasmique et libérer ses vésicules intraluminales sous forme d'exosomes. Adapté de (Juan and Furthauer, 2015).

savons aujourd'hui que les ESCRT assurent une fonction de déformation de la membrane associée à la formation des ILV, la cytocinèse, le bourgeonnement des virus enveloppés à la membrane plasmique et enfin la réparation membranaire (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Gruenberg, 2001; Jimenez et al., 2014; Sadoul, 2006) (Figure 33).

| Complexe | Nom chez les levure | Nom chez les mammifères | Interactions au sein du complexe ESCRT | Autres interactions |
|---|---|---|---|---|
| ESCRT-0 | | | | |
| | Vps27 | HRS | STAM, TSG-101 | Ub, Clathrine, PIP3 |
| | Hse1 | STAM1,2 | HRS | Ub, DUB |
| ESCRT-I | | | | |
| | Vps23 | TSG-101 | VPS37, VPS28, Mvb12, HRS, Alix | Ub, protéines virales (GAG), CEP55 |
| | Vsp28 | VPS28 | TSG101, Mvb12, VPS36, (CHMP6) | |
| | Vps37 | VPS37A,B,C,D | TSG-101, Mvb12, ITS1 | |
| | Mvb12 | Mvb12A,B | TST-101, VPS28, VPS37 | |
| ESCRT-II | | | | |
| | Vps22 (snf8) | VPS22 | VPS25, VPS36 | PI3P, Ub |
| | Vps25 | VPS25 | VPS22, VPS36, CHMP6 | |
| | Vps36 | VPS36 | VPS22, VPS25, VPS28 | PI3P, Ub |
| ESCRT-III | | | | |
| | Vps20 | CHMP6 | CHMP4, VPS25, VPS4, (VPS28) | |
| | Vps32 (Snf7) | CHMP4A,B,C | CHMP6, CHMP3, CHMP2, Alix | DUB |
| | Vps24 | CHMP3 | CHMP4, CHMP2 | DUB |
| | Vps2 | CHMP2A,B | CHMP3, CHMP4, VPS4 | |
| | Vps46 (Did2) | CHMP1A,B | VPS4 | DUB |
| | Vps60 | CHMP5 | Vta1 | |
| | Yjl049w | CHMP7 | CHMP4 | DUB |
| | Its1 | ITS1 | VPS4, LIP5, CHMP1, VPS37 | |
| Accessoires | | | | |
| | Vps4 | VPS4A,B (SKD1) | Vta1, CHMP6, CHMP2 | |
| | Vta1 | LIP5 | CHMP5, VPS4 | |
| | Vps31 (BRO-1) | Alix | TSG-101, CHMP4 | Protéines virales (GAG), CEP55, DUB |

**Tableau 4. Classification et fonction des protéines ESCRT chez la levure et chez les mammifères.**
Ce Tableau regroupe les différents membres des complexes ESCRT-0, I, II, III et les protéines accessoires. Ub : Ubiquitine, DUB : Dé-ubiquitine ligase, PI3P : phosphatidylinositol-3-Phosphate.

Toutes ces fonctions, aussi éloignées soient-elles, reposent sur un mécanisme de déformation membranaire par l'intérieur dit « inversé ». En effet, la topologie requise pour ces déformations est inverse à celle requise, par exemple, pour l'endocytose où la clathrine façonne la vésicule dans le cytosol et que la dynamine vient entourer le cou de la vésicule afin d'induire une fission. Ici, les ESCRT s'assemblent sur la face cytosolique des membranes endosomales (formation des ILV) ou plasmiques (cytocinèse, bourgeonnement viral, réparation membranaire). Un phénomène de bourgeonnement conduit à la formation d'un cou membranaire à l'intérieur duquel les protéines CHMPs (charged multivesicular body proteins) du complexe ESCRT-III vont se polymériser et conduire à la fission des membranes. La protéine CHMP6 est à l'origine de la polymérisation, recrutée au niveau de la membrane via différents interacteurs, elle va induire le recrutement de CHMP4 qui a la capacité de s'oligomériser. CHMP4 ainsi recruté va donc former un filament directement responsable de la déformation de la membrane (Figure 30).

CHMP4 s'associe aux protéines CHMP3 et CHMP2B qui bloquent la polymérisation et recrutent l'AAA ATPase responsable du désassemblage et donc du recyclage du complexe ESCRT-III. Différentes études *in vitro* à partir de protéines recombinantes et sur des cellules en culture ont démontré la capacité de CHMP4, 3 et 2 à réguler la déformation de la membrane. Par exemple, la surexpression de CHMP4B et d'un mutant dominant-négatif de Vps4 entraine la formation de tubes hélicoïdaux déformant la membrane plasmique (Hanson et al., 2008). Par ailleurs, la surexpression de CHMP2B seule suffit à induire la formation de protrusions de la membrane plasmique pouvant dépasser 150 μm de longueur (Bodon et al., 2011). L'assemblage de polymères *in vitro* est également formé par les mutants d'interaction entre CHMP3, CHMP2 et Vps4 (Lata et al., 2008). Ces observations démontrent une capacité intrinsèque des protéines du complexe ESCRT-III à déformer les membranes du cytoplasme vers l'extérieur mais également l'importance de leur régulation par Vps4 (Figure 31).

Plusieurs études ont ensuite repris le modèle pour expliquer l'implication des ESCRT-III et de Vps4 dans les différentes fonctions cellulaires. En revanche, la fonction des autres ESCRT (-0-I-II) et d'Alix dans ce processus n'est pas aussi clairement établie. L'ensemble de ces protéines n'est pas nécessairement requis pour chacune des fonctions mentionnées ci-après, notamment ESCRT-0 qui peut être remplacé par des protéines

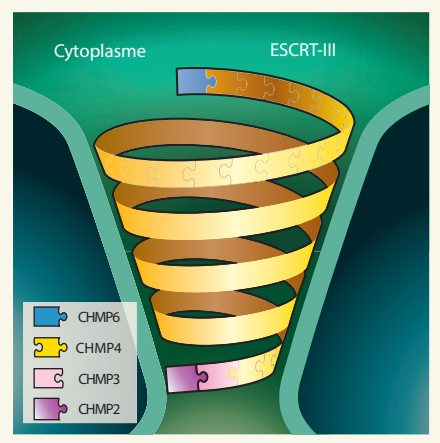



**Figure 30. Modèle de déformation et fission de la membrane par les filaments d'ESCRT-III.**
Représentation schématique d'un filament polymérique constitué de sous-unités ESCRT-III permettant l'amorçage (CHMP6), la polymérisation (CHMP4) et l'arrêt (CHMP3 et CHMP3). Adapté de (Barelli and Antonny, 2009).

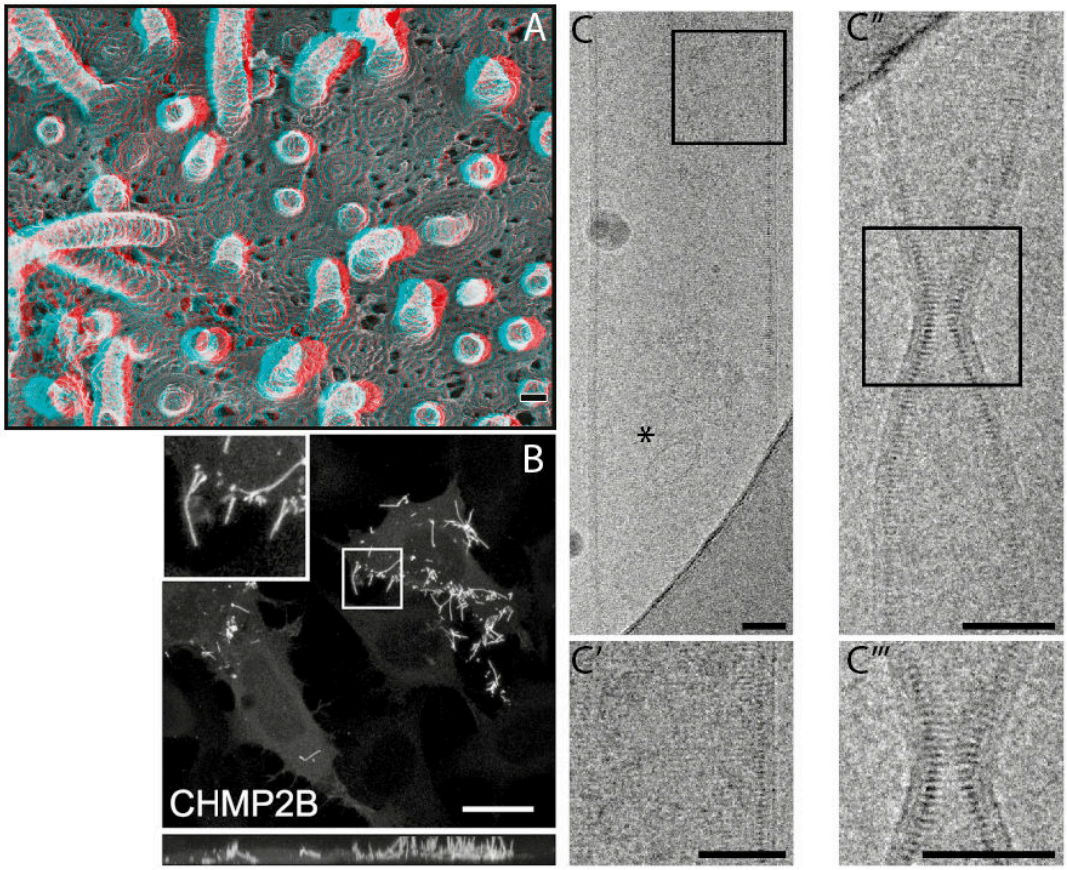



**Figure 31. Déformation de la membrane plasmique par les CHMPs.**
A. Image en microscopie électronique de COS-7 exprimant CHMP4B et un dominant négatif de VPS4B. CHMP4B forme des filaments circulaires sous la surface de la membrane au centre desquels partent des tubes déformant la membrane plasmique. Barre d'échelle : 100nm. Adapté de (Hanson et al., 2008).
B. Image en microscopie confocale de HeLa surexprimant CHMP2B. CHMP2B se concentre au sein de protrusions déformant la membrane plasmique vers l'extérieur de la cellule. Bar d'échelle : 20 μm.
C-C'''. Images en cryomicroscopie électronique de tube collectés dans le surnageant de culture des HeLa en B. Les protrusions sont recouvertes de membrane plasmique et composées de filaments hélicoïdaux de CHMP2B visibles sous la forme d'une striation régulière perpendiculaire au tube (C'). Une constriction du tube est parfois observable sans changement du pas de l'hélice (C'''). Bar d'échelle : 50 μm. Adapté de (Bodon et al., 2011; Tissir and Goffinet, 2003).

n'appartenant pas au complexe ESCRT et pour ESCRT-II et Alix qui semblent assurer une fonction redondante (Tableau 5).

### 2.1.2. Processus cellulaires contrôlés par Alix et les ESCRT

#### 2.1.2.1. Régulation des ILV…

*… et dégradation*

Une fois endocytés, les récepteurs transmembranaires adressés à la voie de dégradation vont subir l'ajout d'une ubiquitine. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle consistant à lier de manière covalente une ou plusieurs protéines ubiquitines sur les lysines des protéines à dégrader. Différents membres de la famille ESCRT ont la capacité de lier l'ubiquitine (Tableau 4). ESCRT-0 est notamment recrutée au niveau des endosomes précoces portant les protéines ubiquitinylées. Le couple HRS/STAM permet ensuite de recruter le complexe ESCRT-I par l'interaction directe entre HRS et TSG-101 qui est également capable de fixer l'ubiquitine. L'association de l'ubiquitine au complexe ESCRT-I composé de VPS28, VPS37 et MVB12 va permettre le recrutement de ESCRT-II, lui même capable de reconnaître les protéines ubiquitinylées. L'assemblage des protéines ESCRT-II (VPS22, VPS36 et VPS25) va entamer la formation de la vésicule en recrutant ESCRT-III par l'interaction VPS25-CHMP6 (Gruenberg and Stenmark, 2004)(Figure 32).

Chez la levure, l'homologue d'Alix, BRO-1 permet le recrutement de Doa4, une dé-ubiquitine ligase permettant la dé-ubiquitination des récepteurs, nécessaire à la formation des ILV (Luhtala and Odorizzi, 2004). BRO-1 assure donc une fonction primordiale dans la dégradation des récepteurs, comme l'atteste l'accumulation des récepteurs à la surface des endosomes en absence de BRO-1 (Springael et al., 2002), ce qui n'est pas le cas d'Alix chez les mammifères. La dégradation du récepteur à l'EGF (EGFR) a été majoritairement utilisée pour étudier la fonction des ESCRT dans la voie endosomale et la formation des ILV chez les mammifères. Alors que l'absence des quatre complexes ESCRT réduit de 50 à 70% la dégradation de l'EGFR (Baldys and Raymond, 2009; Luyet et al., 2008), l'absence d'Alix n'a qu'un effet mineur, voir aucun effet sur cette dégradation (Cabezas et al., 2005; Luyet et al., 2008; Schmidt et al., 2004). En revanche, la protéine HDPTP (His-Domain Protein Tyrosin Phosphatase), un homologue d'Alix chez

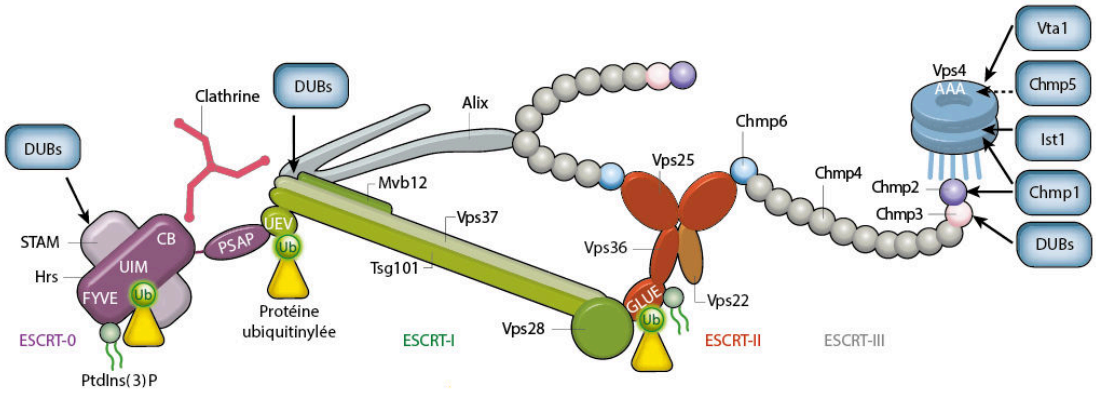



**Figure32. Représentation schématique de l'assemblage séquentiel des complexes ESCRT.**
Les complexes sont recrutés séquentiellement et interagissent entre eux. Les complexes ESCRT-0, I et II prennent en charge les protéines ubiquitinylées et lient le Phosphatidylinositol-3-Phosphate (dans le cas de la formation des ILV). ESCRT-II ou Alix fait la liaison entre ESCRT-I et ESCRT-III permettant ainsi la polymérisation et la déformation de la membrane (endosomale ou plasmique). Vps4 est recruté par CHMP2 (ESCRT-III) et permet le désassemblage des complexes. Adapté de (Raiborg and Stenmark, 2009).

les mammifères semble importante pour assurer la dégradation normale de l'EGFR (Doyotte et al., 2008). Il est également possible que la présence d'Alix ne soit pas requise car la jonction ESCRT-I/ESCRT-III est assurée par ESCRT-II qui prend le relai d'Alix.

*… et back-fusion*

Pourtant des études ont aussi démontré que la modification de la quantité d'Alix a un impact sur la présence des ILV à l'intérieur des MVE (Chevallier et al., 2008; Matsuo et al., 2004). Cette fonction d'Alix, qui ne dépend pas de son interaction avec les complexes ESCRT semble dépendante de sa capacité à réguler la présence du LBPA au niveau des MVE (Matsuo et al., 2004). Il a été montré que ce lipide, en étroite association avec Alix, est indispensable au mécanisme de fusion des IVL avec la membrane du MVE, permettant ainsi un retour du contenu des IVL n'étant pas destiné à être dégradé, dans le cytosol (Bissig and Gruenberg, 2013); Ce mécanisme appelé « back fusion » est particulièrement important pour certains virus tels que le VSV (virus de la somatite vésiculaire) qui utilisent le pH acide des ILV pour y libérer leur contenu en ARN. La « back fusion » permet ensuite à l'ARN viral d'être libéré dans le cytosol où il pourra être traduit. La présence d'Alix est nécessaire à l'infection des cellules par le VSV par ce processus de « back-fusion » des ILV (Bissig et al., 2013; Le Blanc et al., 2005).

Le rôle joué par Alix dans cette « back-fusion » explique la confusion associée au rôle d'Alix dans le MVE : A priori dispensable pour la formation des ILV elles même, il en permet leur back-fusion et a donc un incidence notable sur le nombre d'ILV présent au sein des MVE.

*… et exosomes*

Enfin, un ensemble de travaux décrit l'implication d'Alix dans la biogenèse des exosomes. Les exosomes correspondent aux ILV libérées dans le milieu extracellulaire après fusion des MVE avec la membrane plasmique. Cependant, ces travaux vont dans le sens des précédents et montrent qu'Alix n'assure pas une fonction directe dans la formation des ILV elles-mêmes. Les exosomes portent différentes protéines dont la fonction au sein des exosomes est encore inconnue mais qui a permis de les caractériser. Une fois sécrétés par les cellules, ils peuvent être collectés par ultracentrifugation ou immunoprécipités avec des anticorps reconnaissant leurs

différents cargos (Alix, CD63, MHCII ou HSP70). L'inhibition de l'expression de différentes protéines des complexes ESCRT-0 et -I a des effets consistant sur la quantité d'exosomes collectés par immunoprécipitation, l'absence d'Alix provoque des effets contradictoires. En effet, en absence d'Alix, la quantité d'exosomes portant le complexe d'histocompatibilité majeur II (MHCII) est augmentée alors que celle des exosomes portant deux autres marqueurs exosomaux (CD63 et HPS70) est légèrement réduite (Colombo et al., 2013). Par ailleurs, une autre étude démontre que l'absence d'Alix affecte également la sécrétion des exosomes portant CD63 (Baietti et al., 2012). Cette dernière étude montre plus spécifiquement que le couple Alix/synténine est nécessaire à la biogenèse des exosomes porteur de CD63 sans affecter les exosomes portant HSP70. L'hypothèse selon laquelle plusieurs populations d'EMV existent pourrait concilier ces données, à priori, contradictoires (Gruenberg and Stenmark, 2004). Cependant, une autre interprétation séduisante, serait d'imaginer qu'Alix assure une fonction dans la sélection des protéines chargées dans les exosomes plutôt que dans leur biogenèse, bien qu'aucune preuve tangible n'existe à ce jour dans la littérature.

En somme, la notoriété d'Alix repose largement sur sa fonction supposée dans la régulation de la formation des ILV, par homologie aux ESCRT. Cependant, aucuns travaux n'ont pu apporter de preuve directe des mécanismes par lesquels Alix assurerait une telle fonction (Figure 33).

#### 2.1.2.2. Cytocinèse

La cytocinèse est l'étape terminale de la division cellulaire aboutissant à l'abscission du pont membranaire reliant les deux cellules filles (Figure 33). Les premiers acteurs de la famille ESCRT à avoir été montrés comme requis pour la cytocinèse sont Alix et TSG-101 (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007). Elles sont recrutées au niveau du site d'abscission par la présence de CEP55 avec qui elles interagissent directement. Ces deux protéines permettent le recrutement du complexe ESCRT-III et particulièrement de CHMP4C dont la fonction est indispensable pour l'étape d'abscission séparant les deux cellules filles (Carlton et al., 2008)(Figure 33). CHMP4C, ainsi recrutée, est capable de former des filaments au niveau du pont de cytocinèse aboutissant à la scission de celui-ci (Guizetti et al., 2011). Le désassemblage des ESCRT-III est assuré par Vps4 dont l'arrivée au pont coïncide avec son abscission (Elia et al.,

2011). Une récente étude a démontré pour la première fois la fonction physiologique d'Alix dans la cytocinèse *in vivo* chez la drosophile. La déplétion totale d'Alix provoque un retard dans la cytocinèse des cellules germinales aboutissant à la formation d'un syncytium au sein duquel les cellules restent interconnectées par un pont membranaire (Eikenes et al., 2015).

#### 2.1.2.3. Bourgeonnement viral

De manière intéressante, Alix, TSG-101, CHMP4 et Vps4 sont également requis pour le bourgeonnement des virus enveloppés à partir de la membrane plasmique. Les virus à ARN ont la capacité de détourner la fonction des machineries cellulaires de leurs cellules hôtes afin de répliquer leur matériel génétique et les protéines nécessaires à leur multiplication. Après assemblage, les virions comme ceux du VIH par exemple, piratent la machinerie ESCRT pour sortir de la cellule hôte (von Schwedler et al., 2003). Les protéines du complexe ESCRT-III sont recrutées au niveau du site de bourgeonnement viral par la protéine virale GAG qui peut directement interagir avec Alix et TSG-101 (Garrus et al., 2001) (Strack et al., 2003b)(Figure 33). De manière similaire à la cytocinèse, la présence de TSG101 et d'Alix est nécessaire au relargage des virions (Carlton et al., 2008; Carlton and Martin-Serrano, 2007). Le rôle d'Alix a également été démontré dans le relargage des EIAV pour lequel l'arrivée séquentielle d'Alix, de CHMP4B et C puis de Vps4 est également essentielle au relargage de ce virion (Jouvenet et al., 2011).
A ces trois fonctions, qui ont permis de considérer les ESCRT comme une machinerie spécialisée dans la scission membranaire, s'ajoute une toute dernière fonction découverte récemment : la réparation membranaire.

#### 2.1.2.4. Réparation membranaire

La capacité des cellules à réparer leur membrane repose sur deux mécanismes possibles faisant appel au système endosomal. Les lysosomes peuvent fusionner avec la membrane abimée permettant de combler le «trou » laissé par la blessure, alternativement, l'endocytose de morceaux de membranes endommagés permet de réduire la taille de la blessure jusqu'à la faire disparaître (Andrews et al., 2014). Récemment, une toute nouvelle voie de réparation membranaire indépendante des

endosomes a été mise en évidence. Il a été montré que certains composants du complexe ESCRT sont recrutés rapidement à la membrane après l'induction d'une blessure, de manière complètement indépendante des endosomes. Alors que ESCRT-0 et ESCRT-II ne semblent pas requis pour ce processus, TSG-101, CHMP4, CHMP3, CHMP2, Vps4 et Alix sont recrutés au niveau de la blessure par un mécanisme dépendant de l'entrée de calcium (Jimenez et al., 2014). Alix est recrutée dans les premières secondes après l'induction de la blessure, bien avant CHMP4 suivi par Vps4. De plus, il a été montré que le recrutement d'Alix à la membrane était dépendant de la présence d'Alg2, le premier partenaire d'Alix capable de lier le calcium (Scheffer et al., 2014)

. Le mécanisme par lequel cette machinerie permet une réparation de la membrane n'a pas encore été décrit en détail. Cependant, il est assez aisé d'imaginer que CHMP4 puisse se polymériser au niveau de la blessure pour rapprocher les deux morceaux de membranes blessées et ainsi, les expulser de la cellule (Figure 33).

| | Formation MVB | Cytocinèse | Bourgeonnement viral | Réparation membranaire |
|---|---|---|---|---|
| ESCRT-0 | ✓ | ✗ | ✗ | ✗ |
| ESCRT-I | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| ESCRT-II | ✓ | ? | ✗ | ? |
| ESCRT-III | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Vps4 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Alix | ✗ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Références | 1-2-3 | 4-5-6 | 7-8 | 9-10 |

**Tableau6. Implication des sous-unités du complexe ESCRT et des protéines accessoires dans les différentes fonctions cellulaires.**

✗ : non impliqué ; ✓ : impliqué

Références : 1 : Baldys and Raymond, 2009. 2 : Luyet et al., 2008. 3 : Cabezas et al., 2005. 4 : Carlton and Martin-Serrano, 2007. 5 : Morita et al., 2007. 6 : Elia et al., 2011. 7 : Langelier et al., 2006. 8 : Carlton et al., 2007. 9 : Jimenez et al., 2014. 10 : Scheffer et al., 2014.

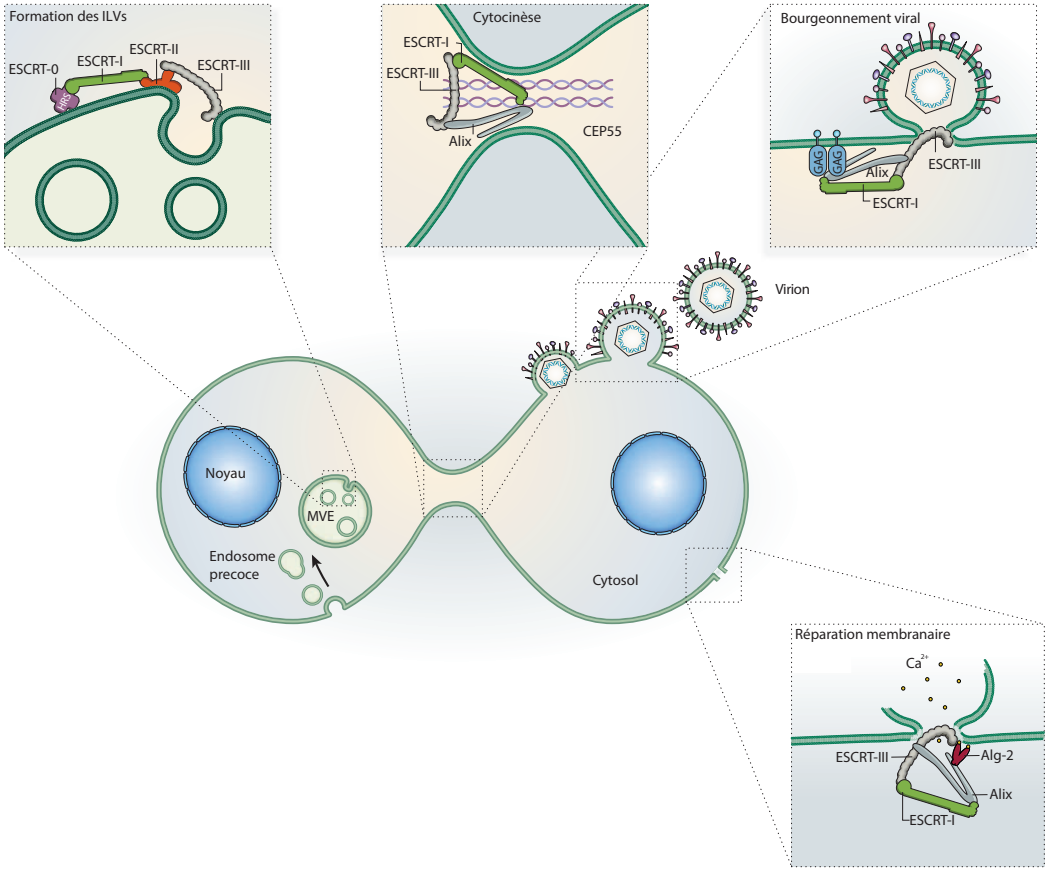



**Figure 33. La machinerie ESCRT : un mécanisme pour plusieurs fonctions.**
Schéma mettant en évidence les quatre processus impliquant la déformation de la membrane en topologie inversée par les protéines ESCRT : La formation des ILV (A), la cytocinèse (B), le bourgeonnement viral (C), la réparation membranaire (D).
Adapté de (Raiborg and Stenmark, 2009).

## 2.2. Alix induit la mort cellulaire programmée

Initialement, Alix a été découverte en tant que partenaire de la protéine Alg-2, impliquée dans l'apoptose de manière calcium dépendante. L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée particulièrement importante au cours du développement. Ce processus met en jeu différentes protéases, les caspases qui ont pour fonction d'induire la mort de la cellule. Deux voies principales d'apoptose existent : La voie intrinsèque mitochondriale et la voie extrinsèque déclenchée par des récepteurs membranaires (Figure 34). Les premiers travaux ont été réalisés dans un modèle d'induction de l'apoptose par irradiation aux UV dans les astrocytes. Ils ont mis en évidence un rôle de d'Alix et de son interaction avec CIN85 dans ce processus (Chen et al., 2000). Depuis, des expériences menées au laboratoire ont démontré l'implication d'Alix dans l'induction des deux voies apoptotiques. Tout d'abord, une augmentation l'expression d'Alix endogène a été observée *in vivo* lors de traitements induisant la mort au niveau de l'hippocampe et du striatum (Blum et al., 2004) (Hemming et al., 2004). De plus, notre équipe a montré que la simple surexpression d'Alix suffisait à induire la mort de neurones granulaires de cervelet en culture mais également les cellules neuroépithéliales du tube neural chez le poulet *in vivo*. En revanche, la surexpression du mutant d'Alix incapable d'interagit avec Alg2 n'induit plus aucune apoptose dans ces deux modèles (Mahul-Mellier et al., 2006; Trioulier et al., 2004). Par la suite, les deux voies intrinsèques et extrinsèques ont été étudiées démontrant la capacité d'Alix à induire l'apoptose via l'activation de la caspase 9 et de la caspase 8 (Mahul-Mellier et al., 2008; Strappazzon et al., 2010). Concernant cette dernière, la mort induite par le TNF et son récepteur le TNFR-1 a été étudiée. La présence du TNF extracellulaire déclenche l'internalisation du complexe TNF/TNFR1 dans des endosomes dits de « signalisation » créant ainsi une plateforme d'activation la caspase 8 (Schneider-Brachert et al., 2004). Des expériences de co-immunoprécipitations ont permis de démontrer qu'Alix et Alg2 peuvent interagir avec la caspase 8 et que ce complexe est associé au TNFR1 au niveau des endosomes de signalisation. La encore, la présence d'un mutant d'interaction Alix-Alg2 ne permet plus l'induction de l'apoptose par le TNFR1 activé. Enfin, la surexpression d'une forme tronquée d'Alix composée de la partie C-terminale dépourvue de ses sites d'interaction avec TSG-101 et CHMP4 a un effet dominant négatif puisqu'il est capable de bloquer l'apoptose développementale

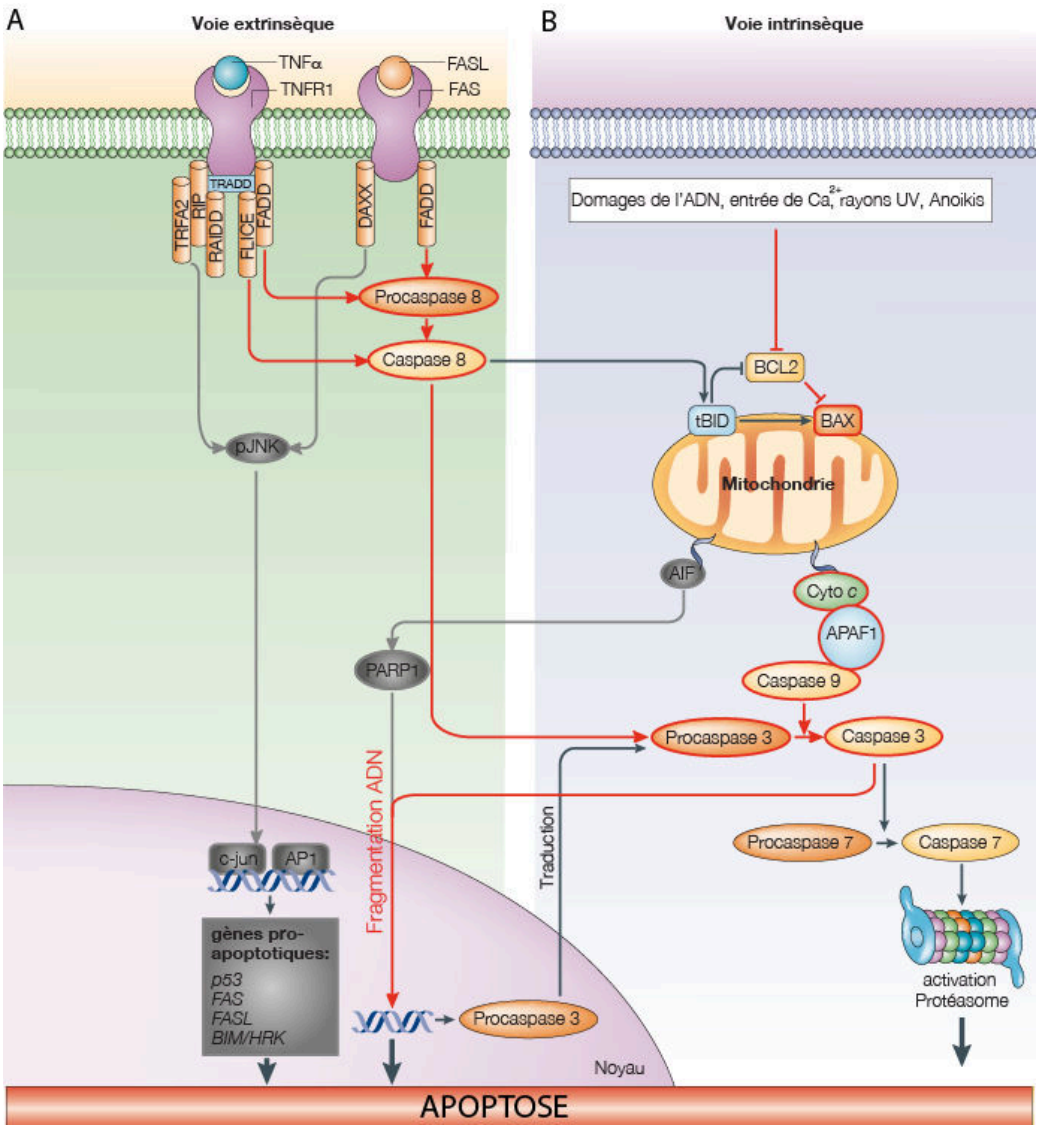



**Figure 34. Voies intrinsèque et extrinsèque de déclenchement de l'apoptose.**
Les voies de signalisation principales sont indiquées par des flèches rouges.
A. La voie extrinsèque est déclenchée par l'activation de récepteurs de morts (TNFR1 ou FAS) qui induisent une cascade de signalisation déclenchant principalement l'activation de la **caspase 8**, qui peut directement activer la caspase 3. Cette caspase effectrice aboutit directement à l'apoptose par fragmentation de l'ADN et augmentation de l'activité du protéasome. La voie intrinsèque peut
B. La voie intrinsèque ou mitochondriale est déclenchée par des facteurs intracellulaires. Le relargage de cytochrome c de la mitochondrie active la **caspase 9** qui va également aboutir à l'activation de la caspase 3.
Il existe une communication entre la voie extrinsèque et intrinsèque médiée par BID (BH3-Interacting domain Death gonist) qui, activé par la caspase 8 se transloque dans la membrane mitochondriale pour induire la sortie cytochrome c.
Les deux voies peuvent également entrainer l'apoptose par une voie caspase indépendante via l'activation de gènes pro-apoptotiques ou par la libération d'AIF permettant directement la fragmentation de l'ADN (flèches grise). Adapté de (Benn and Woolf, 2004; Vitriol and Zheng, 2012).

naturelle dans le tube neural de poulet (Mahul-Mellier et al., 2006). Ces résultats démontrent, pour la première fois, qu'Alix doit également interagir avec les protéines ESCRT afin d'assurer sa fonction apoptotique et suggèrent alors que ces deux protéines pourraient être nécessaires au recrutement d'Alix sur les endosomes de signalisation afin de former le complexe apoptotique Alix-Alg2-Caspase8-TNFR1.

## 2.3. Alix est régulée par phosphorylation

Alix possède plusieurs sites de phosphorylations notamment par les kinases Src et Fyn qui ont la capacité de moduler l'interaction d'Alix avec ses différents partenaires. La fixation de Src sur la tyrosine 319 d'Alix permet sa phosphorylation et va ainsi favoriser son interaction avec CHMP4 mais réduire sa capacité à lier CIN85 (Dejournett et al., 2007; Schmidt et al., 2005; Zhou et al., 2009). L'interaction Alix/CIN85 et la régulation de cette interaction par Src ont été mises en lumière pour plusieurs fonctions telle que l'adhésion cellulaire et la régulation de l'endocytose de récepteurs membranaires.

### 2.3.1. Adhésion cellulaire

Il a été montré que l'interaction Alix/CIN85 inhibait l'adhésion de cellules en culture et que cet effet était assuré par l'inhibition de PYK-2, une protéine kinase importante pour la mise en place des adhésions focales (Schmidt et al., 2003). Les adhésions focales sont formées de macro-complexes protéiques au niveau de la membrane plasmique comprenant le cytosquelette d'actine, les protéines régulatrices de l'actine et les intégrines permettant d'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. La dynamique de ces adhésions focales est régulée par la famille des FAK (Focal Adhesion Kinase) dont PYK-2 fait partie. Alix/CIN85 forment un complexe avec PYK-2, diminuant sa phosphorylation et par conséquent son activation. Cette inhibition de PYK-2 aboutissant à la réduction de l'adhésion des cellules est levée lorsqu'Alix perd sa capacité à interagir avec CIN85. De plus, des expériences de biochimie montrent un enrichissement d'Alix dans une fraction insoluble aux détergents en association avec les protéines du cytosquelette y compris la F-actine (Schmidt et al., 2003). Alix est d'ailleurs un interacteur direct de la F-actine et de certaines ABP (cortactine et $\alpha$-actinine) (Pan et al., 2006). Par la suite, les même auteurs ont montré que la phosphorylation d'Alix par Src entraine sa dissociation de CIN85, et du cytosquelette, ainsi qu'une augmentation de

l'adhésion cellulaire (Schmidt et al., 2005). Ces résultats laissent supposer qu'Alix est un régulateur de l'adhésion par sa capacité à organiser les adhésions focales en faisant un lien entre le cytosquelette d'actine et les protéines kinases. Par ailleurs, l'homologue humain d'Alix, Hp95, est capable de réduire le pouvoir tumoral des cellules HeLa. Il a été montré que la surexpression d'Alix suffisait à induire l'anoikis de ces cellules, une mort induite par détachement des cellules de la matrice extracellulaire (Wu Y., 2002). Aucun mécanisme n'existe à ce jour pour expliquer le rôle de Hp95, il serait possible que les capacités d'Alix à réguler l'adhésion cellulaire et l'apoptose soient à l'origine de cette fonction dans la réduction du pouvoir tumoral.

### 2.3.2. Endocytose

Enfin, un processus cellulaire important impliquant Alix, et son interaction avec CIN85, est l'endocytose de récepteurs membranaires tels que l'EGFR. Le rôle de CIN85 dans l'endocytose de l'EGFR a bien été caractérisé : CIN85 forme un complexe avec les endophilines et Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) qui interagit avec l'EGFR activé. L'association du complexe CIN85-Endophilines-Cbl permet l'internalisation du récepteur activé (Thien and Langdon, 2001). Le rôle d'Alix dans ce complexe a été étudié dans les années 2000, où il a été montré que la présence d'Alix augmente l'association de l'endophiline et de CIN85 avec l'EGFR tout en inhibant Cbl. En revanche, la déstabilisation du complexe CIN85-Alix par l'hyperphophorylation d'Alix par Src lève l'inhibition portée sur Cbl et déclenche l'endocytose du récepteur (Schmidt et al., 2004). On pourrait alors imaginer qu'Alix bloque temporairement l'internalisation du récepteur le temps de mettre en place toute la machinerie nécessaire à son endocytose. Src pourrait être un potentiel régulateur de cette interaction en phosphorylant Alix, il déstabilise son interaction avec CIN85/Endophiline et permet donc l'internalisation du récepteur (Figure 35). Cette hypothèse est appuyée par les travaux du laboratoire ayant montré que la forme tronquée C-terminale d'Alix forme avec l'endophiline des structures tubulo-vésiculaires associées avec la membrane plasmique (Chatellard-Causse et al., 2002). Cette forme tronquée d'Alix ne pouvant plus être régulée par Src, il est possible d'imaginer qu'elle soit constitutivement associée à un complexe

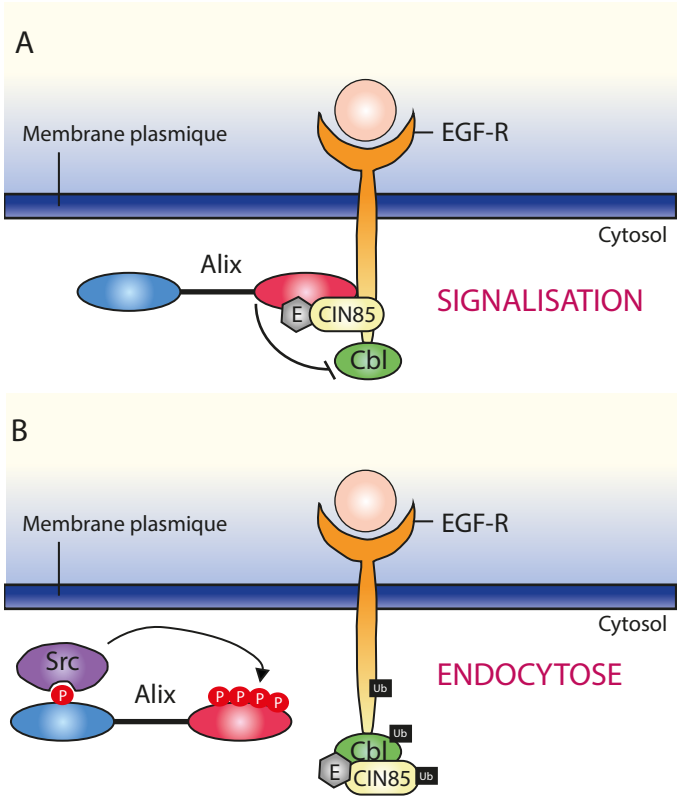



**Figure 35. Modèle de la fonction d'Alix dans l'endocytose du récepteur à l'EGF.**
A) Alix séquestre CIN85 et l'endophiline au niveau de l'EGF-R en inhibant Cbl. Le récepteur induit la signalisation médiée par la fixation de son ligand.
B) Src permet l'internalisation du récepteur. En phosphorylant Alix, il déstabilise son interaction avec CIN85 et donc avec l'EGF-R. Le complexe CIN85/Endophiline peut alors activer Cbl qui induit l'ubiquitination et l'internalisation du récepteur. E : endophiline, P : phosphorylation, Ub : Ubiquitine. Adapté de (Odorizzi, 2006).

membranaire bloquant les phénomènes d'internalisation, même si la perte d'interaction avec les autres partenaires d'Alix peut être également à l'origine de ce phénomène.

Cette introduction met en évidence les multiples fonctions assurées par Alix pour lesquelles, peu d'études ont réussi à mettre en lumière le ou les mécanismes moléculaires sous-jacents. L'existence d'un seul et même mécanisme moléculaire semble peu probable compte tenu du large spectre des processus cellulaires impliqués. Cependant, l'utilisation de formes tronquées d'Alix ou l'inhibition incomplète de son expression apporte des artéfacts compliquant l'interprétation des observations. Si bien qu'aujourd'hui encore, aucun modèle clair n'a pu être établi sur le rôle physiologique de la protéine Alix.

# III. But de l'étude

Alix, qui a été découverte en 1999 en tant qu'interacteur majeur d'Alg2, assure une fonction cruciale dans le contrôle de l'apoptose déclenchée par les récepteurs de morts comme le TNFR1 *in vivo* et *in vitro*. Cette fonction repose sur la capacité d'Alix à former un complexe d'activation endosomal entre le récepteur de mort, Alg-2 et les protéines ESCRT. Depuis, on a découvert que ces complexes, initialement impliquées dans la régulation de la voie endosomale, font également intervenir Alix dans des fonctions variées telles que la cytocinèse, le bourgeonnement des virus et la réparation membranaire. A côté de toutes ces fonctions, Alix est également impliquée dans le contrôle du devenir des vésicules intraluminales, l'adhésion cellulaire et dans l'endocytose des récepteurs membranaires.
Toutes ces fonctions sont systématiquement associées à des remodelages des membranes plasmiques et endosomales. Alix se présente donc comme un candidat idéal pour l'étude de la régulation des remodelages membranaires nécessaires à toutes les fonctions cellulaires.

Les membranes biologiques sont essentielles à l'homéostasie cellulaire : Elles assurent la communication avec l'environnement extérieur, les mouvements cellulaires et la compartimentalisation subcellulaire chez les eucaryotes. Toutes ces propriétés des membranes permettent l'intégration régulée de signaux extracellulaires. Les membranes internes peuvent par exemple réguler l'exocytose de protéines secrétées, la polarisation des cellules en migration ou encore l'endocytose et la dégradation de récepteurs membranaires. Bien entendu, le remodelage fonctionnel et morphologique de ces membranes conditionne toutes ces fonctions.
De toutes les cellules du règne animal, les neurones sont incontestablement celles qui poussent le remodelage de leur membrane au point le plus extrême. Les neurones se développent en émettant des prolongements membranaires ramifiés des plus complexes afin d'intégrer et de transmettre un message nerveux, à la base de la communication neuronale. Les perturbations les plus infimes des membranes neuronales peuvent conduire au développement de pathologies conduisant irrémédiablement à la désorganisation et à la destruction du système nerveux.

Afin de mieux comprendre la fonction physiologique d'Alix, le laboratoire a développé une souris knock-out pour cette protéine. Ces souris ont été obtenues par insertion de sites LoxP de part et d'autre de l'exon 2 du gène *alix*. Le croisement des souris « Floxées » avec des souris exprimant la recombinase cre sous différents promoteurs nous a permis d'obtenir deux lignées de souris. La première résulte d'un croisement avec des souris exprimant la recombinase cre sous le promoteur de l'actine qui aboutit à une déplétion totale de la protéine Alix. La deuxième a permis une déplétion d'Alix restreinte au cerveau par croisement avec des souris exprimant la cre sous le promoteur de Nestine. Ces souris nous ont permis de développer différents modèles nécessaires à l'étude de la fonction physiologique d'Alix. L'utilisation de fibroblastes embryonnaires (MEF pour mouse embryonic fibroblasts) issus de souris Alix ko nous a permis d'étudier précisément les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant les fonctions de cette protéine. De plus l'étude du phénotype globale et au sein du système nerveux central de la souris ko Alix nous offre la possibilité de comprendre les conséquences physiologiques associées à l'absence d'Alix.

Ce projet de thèse s'articule donc autour de trois grandes questions :

- **Alix assure-t-elle réellement un contrôle de la voie endosomale ?**
  - Endocytose ou dégradation ?
  - Quels sont les partenaires impliqués ?

- **Alix est-elle spécifiquement impliquée dans le développement du système nerveux central ?**
  - Développement embryonnaire ou post-natal ?
  - Mécanismes moléculaires impliqués ?

- **Alix requiert-elle les ESCRT pour la régulation de la plasticité synaptique adulte ?**
  - CHMPs et Alix dans le remodelage des membranes synaptiques ?
  - Régulation des fonctions pré- ou post-synaptiques ?

# RESULTATS

# 1. Rôle d'Alix dans la régulation des voies d'endocytose indépendantes de la clathrine

Les résultats de cette partie sont présentés sous la forme d'un article en révision à EMBO report que je signe en deuxième auteur. Ma contribution personnelle a concerné les expériences sur les conséquences physiologiques de l'altération des voies indépendantes de la clathrine dans les MEF Alix ko, ainsi que les expériences de vidéo-microscopie. L'article en révision est présenté en l'état précédé du contexte dans lequel cet article s'intègre à mes travaux de thèse.

## 1.1. Contexte de l'étude

Alix est une protéine cytoplasmique interagissant avec de nombreux partenaires, comprenant CHMP4 et TSG-101 des complexes ESCRT (Strack et al., 2003b). Les complexes ESCRT sont de fins régulateurs de la voie endosomale, cependant aucun lien évident n'a pu être établi entre la fonction des ESCRT et d'Alix dans cette régulation.
Alix forme également un complexe avec les protéines CIN85 et les endophilines A qui sont impliquées dans la régulation de la signalisation et l'endocytose de plusieurs récepteurs, incluant le récepteur à l'EGF (Chatellard-Causse et al., 2002; Chen et al., 2000; Schmidt et al., 2004). L'endocytose est un processus qui repose sur la déformation de la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule. Ce processus abouti à la formation de vésicules d'endocytose contenant des protéines membranaires et extracellulaires. L'endocytose la mieux caractérisée repose sur l'intervention de la clathrine pour la déformation de la membrane (CME pour clathrin mediated endocytosis), cependant de nouvelles voies indépendantes de la clathrine (CIE pour Clathrin independent endocytosis) ont été découvertes. De façon intéressante, de nouvelles voies CIE impliquant les endophilines A on été caractérisées dans les neurone et les fibroblastes (Boucrot et al., 2014) (Kononenko et al., 2014).

Cet article décrit la fonction d'Alix dans l'endocytose et les conséquences de l'absence d'Alix sur l'ensemble de la voie endosomale dans des fibroblastes embryonnaires issus de souris dépourvues d'Alix (Alix ko).

Premièrement, les résultats de cet article montre une absence d'altération des compartiments de la voie endosomale. En revanche, l'absence d'Alix induit des défauts localisés au niveau de la membrane plasmique. Un faible ralentissement de la dégradation du récepteur à l'EGF par les cellules Alix ko à tout de même été observé (Figure 1). Cette réduction de la dégradation est corrélée avec un défaut d'internalisation du récepteur à l'EGF. De plus, l'étude du trafic de BSA-gold en microscopie électronique révèle que seule l'étape d'internalisation de la BSA est réduite par l'absence d'Alix sans que la suite du trafic endosomal ne soit affectée (Figure 2). L'étude approfondie de l'internalisation du récepteur à l'EGF révèle que seule l'internalisation clathrine-indépendante du récepteur est affecté en absence d'Alix. De manière similaire, l'endocytose de protéines spécifiques de l'une ou l'autre des deux voies, telles que le récepteur à l'interleukine 2, l'ancre GPI ou le récepteur à la transferrine, révèlent un défaut général de la voie clathrine indépendante dans les fibroblastes Alix ko, laissant la voie clathrine dépendante intacte (Figure 3). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de l'endocytose dépendante et indépendante clathrine de la chaine B de la toxine du Choléra (CTxB) en présence d'inhibiteurs spécifiques de chacune des deux voies (Figure 4). La suite de cet article cherche à mieux caractériser les mécanismes moléculaires par la recherche des partenaires d'Alix dans l'internalisation de la CTxB. Premièrement, un recrutement d'Alix et de l'endophiline est observable au niveau des clusters d'internalisation de la CTxB (Figure 5). De plus, l'expression de mutant d'interaction d'Alix avec Tsg-101, CIN85 et endophilines dans les cellules Alix ko démontre que cette fonction d'Alix nécessite uniquement le complexe CIN85/endophilines (Figure 6).

Enfin, au niveau physiologique, la perturbation de ces voies clathrine-indépendantes a été associée à une altération de la signalisation du récepteur à l'interleukine 2 et de la migration cellulaire, deux processus cellulaires nécessitant l'endocytose clathrine-indépendante.

En conclusion, cette étude démontre, pour la première fois, l'implication d'Alix et des endophilines dans l'endocytose indépendante de la clathrine. La spécificité d'Alix dans cette voie fait des souris Alix ko un modèle parfait pour étudier le rôle de l'endocytose indépendante de la clathrine *in vivo*

## 1.2. Article 1 – « ALG-2 Interacting Protein X (Alix) is essential for clathrin-independent endocytosis »

Vincent Mercier[1,2], Marine Laporte[1,2], Olivier Destaing[3,4,5], Béatrice Blot[1,2], Cédric M. Blouin[6,7,8], Karin Pernet-Gallay[1,2], Christine Chatellard-Causse[1,2], Yasmina Saoudi[1,2], Corinne Albiges-Rizo[3,4,5], Christophe Lamaze[6,7,8], Sandrine Fraboulet[1,2], Anne Petiot[1,2] and Rémy Sadoul[1,2,*]

**EMBO Report**

En revision

1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 836, F-38042 Grenoble, France

2) Université Grenoble Alpes, Institut des Neurosciences, F-38042 Grenoble, France

3) INSERM IAB, Unité 823, F-38000 Grenoble, France

4) Université Grenoble Alpes, IAB, F-38000 Grenoble, France

5) CHU de Grenoble, IAB, F-38000 Grenoble, France

6) Institut Curie, PSL Research University, Membrane Dynamics and Mechanics of Intracellular Signaling Laboratory, Paris, France

7) INSERM, U1143, Paris, France

8) CNRS, UMR 3666, Paris, France

**Correspondence to:**
Rémy Sadoul:
Grenoble Institut des Neurosciences,
Inserm U836, Team 2: Neurodegeneration and Plasticity
Bâtiment E. Safra-Site Santé
Chemin Fortuné Ferrini
38042 Grenoble, France.

Tel: +33 4 56 52 05 44
Fax: +33 4 56 52 05 54
remy.sadoul@ujf-grenoble.fr

**Condensed Title:** Alix and endocytosis.

## Abstract

The molecular mechanisms and the biological functions of clathrin independent endocytosis (CIE) remain largely elusive. Alix (ALG-2 interacting protein X), has been assigned roles in membrane deformation and fission both in endosomes and at the plasma membrane. Using Alix ko cells, we show for the first time that Alix regulates fluid phase endocytosis and internalization of cargoes entering cells via CIE, but has no apparent effect on clathrin mediated endocytosis or downstream endosomal trafficking. We show that Alix acts with endophilin-A to promote CIE of cholera toxin and to regulate cell migration. We also found that Alix is required for fast endocytosis and downstream signaling of the interleukin-2 receptor giving a first indication that CIE is necessary for activation of at least some surface receptors. In addition to characterizing a new function for Alix, our results highlight Alix ko cells as a unique tool to unravel the biological consequences of CIE.

# Introduction

The plasma membrane of all eukaryotic cells undergoes constant renewal through repeated cycles of endocytosis and exocytosis. During endocytosis, cell surface proteins and lipids are internalized forming vesicular carriers which then merge with early endosomes, a process central to the regulation of nutrient uptake, cell surface receptor signaling, plasma membrane remodeling, cellular mobility and synaptic vesicle recycling (Doherty and McMahon, 2009). Most of these processes rely on clathrin-mediated endocytosis (CME) based on the clathrin machinery for shaping endocytic vesicles. However alternative pathways, collectively referred to as clathrin-independent endocytosis (CIE), also occur at the plasma membrane, although the molecular mechanisms leading to membrane bending and fission, as well as the biological significance of these pathways have yet to be clarified (Mayor et al., 2014).

An important advance in defining the molecular players involved in CIE came from two recent reports demonstrating that endophilin-A controls CIE of activated receptors including those for epidermal growth factor (EGF) and interleukin-2 (IL2), and that this pathway is hijacked by shiga- or cholera bacterial toxins (Boucrot et al., 2014; Renard et al., 2014). The three endophilin-A isoforms (A1, A2, A3) contain a SH3 domain binding to both dynamin and synaptojanin (Ringstad et al., 1997) and a N-BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) domain capable of sensing and generating membrane curvature (Peter et al., 2004). At synapses, Endophilins-A are known to be involved in both CME (Gad et al., 2000; Guichet et al., 2002; Milosevic et al., 2011; Schuske et al., 2003; Verstreken et al., 2002) and CIE (Kononenko et al., 2014; Llobet et al., 2011).

We have shown previously that besides dynamin and synaptojanin, a major interacting partner of endophilin-A is Alix (ALG-2-interacting protein X), first identified through its calcium-dependent binding to the penta-EF-hand protein ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) (Chatellard-Causse et al., 2002; Missotten et al., 1999). Alix is a 95 kD cytoplasmic protein with multiple interacting partners. The N-terminal Bro1-like domain (Fisher et al., 2007; Kim et al., 2005), binds the endosome-resident lipid, lysobisphosphatidic acid (LBPA) (Bissig et al., 2013; Matsuo et al., 2004) and the CHMP4B component of the endosomal sorting complex III required for transport (ESCRT-III) (McCullough et al., 2008), while the C-terminal long proline-rich domain (PRD) binds endophilin-A (Chatellard-Causse et al., 2002), and also contains distinct interaction sites for ALG-2, the Tsg-101 component of ESCRT-I, and Cbl Interacting protein-85 (CIN85) (Sadoul, 2006). The central region of Alix consists of a V-shaped domain composed of two triple-helical bundles which mediate protein dimerization (Pires et al., 2009). Alix is ubiquitously expressed and has been involved in numerous biological processes including programmed

neuronal death (Mahul-Mellier et al., 2006; Mahul-Mellier et al., 2008; Trioulier et al., 2004), virus egress (Fisher et al., 2007; Strack et al., 2003a), cytokinesis (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Eikenes et al., 2015; Morita et al., 2007), cell spreading (Cabezas et al., 2005; Pan et al., 2008) and membrane repair (Jimenez et al., 2014; Scheffer et al., 2014). Until today, most of these activities have been linked with Alix capacity to bind and recruit proteins of the ESCRT complexes involved in membrane bending and fission. These complexes act in outward vesiculation, thus forming vesicles in endosomes and at the cell surface (Henne et al., 2013; Ren and Hurley, 2011; Rusten et al., 2012; Sadoul, 2006), whereas other Alix interactors, CD2AP/CIN85 and endophilin-A, act in the opposite way to promote membrane invaginations during ligand-dependent receptor endocytosis (Chen et al., 2000; Lynch et al., 2003; Petrelli et al., 2002; Soubeyran et al., 2002). The function of Alix binding to these latter proteins remains unknown.

Here, we have used mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from Alix homozygous knock-out mice (Alix ko) to explore further the role of Alix in the endosomal pathway. We found that fluid phase endocytosis and internalization of several ligands were impaired in Alix ko cells, even though endosomal morphology and downstream intracellular trafficking were apparently normal. Interestingly, impaired endocytosis affected only CIE but not CME. We also demonstrate that the function of Alix in CIE is strictly dependent on its capacity to bind to endophilin-A. Finally, we provide the first demonstration that cargo endocytosis through the Alix/endophilin-A pathway is required for cell migration and IL2R signaling.

Keywords: endophilin-A, clathrin-independent endocytosis, Alix knock-out, PDCD6IP, IL2, MEF.

## Results

### Loss of Alix delays EGFR degradation.

To investigate the role of Alix in endocytosis, we used MEFs derived from Alix ko mice obtained in our laboratory, in which expression of Alix is completely abolished (Fig 1a). These mice will be more fully described elsewhere. We first tested the effect of the absence of Alix on the downregulation of activated EGFR, which requires ESCRTs for sorting inside multivesicular bodies (MVBs) and is degraded in the lysosomes (Tomas et al., 2014). In wild type (wt) MEFs deprived of serum, addition of 100 ng/ml EGF led to a total loss of EGFR within 6 h after EGF addition, and as expected this loss was inhibited by bafilomycin, a reagent known to block lysosome acidification and degradative activity (Fig.1a). In contrast, in Alix ko cells, a significant delay in EGFR degradation was already apparent as early as 30 min after EGF addition, and was maintained for at least 6 h after the beginning of incubation (Fig. 1a, b).

A possible explanation for this delay in EGFR degradation could be through perturbation of endosomal function in the absence of Alix (Cabezas et al., 2005; Matsuo et al., 2004). However, the distribution and morphology of the early endosomes, recycling endosomes, MVBs and late endosomes/lysosomes, as judged by analysis respectively of the EEA1-, Rab 11-, LBPA- or Lamp1-positive compartments, appeared unaffected in Alix ko cells (Fig. S1).

### Loss of Alix affects fluid phase endocytosis but not trafficking through endosomes.

Using electron microscopy (Fig. S2a-f), we have been able to follow the uptake and endosomal trafficking of 6 nm BSA-gold particles in MEFs. The number of BSA-gold particles was estimated in endocytic structures, which we grouped into five categories according to the classification of Möbius et al. (Mobius et al., 2003), from type 1 structures corresponding to plasma membrane invaginations through to type 5 structures corresponding to lysosomes (see Fig. 2a).

To detect possible impairments due to the lack of Alix expression, wt and Alix ko MEFs were incubated with BSA-gold particles for 10 min and then washed and "chased" for a further 20 or 50 min (Fig 2a). In wt cells, after 10 min incubation the majority of particles were already found in closed vesicles and early endosomes (type 2 and 3) (Fig. 2a). After 20 min chase, the particles were mainly detected in MVBs (type 4) and after 50 min, a significant proportion was seen in late endosomes/lysosomes (type 5), reflecting the expected endosomal trafficking of the BSA-gold particles. In Alix ko cells, a significant delay in trafficking to early endosomes was seen as early as at 10 min with around 40 % fewer particles found in this compartment (type 3). The delay in trafficking was maintained throughout the 20 and 50 min chase periods, as revealed by fewer particles in type 4 and type 5 compartments, respectively (Fig. 2a). Importantly, as shown

in Fig S2, we did not detect any gross morphological abnormalities of endosomes and lysosomes in Alix ko cells. The relative numbers of type 3, 4 and 5 structures were equivalent between wt and Alix ko cells (Fig. S2g) and the mean diameter of MVBs and lysosomes was unchanged (Fig. S2h,i). The only noticeable difference between the two cell types was a small but significant decrease in the number, of intraluminal vesicles per MVB in Alix ko cells, with no detectable change in their size (Fig. S2j,k). Thus taken together, these data show that absence of Alix has a mild effect on the early steps of fluid phase endocytosis without interfering with the subsequent steps along the late endosomal pathway.

We confirmed this effect on non-selective, constitutive endocytosis by showing that uptake of fluorescent dextran was reduced by 40% in Alix ko compared to wt cells (Fig. 2b). Furthermore, endocytosis of fluorescent wheat germ agglutinin (WGA), a lectin which binds to gangliosides and most cell surface glycoproteins, was also reduced by 45% in Alix ko cells (Fig. 2c). Thus, Alix deletion affects constitutive bulk flow endocytosis.

**Clathrin-independent endocytosis is selectively disrupted in Alix ko cells.**

In view of the lack of gross endosomal abnormalities in Alix ko cells, or any obvious impairment in endosome trafficking, we reasoned that the observed delay in EGFR degradation in these cells might result from a defect in EGFR endocytosis. We found that this is indeed the case since internalization of EGFR revealed by fluorescent EGF, was significantly decreased in Alix ko MEFs stimulated with 100 ng/ml EGF. In contrast, no delay in endocytosis could be detected with 2 ng/ml EGF (Fig. 3a,b). Interestingly, it was previously shown that low concentrations of EGF trigger CME of the EGFR, whereas higher concentrations also stimulate internalization of a fraction of the receptor by CIE (Sigismund et al., 2013; Sigismund et al., 2008). Thus, these results provided an initial indication that loss of Alix may preferentially affect receptor uptake through a CIE pathway. Consistent with this conclusion, we found that uptake of fluorescent transferrin (Tf) via the Tf receptor, which is entirely clathrin-dependent, was unaffected by loss of Alix (Fig. 3a,b) whereas internalization of the β chain of the IL2R, the first physiological cargo shown to be endocytosed by CIE (Lamaze et al., 2001) was significantly attenuated (Fig. 3a,c). To pursue this further, we studied the fate of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored GFP, since GPI-anchored proteins are typically endocytosed by CIE pathways (Kirkham and Parton, 2005). Using GPI-GFP expressing MEF cells, we found that antibody-induced internalization of GPI-GFP was reduced by 60 % in Alix ko cells compared to wt cells, providing an additional indication that Alix deletion severely impairs CIE (Fig. 3a,c). Finally, we studied internalization of β1 chain of integrins, which is important for cell adhesion and spreading, and which occurs through both CME and CIE mechanisms (Lakshminarayan et al., 2014; Margadant et al., 2011).

Endocytosis of β1 integrins was followed using an antibody against the activated form of the protein and was found to be significantly impaired in Alix ko cells although to a lesser degree than was seen for IL2R and GPI-anchored GFP (Fig. 3a,c). Consistent with this delayed uptake of β1 integrin, we observed a 25 % increase in cell spreading of Alix ko MEFs 2 h after seeding on fibronectin (Fig. S3).

**Alix deletion affects CTxB CIE.**

The CIE pathway is known to be hijacked by toxins such as cholera toxin (CTx). The pentameric B chain of CTx (CTxB) binds to GM1 gangliosides at the plasma membrane leading to nucleation of lipid nanodomains, so-called "lipid rafts", and endocytosis of the toxin (Ewers and Helenius, 2011; Rodighiero et al., 2001). Uptake of CTxB through CIE was confirmed in wt MEFs, since pretreatment of the cells with filipin, a reagent which sequesters membrane cholesterol thereby preferentially blocking CIE, reduced uptake of the toxin by around 50% (Fig. 4a,b). Consistent with the finding that to a lesser extent CTxB can also enter cells through the CME pathway (Mayor et al., 2014), chlorpromazine treatment, which blocks CME, reduced CTxB uptake by around 25 % (Fig. 4a,b). CTxB internalization was similarly reduced in cells expressing a mutated form of Eps15 (Eps15DN) known to block CME (Benmerah et al., 1998) (Fig. 4c). Interestingly, in untreated Alix ko cells, the amount of CTxB endocytosed was reduced by around 40% compared to wt cells, similar to the level observed in wt cells treated with filipin. Furthermore, treatment of Alix ko cells with filipin had no further inhibitory effect on CTxB uptake (Fig. 4a,b). In contrast, treatment of Alix ko cells with chlorpromazine, or expression of Eps15DN, led to reduction in CTxB endocytosis similar to that seen in wt cells (Fig. 4b,c). Control experiments showed that CTxB binding to the plasma membrane of wt and Alix ko cells was similar at 4°C (Fig. S4a). All these results, taken together with the normal endocytosis of TfR in Alix ko cells (Fig. 3a,b), demonstrate that loss of Alix affects principally the CIE pathways without impairing CME.

Following internalization, CTxB is known to traffic to the Golgi (Ewers and Helenius, 2011). In both wt and Alix ko cells, after prolonged incubation the endocytosed CTxB co-localized with the Golgi marker GM130, showing that, even though delayed, trafficking of the toxin down to the Golgi occurs in the absence of Alix (Fig. S4b).

**Both Alix and endophilin-A relocalize to membrane patches containing CTxB.**

In Alix ko MEFs expressing GFP-Alix, the fluorescent signal was homogeneously distributed throughout the cytoplasm, albeit with somewhat higher local concentrations at certain regions of the plasma membrane particularly around the leading edge (Fig. 5b left panel). Live cell

imaging of Alix ko cells expressing GFP-Alix, showed that Alix was transiently recruited to discrete spots at the plasma membrane (Supplemental video 1). In cells incubated with CTxB, Alix relocalization occurred more frequently and preferentially at CTxB positive patches (Fig. 5a). Interestingly GFP-Alix recruitment followed the appearance of CTxB labelled patches and terminated with the disappearance of CTxB, suggesting that it occurs at sites of CTxB entry (arrows in Fig. 5a and Supplemental Video2). In cells incubated with CTxB at 4°C to block endocytosis, Alix was found on discrete, ~400 nm patches of the plasma membrane which in most cases were also decorated by the toxin (Fig. 5b). About 40% of the sites occupied by CTxB were also positive for GFP-Alix (Fig. 5e). Tf-TRITC incubated on MEFs at 4°C also concentrated in patches, which were smaller than CTxB positive patches and never labelled with GFP-Alix (Fig. 5c).

CTxB bound to GM1 gangliosides of the plasma membrane becomes associated with detergent resistant membrane fractions (DRMs) (Wolf et al., 2002). To investigate this further, Alix ko MEFs expressing GFP-Alix were exposed to CTxB-TRITC for 30min at 4°C, then incubated briefly with Triton-X100 to remove any cytosolic GFP-Alix. Analysis of the Triton-resistant fluorescence showed that most of the GFP-Alix had been lost, leaving behind GFP-Alix aggregates many of which were also labelled with CTxB (Fig. S4c). In contrast, in the same cells exposed to transferrin (Tf-TRITC), which does not localize into DRMs, extraction with Triton-X100 completely eliminated the Tf-TRITC labelling as well as most of the GFP-Alix (Fig. S4c). Thus, our results show that Alix is recruited to the detergent resistant lipid microdomains which are formed at the plasma membrane upon CTxB binding, and which probably correspond to the sites at which the toxin is internalized (Renard et al., 2014).

We next tested whether relocalization of Alix to CTxB-induced membrane patches requires binding to endophilin-A, which has also been shown to be recruited to these sites (Boucrot et al., 2014; Renard et al., 2014). As shown in Fig. 5d (upper panel), Myc-tagged endophilin-A2 was indeed recruited to membrane patches induced by CTxB. The recruitment of endophilin-A2 to CTxB-membrane patches occured in both wt and Alix ko cells indicating that the endophilin-A2 relocalization is not dependent on the presence of Alix (Fig. 5d,e). Nevertheless, co-expression of Myc-endophilin-A2 and GFP-Alix in Alix ko cells, showed that both proteins colocalized to the CTxB-induced patches (Fig. 5d lower panel).

Alix interacts with the SH3 domain of endophilin-A through a proline-rich domain ($P^{748}$-$P^{761}$) (Chatellard-Causse et al., 2002; Fisher et al., 2007). A mutant protein lacking this domain (AlixΔendo) was expressed in Alix ko cells, and was also found to relocalize to CTxB patches, although less strongly than wt Alix (Fig. 5e). Thus endophilin-A and Alix are both recruited

independently to plasma membrane patches formed upon CTxB binding, although the binding of Alix may be stabilized, or its recruitment to these sites facilitated by the presence of endophilin-A.

**Alix and endophilin-A co-operate in mediating CIE.**

Rescue experiments using viral transduction (Fig. S5a) showed that the impairment in CTxB CIE observed in Alix ko cells is due solely to the absence of Alix, since restoring Alix expression fully restored the capacity of Alix ko cells to internalize CTxB (Fig. 6a,b). In sharp contrast, expression of AlixΔendo was not able to rescue CTxB endocytosis by Alix ko MEFs. This result, together with the fact that deletion of the endophilin-SH3 binding site ($P^{748}$-$P^{761}$) does not impair binding to other Alix-interacting proteins (Chatellard-Causse et al., 2002; Fisher et al., 2007; Kowanetz et al., 2003; Morita et al., 2007) demonstrates that interaction between Alix and endophilin-A is necessary in order to drive CIE of CTxB (Fig. 6a,b). Alix mutants deleted from other discrete regions of the PRD necessary for binding of Tsg101 ($P^{717}$-$P^{720}$) or CIN85 ($P^{739}$-$P^{745}$) were also tested for their capacity to rescue CTxB uptake by Alix ko cells. AlixΔTsg101 but not AlixΔCin85 was able to rescue CTxB endocytosis (Fig. 6b) showing that binding of Alix to Tsg101 of ESCRT-I is not required for Alix to mediate CTxB CIE, whereas interactions with endophilins and CIN85, which have been both reported to mediate CIE (Boucrot et al., 2014) are mandatory for Alix function in this process.

To test the effect of endophilin depletion on CTxB endocytosis, the endophilin-A2 isoform expressed in fibroblasts (Giachino et al., 1997) was downregulated using an sh-containing plasmid (sh-endo-GFP) (Fig. S5c). In accordance with the findings of Renard et al. (Renard et al., 2014) and Boucrot et al. (Boucrot et al., 2014), we show that depletion of endophilin-A2 reduced CTxB endocytosis by more than 40% in wt MEFs (Fig. 6c,d). CTxB uptake was further reduced by chlorpromazine but not by filipin, suggesting that endophilin-A2 depletion blocked CIE, but not CME of CTxB (Fig. S5d). In sharp contrast to wt cells, knocking-down endophilin-A2 in Alix ko cells did not reduce CTxB uptake any further (Fig. 6c,d), demonstrating that Alix and endophilin both act in the same pathway to mediate CIE. Noteworthy, is that the level of endophilin-A2 was equivalent between Alix ko and wt MEFs, showing that the effects observed in Alix ko cells do not simply result from a lack of endophilin expression due to the absence of Alix (Fig. S5b).

CIE has been shown to be required for cell migration (Howes et al., 2010) and this has recently been confirmed in endophilin-A knock down experiments (Boucrot et al., 2014). We therefore used a wound healing assay to investigate the behaviour of the Alix ko MEFs. As shown in Fig. 7a, the migration of the Alix ko MEFs was significantly reduced compared to wt cells, while

restoration of Alix expression by viral transduction increased the velocity of Alix ko MEFs to the level seen in wt cells (Fig. 7b). In contrast, no increase in migration activity was seen when cells were transduced with AlixΔendo. The defect in migration caused by the absence of Alix therefore correlates with the ability of Alix to mediate endophilin-dependent CIE.

Given our finding that Alix is required for endocytosis of the IL2R β-chain (Fig. 3a,c), we decided to test whether Alix depletion also interferes with IL2R signaling. Binding of IL2 to its receptor activates a variety of downstream events including activation of JAK tyrosine kinases and subsequent phosphorylation of the transcription factor STAT5. We found that knocking down Alix expression in the human T cell line EBV-B, severely reduced IL2-induced STAT5 phosphorylation (Fig. 7c) demonstrating for the first time that CIE of the activated IL2 receptor is required for the downstream signaling pathway leading to JAK/STAT5 activation.

## Discussion

Much of the machinery required for endocytic internalization of molecules at the plasma membrane relies on the activity of clathrin and its associated proteins in a process known as clathrin-mediated endocytosis (CME). However, fluid phase endocytosis, internalization of certain surface receptors as well as entry of some pathogenic toxins occur through mechanisms which do not require clathrin and have been collectively designated as clathrin-independent endocyotosis (CIE). The lack of known elements common to the cell entry processes has led to the view that distinct CIE pathways exist, although an understanding of general mechanisms involved remain to be elucidated and blurs a general understanding of CIE. In this study, we have explored the role of Alix (ALG-2-interacting protein-X) in CIE. We have used MEFs obtained from the Alix homozygous knockout (Alix ko) mice recently obtained in our laboratory, and we demonstrate that Alix plays a central role in driving fluid phase endocytosis, entry of Cholera toxin and endocytosis of surface receptors known to be internalized through CIE. On the other hand, uptake of Tf via the TfR which depends solely on CME is unaffected by the absence of Alix.

Endophilin-A has recently been reported to be required for internalization of cell-surface receptors such as those for EGF and IL2 (Boucrot et al., 2014) and for entry of bacterial toxins (Renard et al., 2014). We now show that Alix acts in association with endophilin-A and CIN85 but not Tsg101 of ESCRT-I to promote CTxB endocytosis and that Alix ko cells are defective in cell migration, in accordance with a role of CIE in this process. Finally we present evidence that signaling through the IL2R is strongly impaired by Alix down-regulation, thus establishing for the first time a link between the internalization of IL2R and the activation of its downstream ligand-induced signaling function.

Our initial experiments to investigate degradation of the EGFR, which is highly dependent on its sorting into multi vesicular bodies (MVBs), led to the observation that receptor degradation was delayed in Alix ko cells. Interestingly, the only abnormal feature that we detected in endosomes of Alix ko cells was a slight decrease in the number of ILVs in MVBs, compatible with a possible regulatory role of Alix in ILV budding (Matsuo et al., 2004) or backfusion (Abrami et al., 2013; Le Blanc et al., 2005). However, our finding could also be explained by an associated defect in growth factor receptor activity, which for example in the case of EGFR, is also known to regulate the number of ILVs within MVBs (Futter et al., 1996).

Compromised EGFR endocytosis only occurred upon exposure to high concentrations of EGF (100 ng/ml), a condition known to favor CIE of the receptor (Sigismund et al., 2013; Sigismund et al., 2008). In the presence of 2 ng/ml EGF, a concentration known to activate CME exclusively,

no decrease in receptor internalization was seen in Alix ko compared to wt MEFs. Interestingly, Alix directly interacts with both endophilins and CIN85, which are known to form a complex regulating EGFR endocytosis at high EGF concentrations (Soubeyran et al., 2002). Alix was already reported to modulate the interaction between Cbl and CIN85 and thereby ubiquitination of the EGFR by Cbl (Schmidt et al., 2004), which is known to regulate entry of the receptor via CIE (Sigismund et al., 2013). More recently, Boucrot et al. (Boucrot et al., 2014) reported a requirement not only for endophilins but also for CIN85 in CIE of the EGFR. These observations are therefore consistent with the hypothesis that Alix orchestrates a "ménage à trois" together with CIN85 and endophilins to promote EGFR uptake via CIE. This complex of proteins might also be involved in CIE of other cargoes as demonstrated by our finding that CTxB CIE is highly dependent on the capacity of Alix to bind the SH3 domain of endophilin-A and of CIN85. shRNA-mediated knock-down of endophilin-A did not further reduce endocytosis of CTxB in Alix ko cells, indicating that endophilins and Alix operate in the same pathway. While both proteins were recruited independently to sites of CTxB uptake, the interaction of Alix with endophilin-A seems to favor or stabilize its recruitment to these sites. Endophilin-A binding to clathrin-independent endocytic sites can occur either through their SH3 domain (Boucrot et al., 2014) or through their BAR domains (Renard et al., 2014), which recognize concave cytoplasmic surfaces of the plasma membrane (Peter et al., 2004), thus leaving SH3 domains free to interact with Alix. Possible mechanisms for recruitment of Alix to the plasma membrane which could be independent of endophilin-A, may be through binding to ALG-2, a calcium-dependent interaction which was recently shown to mediate Alix recruitment following membrane damage (Scheffer et al., 2014). Another possible mechanism is through binding to LBPA, or more probably to a related phospholipid, since to date there is no evidence that LPBA itself is present in the plasma membrane. Following binding to LBPA in endosomal membranes, Alix changes its conformation leading to the insertion of a hydrophobic loop into the cytoplasmic leaflet of the bilayer (Bissig et al., 2013). Thus, Alix insertion into the plasma membrane could potentially contribute to generation of membrane curvature or to assembly of the CIN85/endophilin complex required for membrane deformation and scission. Curiously, Boucrot et al. (Boucrot et al., 2014) have observed that endophilin-A controls only the internalization of ligand-activated receptors, such as EGFR and IL2R, but not that of GPI–anchored receptors or fluid phase endocytosis, which we have shown to be also dependent on Alix. Further work will be required to define whether endophilin binding to Alix is also mandatory for these endocytic processes.

The variety of cargoes which are internalized by Alix-driven CIE suggests a role for non-clathrin-mediated pathways in many cellular functions. We have established a correlation

between the Alix-endophilin pathway and cell migration consistent with the previously described role of CIE in this process (Howes et al., 2010). Internalization of cell surface activated receptors is a widespread mechanism for regulating cell signaling, which can occur both at the cell surface or at the endosomal membrane. However currently, it is unclear how CIE or CME of surface-activated receptors affect the propagation of intracellular signals. In our case Alix knockdown strongly reduced STAT5 phosphorylation. The only endocytic route of IL2R is through CIE (Lamaze et al., 2001) and the absence of Alix severely impaired endocytosis of the β-chain of the receptor. Thus our results show for the first time the necessity of CIE for IL2R signaling, supporting the hypothesis that interleukin receptors need to be clustered within endosomes for signaling to occur (Gandhi et al., 2014).

The dual role of endophilins in both CIE and CME is no doubt partly responsible for previous conflicting results, and blurs our present understanding of these pathways in normal physiology, in particular in regulating cell signaling and synaptic vesicle formation, in which both processes are implicated (Kononenko et al., 2014; Watanabe et al., 2013; Watanabe et al., 2014). The lethal phenotype observed in endophilin ko mice prevents use of the endophilin deletion model for resolving this issue. On the other hand, our finding that Alix mediates only CIE, and does not affect CME, highlights the usefulness of Alix ko mice as a valuable and viable model with which to explore and understand more precisely the physiological role of CIE *in vivo.*

## Materials and methods

### Antibodies and other reagents

Antibodies used were: monoclonal and polyclonal anti-FLAG antibodies from Sigma-Aldrich, polyclonal anti-Alix from Covalab, monoclonal anti-actin and polyclonal anti-clathrin from Millipore, polyclonal antibodies against EGFR, Myc and EEA1 were from Santa Cruz, anti-GFP and anti-LAMP1 from Abcam, monoclonal anti-Rab11 and anti-GM130 from BD transduction, monoclonal anti-β1 (9EG7) was from BD pharmingen, anti-STAT5 and anti- phosphorylated STAT5 were from Cell Signaling. Monoclonal anti-LBPA (6C4) and polyclonal anti-endophilin A antibodies were generous gifts from Jean Gruenberg (Geneva, Switzerland) and Pietro De Camilli (New Haven, United States) respectively. Monoclonal anti-IL2Rβ antibody (mAb 341) was described in (Lamaze et al., 2001). Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 and Alexa 594-WGA, as well as EGF-TRITC, CTxB-TRITC, Tf-TRITC and Dextran-TRITC were from Molecular Probes. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were from Jackson Laboratories. Filipin, chlorpromazine, EGF, bafilomycin A1 were from Sigma-Aldrich. 6 nm BSA-Gold tracer was from Aurion (The Netherlands).

### DNA constructs

Flag-Alix, Flag-AlixΔP$^{748}$-P$^{761}$ (AlixΔendo), Flag-AlixΔP$^{717}$-P$^{720}$ (AlixΔTsg101), and Myc-endophilin A2 cDNAs cloned in PCI (Promega) were described previously (Chatellard-Causse et al., 2002) (Mahul-Mellier et al., 2006). Flag-Alix ΔP$^{739}$-R$^{745}$ (AlixΔCIN85) was obtained by mutagenesis (Quick change II XL mutagenesis kit, Stratagene) using wt Alix as template and the following oligos:

sens: 5'- GGCATGCAGCAGCGACCATGCCGCCTGCTAAGC-3'

antisens: 5'-GCTTAGCAGGCGGCATGGTCGCTGCTGCATGCC-3'.

GFP-Flag-Alix was obtained by subcloning Flag-Alix cDNA into a pEGFP-C vector (Clontech). The GFP-GPI construct was a generous gift from G. Van der Goot (Lausanne, Switzerland). IL2Rβ-GFP was described in (Lamaze et al., 2001). GFP-Eps15DN (GFP-EΔ95/295) described in (Benmerah et al., 1998) was a kind gift of A. Benmerah (Paris, France). The small hairpin RNA (shRNA) expression vectors were constructed as

follows: two complementary oligonucleotides were synthesised, annealed, ligated and inserted downstream of the human H1 promoter in the pSuperGFP expression vector (Oligoengine) using the BglII and HindIII restriction sites. For shRNA against mouse endophilin A2, the top strand sequence was 5′-GATCCCCGCCTTGACTTTGACTACAAGATTCAAGA GATCTTGTAGTCAAAGTCAAGGCTTTTTA -3', and the bottom strand sequence was 5′-AGCTTAAAAAGCCTTGACTTTGACTACAAGATCTCTTGAATCTTGTAGTCAAAGTCAAGGCGG G-3′. As a negative control, a scrambled shRNA sequence was cloned into the same vector; the top strand sequence was 5′-GATCCCCATATACGTCACTTAGCGGCATTTCAAGAGA ATGCCGCTAAGTGACGTATATTTTTTA -3′, and the bottom strand sequence was 5′-AGCTTAAAAAATATACGTCACTTAGCGGCATTCTCTTGAAATGCCGCTAAGTGACGTATA TGGG -3′.

For the Alix shRNA the top strand sequence was 5′-GATCCCCGCCGCTGGTGAAGTTCATCTTCAAGAGAGATGAACTTCACCAGC

GGCTTTTTGGAAA-3′ and the bottom strand sequence was 5′-AGCTTTTCCAAAAAGTTCATCCAGCAGACTTACTCTCTTGAAGTAAGTCTGCTGGATGAACGGG-3′. All oligonucleotides were obtained from Invitrogen and all final expression constructs were confirmed by DNA sequencing.

**Generation of Alix ko fibroblasts**

Alix ko mice were obtained in collaboration with the Clinique de la souris (Strasbourg, France). Briefly, exon 2 of *alix* (chromosome 9) was targeted by LoxP sites. Complete ko mice were obtained by backcrossing the floxed mice with CMV-Cre mouse. The recombination changes the reading frame introducing a stop codon at position 71 of the protein. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were obtained as follows: E12.5 embryos were decapitated and eviscerated, trypsinized in 1 ml 0.25% trypsin, 0.53 mM EDTA (LifeTechnologies, Inc.) for 20 min at 37°C and thoroughly minced. Cells were cultured DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine (Invitrogen). After mechanical dissociation, cells were plated in a 10-cm culture dish and cultured at 37°C, in 5% $CO_2$. MEFs from 3 individual embryos (wt or Alix ko) were pooled and frozen in liquid nitrogen.

**Rescue experiments**

For rescue experiments, cDNAs were cloned in pBABE hygro (Addgene) and delivered via retroviral transduction following packaging in Phoenix-Eco cells, as recommended by their provider (ATCC, Manassas, VA). Supernatants containing viral particles from these cells were harvested, filtered through 0.45 µm filters, supplemented with 8 µg/ml polybrene (Sigma, St Louis, MO) and then used to transduce fibroblasts.

**Cell culture, transfections and treatments**

MEF and N2a cells were cultured in DMEM, supplemented with 10% FBS and 2 mM glutamine. For transfections, $4.10^4$ cells were plated in 35 mm dishes and transfected 24 h later using Jet PEI PolyPlus (InvitroGene, France). DNA transfections were analysed after 24 h; shRNA transfections were analysed after 72 h. N2a cells were used to test the efficacy of sh endophilin in down-regulating expression of endogenous endophilin-A2.

EBV-B cells, immortalized from control patients as described in (Vogt et al., 2005), were a kind gift of J.L. Casanova (Paris). The cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% bovine fetal serum.

EBV-B cells were transfected with the plasmids indicated using the NeonTM transfection system (Invitrogen). 72 h after transfection, cells were either left untreated or treated with 1000 U/ml of human IL2 (kind gift of Dr Vogt) at 37°C for 10 minutes. For biochemical analyses, cells were washed with ice cold PBS and lysed in SDS Sample Buffer 1X. Total lysates were analyzed by SDS-PAGE and Western blot analysis. To detect pSTAT5 activation in EBV-B cells, immunoblot signals were enhanced by Supersignal West Dura (Pierce).

**Immunofluorescence**

MEFs were seeded at $4.10^4$ cells per 35 mm dish and grown on coverslips at 37°C. Cells were washed twice with PBS and fixed by 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 min. After permeabilisation with 0.25% Tween in PBS containing 3% BSA for 30 min, antibodies were applied for 1 h at room temperature, then developed using goat anti-mouse or goat anti-rabbit immunoglobulin G coupled to Alexa 594 or Alexa 488, diluted in PBS/0.25%Tween. Nuclei were stained using Hoechst 33258 (Sigma). Coverslips were mounted in Mowiol (Calbiochem) and cells were examined by confocal microscopy

(see below).

**Internalization assays**

For internalization experiments, MEFs were seeded on coverslips at $4.10^4$ cells per 35 mm dish.

*CTxB internalization*: MEFs were washed with cold DMEM containing 0.2% BSA and 20 mM Hepes, and incubated with 2 μg /ml CTxB-TRITC for 20 min at 4°C. Unbound proteins were removed by washing with cold PBS containing 0.2% BSA and cells were then incubated for different times at 37°C in DMEM containing 0.2% BSA to allow internalization. After washing with cold PBS containing 0.2% BSA, cells were fixed for 15 min with 4% PFA, washed with PBS and processed for microscopic examination. Where appropriate, surface bound ligands were removed by treatment with 25 mM sodium acetate in DMEM pH 2 for 2 min prior to fixation. The medium was then neutralized by addition of 25 mM Tris in DMEM, pH 10 and processed as described above. To study CTxB uptake in the presence of filipin (1 mg/ml) and chlorpromazine (10 μg /ml), cells were pre-treated with reagent for 30 min at 37°C followed by 20 min at 4°C in DMEM containing 0.2% BSA and 20 mM HEPES, as well as during the CTxB uptake period at 37°C. The samples were imaged using a Zeiss axiovert 200 microscope equipped with a 20x or 40x objective or by confocal microscopy (see below) using 63x or 40x oil immersion objectives.

For uptake quantification, images were background subtracted, cellular regions of interest were marked, and the mean fluorescence intensity was measured in these regions using ImageJ. Intensities were normalized to binding of CTxB at 4°C. Results are expressed as a fraction of wt uptake in each condition, considered as 1.

*EGF-TRITC, transferrin-TRITC, GPI-GFP, IL2Rβ and β1 integrin internalization*: MEFs were rinsed with cold DMEM containing 0.2% BSA and 20 mM HEPES and incubated for 45 min on ice with EGF-TRITC (100 ng/ml or 2 ng/ml), monoclonal anti-GFP (4 μg/ml), monoclonal anti-IL2Rβ, monoclonal anti-β1 integrin antibody (4 μg/ml), or for 20 min on ice with 40 μg/ml transferrin-TRITC. Cells were then incubated at 37°C for the indicated times to allow endocytosis. For EGF-TRITC and transferrin-TRITC, MEFs were starved in medium lacking serum for 4 h before incubation at 4°C with ligands. For GPI-GFP, IL2Rβ-GFP and β1 integrin, internalized antibody was detected using a fluorescently labelled secondary antibody. Internalization, stripping, fixation and permeabilization were performed as described for CTxB. For GPI-GFP and IL2Rβ transfected MEFs, intensities were normalized using binding of anti-GFP at 4°C.

*Dextran-TRITC internalization:* cells were incubated for 10 min at 37°C with 3 mg/ml Dextran in internalization medium (5 mM glucose), washed 5 times with PBS containing BSA and fixed with 4% PFA. Internalized dextran was quantified using ImageJ.
*WGA internalization*: cells were washed with cold PBS containing 0.2% BSA and incubated 5 min at 4°C with 2 μg/ml WGA-A594. Internalization was quantified as for CTxB.

**Fluorescent microscopy**

Images were acquired using a Zeiss Axiovert microscope controlled by Metamorph, using 20x or 40x objectives (for uptake quantification), or with a Zeiss LSM 710 inverted confocal microscope controlled Zen software, using a 40x oil objective (NA 1.3, Zeiss) or a 63x oil objective (NA 1.4, Zeiss), or 100x oil objective (NA 1,4, Zeiss). For endophilin/Alix colocalization (Fig. 5d), a Zeiss LSM 880 inverted confocal Airyscan microscope with a 63x oil objective (NA 1.4, Zeiss) was used. Laser lines at 488 nm, 561 nm and 633 nm were used for exciting fluorophores. Pinhole size was usually set to generate 1 μm-thick optical slices at all wavelengths.

**Internalization of BSA-gold**

The BSA-gold uptake studies were performed according to (Kleijmeer et al., 1997). Briefly, MEFs were incubated with 6nm BSA-gold particles for 10 min at 37°C, washed extensively with cold medium and then either fixed immediately, or incubated further at 37°C for 20 min or 50 min before fixation. Cells were fixed overnight at 4°C in 0.1M phosphate buffer (PB) containing 2% PFA and 0.2% glutaraldehyde. After fixation, cells were detached by careful scraping and collected by centrifugation. The cell pellets were washed with PB, embedded in 10% (wt/vol) gelatin and infused with 2.3 M sucrose (Liou et al., 1996). Gelatin blocks were frozen in liquid nitrogen and ultrathin cryo sections were cut at −120°C using an Ultracut FCS ultracryomicrotome (Leica-Reichert). Sections were retrieved in a 1:1 solution of 2.3 M sucrose and 2% methyl cellulose. The sections were viewed at 80 kV in a JEOL 1200 EX electron microscope and imaged using an Olympus (Veleta, SIS) camera.
To follow vesicle trafficking, at each time point 40 cell profiles of 3 different grids were randomly selected, and gold particles present in the endocytic structures were assigned to compartments of types 1-5 as described in the Results section. For each time point,

approximately 1000 beads were counted and BSA-gold counts in each compartment were expressed as a percentage of the total number of gold beads counted in the endocytic pathway.

### Colocalisation analysis

Images of CTxB patches were acquired and superimposed with the distribution of selected proteins. Images of regions of interest were thresholded to see only the patches of CTxB and the same threshold was then applied for all proteins. Mander's coefficient was calculated using the JACOB (Bolte and Cordelieres, 2006) plug-in of the ImageJ software.

### EGFR degradation assay

MEFs were serum-starved for 16 h in DMEM containing 2% glutamine and incubated with 100 ng/ml EGF for 30 min, 1 h, 2 h, 4 h or 6 h. For bafilomycin treatment, cells were pretreated with 100 nM bafilomycin 2 h before and during incubation with EGF. Protein bands were quantified using the ImageJ plot profile tool.

### Western Blotting

Cells were lysed in radioimmune precipitation assay (RIPA) buffer containing protease inhibitors (Complete, Roche Molecular). The cell lysates were cleared by centrifugation at 14,000 *g* for 20 min, and proteins (20 μg of total protein per lane, or 40 μg for the EGFR degradation assay) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore). The membranes were blocked with 5% milk in TBS (Tris buffered saline) containing 0.1% Tween and incubated with primary antibodies overnight at 4°C, followed by incubation with secondary HRP-conjugated antibodies for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands were revealed using the ECL detection reagent. Protein bands were quantified using the ImageJ plot profile tool.

### Localization of CTxB, TfR and Alix in Detergent-Resistant Membrane Domains (DRMs)

For localization of Alix in DRMs, Alix ko MEFs transfected with GFP-Alix were labelled with CTxB-TRITC or TfR-TRITC for 30 min at 4°C, washed with cold PBS and treated with 0.5% Triton X-100 for 1 min to remove the detergent-sensitive membrane fraction. Cells were then washed with PBS, fixed with 4% PFA and analysed with the Zeiss LSM 710 inverted confocal microscope.

## Wound healing assay

MEFs were seeded at $5.10^5$ cells per 35 mm dish. Confluent monolayers were scratched using a plastic pipette tip to simulate the wound. Cells were then washed with PBS, and cultured in serum-containing medium at 37°C to allow wound healing. Images were recorded immediately after scratching and at 15 min intervals for 48 h with a Zeiss Axiovert 200 microscope using the 10x objective. For each cell type, ten cells in each of 10 fields were tracked using Metamorph and the velocity of each cell was calculated. Data were compiled from two independent experiments.

## Cell spreading assay

MEFs were trypsinized, replated on coverslips precoated with 10 mg/ml fibronectin (FN), and allowed to spread for 2 h at 37°C in complete medium. Cultures were fixed and visualized by staining with phalloidin-TRITC for 1 h and the mean surface area was calculated using ImageJ.

## Statistical Analyses

Results shown are means, and error bars represent standard errors of the mean (s.e.m). Except where otherwise stated, experiments were repeated at least 3 times. Statistical analyses were performed using Microsoft Excel and Prism 6 (GraphPad Software). The Gaussian distribution of the data were tested using Kolmogorov–Smirnov test (with Dallal–Wilkinson–Lillie for P value). In case of non-Gaussian distribution, the following non-parametric tests were used: two-tailed Mann–Whitney U test to compare two conditions, or one-way ANOVA (Kruskal–Wallis test) with a Dunn's test to compare more than two data groups. In case of Gaussian distribution, two-tailed Student's t-test was used for the comparison of the means in case of comparison between two conditions and parametric one-way ANOVA with a Dunnett's multiple comparison test in case of comparisons between more than two data groups. Significance of mean comparison is represented on the graphs by asterisks. All error bars denote s.e.m.

### Online supplemental material

Live Imaging of GFP-Alix recruitment to CTxB entry sites.

Alix ko MEFs cultured on 30 mm coverslips were transiently transfected with GFP-Alix. Shortly before live-cell imaging, the cell culture medium was changed for DMEM supplemented with 20

mM HEPES (pH7.4) and 0.2 % BSA, and cells placed in a temperature controlled chamber on the microscope stage.

Pictures where acquired using a fully motorized inverted microscope (AxioObserver Z1, Zeiss) equipped with a CSU-W1 spinning disk confocal unit (Yokogawa, Japan) using a x63 lens (NA: 1.46) under control of Metamorph.

14-bit digital images were obtained with a cooled EMCCD camera (ProEM 1024, Princeton Instruments). The 50 mW solid-state lasers (488nm ; 561nm) coupled to individual acoustic-optical tunable filter (AOTF) were used as light sources to excite EGFP and TRITC, as appropriate.

Rapid two-color time-lapses were acquired at 2 s intervals, using a dual (525/50 ; 640/120, Chroma) emission filter respectively. The power of the lasers supported excitation times of 50 ms in each wavelength and the AOTFs allowed minimum delay (1ms) between two colours, which was an important factor to assess the co-localization between markers.

**Acknowledgements:** This work was funded by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR), MALZ program, France. V.M and M. L. were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France. C.M.B was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer. C.L. was supported by Institut National du Cancer (INCa PLBIO12-203 to CL) and Agence Nationale de la Recherche (ANR "MECANOCAV" to CL). CMB and CL are members of Labex CelTisPhyBio N° ANR-10-LBX-0038 part of the IDEX Idex PSL N°ANR-10-IDEX-0001-02 PSL. C.A.-R. and O.D were supported by Association pour la Recherche sur le Cancer and the Institut National du Cancer.We thank for their help, F. Vossier for cell cultures, J. Delaroche for electron micoscopy, all members of the laboratory and K. Sadoul for critically reading the manuscript, F. Hemming and K. Maundrell for English editing.

The authors declare no competing financial interests.

**Abbreviations List**

ALG-2, apoptosis-linked gene 2;

Alix, ALG-2 interacting protein X;

BAR, Bin/amphiphysin/Rvs;

BSA, bovine serum albumin;

CHMP, charged multivesicular body protein;

CIE, clathrin-independent endocytosis;

CIN85, Cbl interacting protein-85;

CME, Clathrin-mediated endocytosis;

CTx, cholera toxin;

CTxB, CTx B chain;

DRMs, detergent resistant membranes;

EEA1, *Early endosome antigen-1;*

EGF, epidermal growth factor;

EGFR, EGF receptor;

Eps15, epsin 15;

ERK, extracellular signal-regulated kinase;

ESCRT, endosomal sorting complex required for transport;

GM1, monosialotetrahexosylganglioside;

GPI, glycosylphosphatidylinositol;

IL2, interleukin-2;

IL2R, IL-2 receptor;

ILV, intraluminal vesicle;

JAK, Janus kinase;

ko, knock-out

LBPA, lysobisphophatidic acid;

PRD, proline-rich domain;

MEF, mouse embryonic fibroblast;

MVB, multivesicular body;

SH3, SRC homology 3;

shRNA, small hairpin RNA;

STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription;

Tf, transferrin;

TfR, Tf receptor;

TRITC, Tetramethylrhodamine;

Tsg101: Tumour susceptibility gene 101

WGA, wheat germ agglutinin;

wt, wild type.

# References


Abrami, L., L. Brandi, M. Moayeri, M.J. Brown, B.A. Krantz, S.H. Leppla, and F.G. van der Goot. 2013. Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell reports*. 5:986-996.

Benmerah, A., C. Lamaze, B. Begue, S.L. Schmid, A. Dautry-Varsat, and N. Cerf-Bensussan. 1998. AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol*. 140:1055-1062.

Bissig, C., M. Lenoir, M.C. Velluz, I. Kufareva, R. Abagyan, M. Overduin, and J. Gruenberg. 2013. Viral infection controlled by a calcium-dependent lipid-binding module in ALIX. *Dev Cell*. 25:364-373.

Bolte, S., and F.P. Cordelieres. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 224:213-232.

Boucrot, E., A.P. Ferreira, L. Almeida-Souza, S. Debard, Y. Vallis, G. Howard, L. Bertot, N. Sauvonnet, and H.T. McMahon. 2014. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*.

Cabezas, A., K.G. Bache, A. Brech, and H. Stenmark. 2005. Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J Cell Sci*. 118:2625-2635.

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

Chatellard-Causse, C., B. Blot, N. Cristina, S. Torch, M. Missotten, and R. Sadoul. 2002. Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem*. 277:29108-29115.

Chen, B., S.C. Borinstein, J. Gillis, V.W. Sykes, and O. Bogler. 2000. The glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in astrocytes. *J Biol Chem*. 275:19275-19281.

Doherty, G.J., and H.T. McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 78:857-902.

Eikenes, A.H., L. Malerod, A.L. Christensen, C.B. Steen, J. Mathieu, I.P. Nezis, K. Liestol, J.R. Huynh, H. Stenmark, and K. Haglund. 2015. ALIX and ESCRT-III coordinately control cytokinetic abscission during germline stem cell division in vivo. *PLoS genetics*. 11:e1004904.

Ewers, H., and A. Helenius. 2011. Lipid-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3:a004721.

Fisher, R.D., H.Y. Chung, Q. Zhai, H. Robinson, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2007. Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell*. 128:841-852.

Futter, C.E., A. Pearse, L.J. Hewlett, and C.R. Hopkins. 1996. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*. 132:1011-1023.

Gad, H., N. Ringstad, P. Low, O. Kjaerulff, J. Gustafsson, M. Wenk, G. Di Paolo, Y. Nemoto, J. Crun, M.H. Ellisman, P. De Camilli, O. Shupliakov, and L. Brodin. 2000. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron*. 27:301-312.

Gandhi, H., R. Worch, K. Kurgonaite, M. Hintersteiner, P. Schwille, C. Bokel, and T. Weidemann. 2014. Dynamics and interaction of interleukin-4 receptor subunits in living cells. *Biophys J*. 107:2515-2527.

Giachino, C., E. Lantelme, L. Lanzetti, S. Saccone, G. Bella Valle, and N. Migone. 1997. A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics*. 41:427-434.

Guichet, A., T. Wucherpfennig, V. Dudu, S. Etter, M. Wilsch-Brauniger, A. Hellwig, M. Gonzalez-Gaitan, W.B. Huttner, and A.A. Schmidt. 2002. Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the Drosophila neuromuscular junction. *Embo J*. 21:1661-1672.

Henne, W.M., H. Stenmark, and S.D. Emr. 2013. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5.

Howes, M.T., M. Kirkham, J. Riches, K. Cortese, P.J. Walser, F. Simpson, M.M. Hill, A. Jones, R. Lundmark, M.R. Lindsay, D.J. Hernandez-Deviez, G. Hadzic, A. McCluskey, R. Bashir, L. Liu, P. Pilch, H. McMahon, P.J. Robinson, J.F. Hancock, S. Mayor, and R.G. Parton. 2010. Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol*. 190:675-691.

Jimenez, A.J., P. Maiuri, J. Lafaurie-Janvore, S. Divoux, M. Piel, and F. Perez. 2014. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*. 343:1247136.

Kim, J., S. Sitaraman, A. Hierro, B.M. Beach, G. Odorizzi, and J.H. Hurley. 2005. Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Dev Cell*. 8:937-947.

Kirkham, M., and R.G. Parton. 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta*. 1746:349-363.

Kleijmeer, M.J., S. Morkowski, J.M. Griffith, A.Y. Rudensky, and H.J. Geuze. 1997. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol*. 139:639-649.

Kononenko, N.L., D. Puchkov, G.A. Classen, A.M. Walter, A. Pechstein, L. Sawade, N. Kaempf, T. Trimbuch, D. Lorenz, C. Rosenmund, T. Maritzen, and V. Haucke. 2014. Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron*. 82:981-988.

Kowanetz, K., I. Szymkiewicz, K. Haglund, M. Kowanetz, K. Husnjak, J.D. Taylor, P. Soubeyran, U. Engstrom, J.E. Ladbury, and I. Dikic. 2003. Identification of a novel proline-arginine motif

involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem*. 278:39735-39746.

Lakshminarayan, R., C. Wunder, U. Becken, M.T. Howes, C. Benzing, S. Arumugam, S. Sales, N. Ariotti, V. Chambon, C. Lamaze, D. Loew, A. Shevchenko, K. Gaus, R.G. Parton, and L. Johannes. 2014. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol*. 16:595-606.

Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah, and A. Dautry-Varsat. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell*. 7:661-671.

Le Blanc, I., P.P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petiot, N. Mayran, N. Demaurex, J. Faure, R. Sadoul, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol*. 7:653-664.

Liou, W., H.J. Geuze, and J.W. Slot. 1996. Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol*. 106:41-58.

Llobet, A., J.L. Gallop, J.J. Burden, G. Camdere, P. Chandra, Y. Vallis, C.R. Hopkins, L. Lagnado, and H.T. McMahon. 2011. Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse. *J Neurosci*. 31:8512-8519.

Lynch, D.K., S.C. Winata, R.J. Lyons, W.E. Hughes, G.M. Lehrbach, V. Wasinger, G. Corthals, S. Cordwell, and R.J. Daly. 2003. A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 278:21805-21813.

Mahul-Mellier, A.L., F.J. Hemming, B. Blot, S. Fraboulet, and R. Sadoul. 2006. Alix, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death in vivo. *J Neurosci*. 26:542-549.

Mahul-Mellier, A.L., F. Strappazzon, A. Petiot, C. Chatellard-Causse, S. Torch, B. Blot, K. Freeman, L. Kuhn, J. Garin, J.M. Verna, S. Fraboulet, R. Sadoul, and F.J. Hemming. 2008. Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death. *J Biol Chem*. 283:34954-34965.

Margadant, C., H.N. Monsuur, J.C. Norman, and A. Sonnenberg. 2011. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol*. 23:607-614.

Matsuo, H., J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Faure, N.S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R.G. Parton, F. Vilbois, and J. Gruenberg. 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science*. 303:531-534.

Mayor, S., R.G. Parton, and J.G. Donaldson. 2014. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 6.

McCullough, J., R.D. Fisher, F.G. Whitby, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2008. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:7687-7691.

Milosevic, I., S. Giovedi, X. Lou, A. Raimondi, C. Collesi, H. Shen, S. Paradise, E. O'Toole, S. Ferguson, O. Cremona, and P. De Camilli. 2011. Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron*. 72:587-601.

Missotten, M., A. Nichols, K. Rieger, and R. Sadoul. 1999. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ*. 6:124-129.

Mobius, W., E. van Donselaar, Y. Ohno-Iwashita, Y. Shimada, H.F. Heijnen, J.W. Slot, and H.J. Geuze. 2003. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic*. 4:222-231.

Morita, E., V. Sandrin, H.Y. Chung, S.G. Morham, S.P. Gygi, C.K. Rodesch, and W.I. Sundquist. 2007. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *Embo J*. 26:4215-4227.

Pan, S., R. Wang, X. Zhou, J. Corvera, M. Kloc, R. Sifers, G.E. Gallick, S.H. Lin, and J. Kuang. 2008. Extracellular Alix regulates integrin-mediated cell adhesions and extracellular matrix assembly. *Embo J*. 27:2077-2090.

Peter, B.J., H.M. Kent, I.G. Mills, Y. Vallis, P.J. Butler, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*. 303:495-499.

Petrelli, A., G.F. Gilestro, S. Lanzardo, P.M. Comoglio, N. Migone, and S. Giordano. 2002. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature*. 416:187-190.

Pires, R., B. Hartlieb, L. Signor, G. Schoehn, S. Lata, M. Roessle, C. Moriscot, S. Popov, A. Hinz, M. Jamin, V. Boyer, R. Sadoul, E. Forest, D.I. Svergun, H.G. Gottlinger, and W. Weissenhorn. 2009. A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure*. 17:843-856.

Ren, X., and J.H. Hurley. 2011. Proline-rich regions and motifs in trafficking: from ESCRT interaction to viral exploitation. *Traffic*. 12:1282-1290.

Renard, H., M. Simunovic, J. Lemiere, E. Boucrot, M.D. Garcia-Castillo, S. Arumugam, V. Chambon, C. Lamaze, C. Wunder, A.K. Kenworthy, A.A. Schmidt, H.T. McMahon, C. Sykes, P. Bassereau, and L. Johannes. 2014. Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature*.

Ringstad, N., Y. Nemoto, and P. De Camilli. 1997. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:8569-8574.

Rodighiero, C., Y. Fujinaga, T.R. Hirst, and W.I. Lencer. 2001. A cholera toxin B-subunit variant that binds ganglioside G(M1) but fails to induce toxicity. *J Biol Chem*. 276:36939-36945.

Rusten, T.E., T. Vaccari, and H. Stenmark. 2012. Shaping development with ESCRTs. *Nat Cell Biol*. 14:38-45.

Sadoul, R. 2006. Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse. *Bio. Cell*. 98:69-77.

Scheffer, L.L., S.C. Sreetama, N. Sharma, S. Medikayala, K.J. Brown, A. Defour, and J.K. Jaiswal. 2014. Mechanism of Ca(2+)-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nature communications*. 5:5646.

Schmidt, M.H., D. Hoeller, J. Yu, F.B. Furnari, W.K. Cavenee, I. Dikic, and O. Bogler. 2004. Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Mol Cell Biol*. 24:8981-8993.

Schuske, K.R., J.E. Richmond, D.S. Matthies, W.S. Davis, S. Runz, D.A. Rube, A.M. van der Bliek, and E.M. Jorgensen. 2003. Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron*. 40:749-762.

Sigismund, S., V. Algisi, G. Nappo, A. Conte, R. Pascolutti, A. Cuomo, T. Bonaldi, E. Argenzio, L.G. Verhoef, E. Maspero, F. Bianchi, F. Capuani, A. Ciliberto, S. Polo, and P.P. Di Fiore. 2013. Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate. *Embo J*. 32:2140-2157.

Sigismund, S., E. Argenzio, D. Tosoni, E. Cavallaro, S. Polo, and P.P. Di Fiore. 2008. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell*. 15:209-219.

Soubeyran, P., K. Kowanetz, I. Szymkiewicz, W.Y. Langdon, and I. Dikic. 2002. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*. 416:183-187.

Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H.G. Gottlinger. 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*. 114:689-699.

Tomas, A., C.E. Futter, and E.R. Eden. 2014. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol*. 24:26-34.

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

Verstreken, P., O. Kjaerulff, T.E. Lloyd, R. Atkinson, Y. Zhou, I.A. Meinertzhagen, and H.J. Bellen. 2002. Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell*. 109:101-112.

Vogt, G., A. Chapgier, K. Yang, N. Chuzhanova, J. Feinberg, C. Fieschi, S. Boisson-Dupuis, A. Alcais, O. Filipe-Santos, J. Bustamante, L. de Beaucoudrey, I. Al-Mohsen, S. Al-Hajjar, A. Al-Ghonaium, P. Adimi, M. Mirsaeidi, S. Khalilzadeh, S. Rosenzweig, O. de la Calle Martin, T.R. Bauer, J.M. Puck, H.D. Ochs, D. Furthner, C. Engelhorn, B. Belohradsky, D. Mansouri, S.M. Holland, R.D. Schreiber, L. Abel, D.N. Cooper, C. Soudais, and J.L. Casanova. 2005. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat Genet*. 37:692-700.

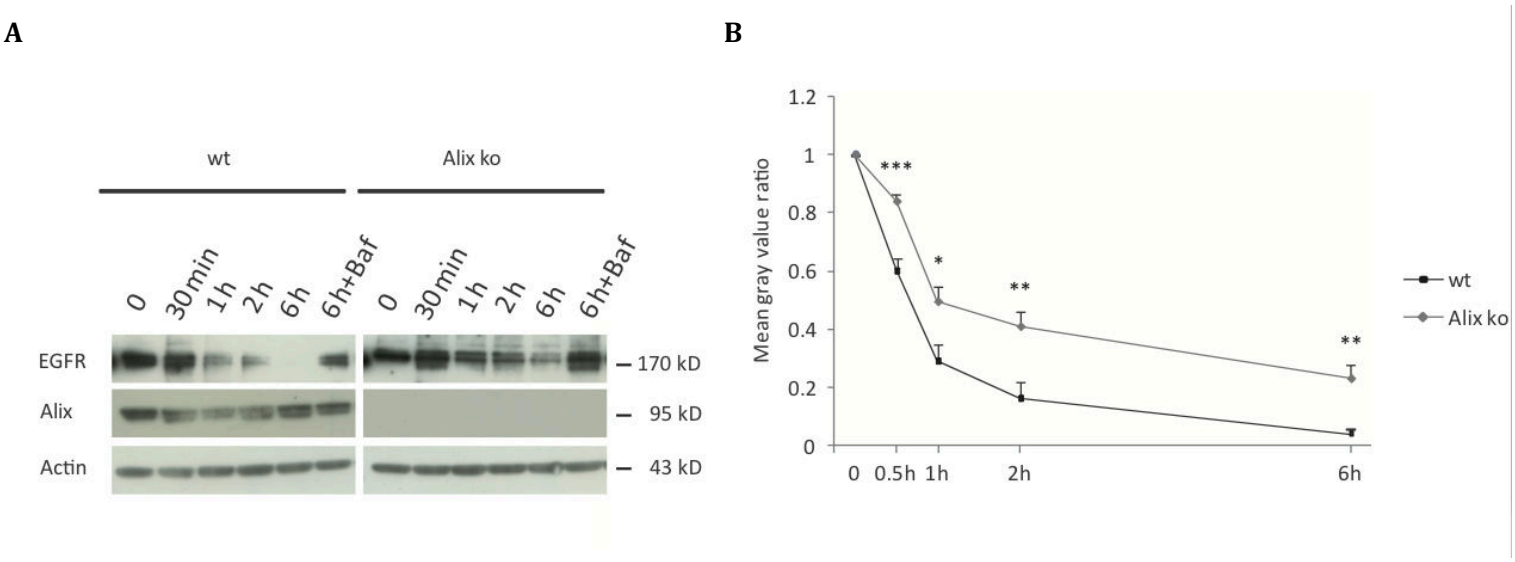



**Figure 1. EGFR degradation is delayed in Alix ko cells.**

a-b) Serum-starved wt or Alix ko MEFs were incubated with 100 ng/ml EGF at 37°C for the indicated times. EGFR was revealed by immunoblotting (a) and band intensities estimated (b) using ImageJ software. EGFR intensities were normalised to actin. Graph represent the ratio between values at each time point and that at t=0 (n=6; * P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001, two-tailed Student's t-test).

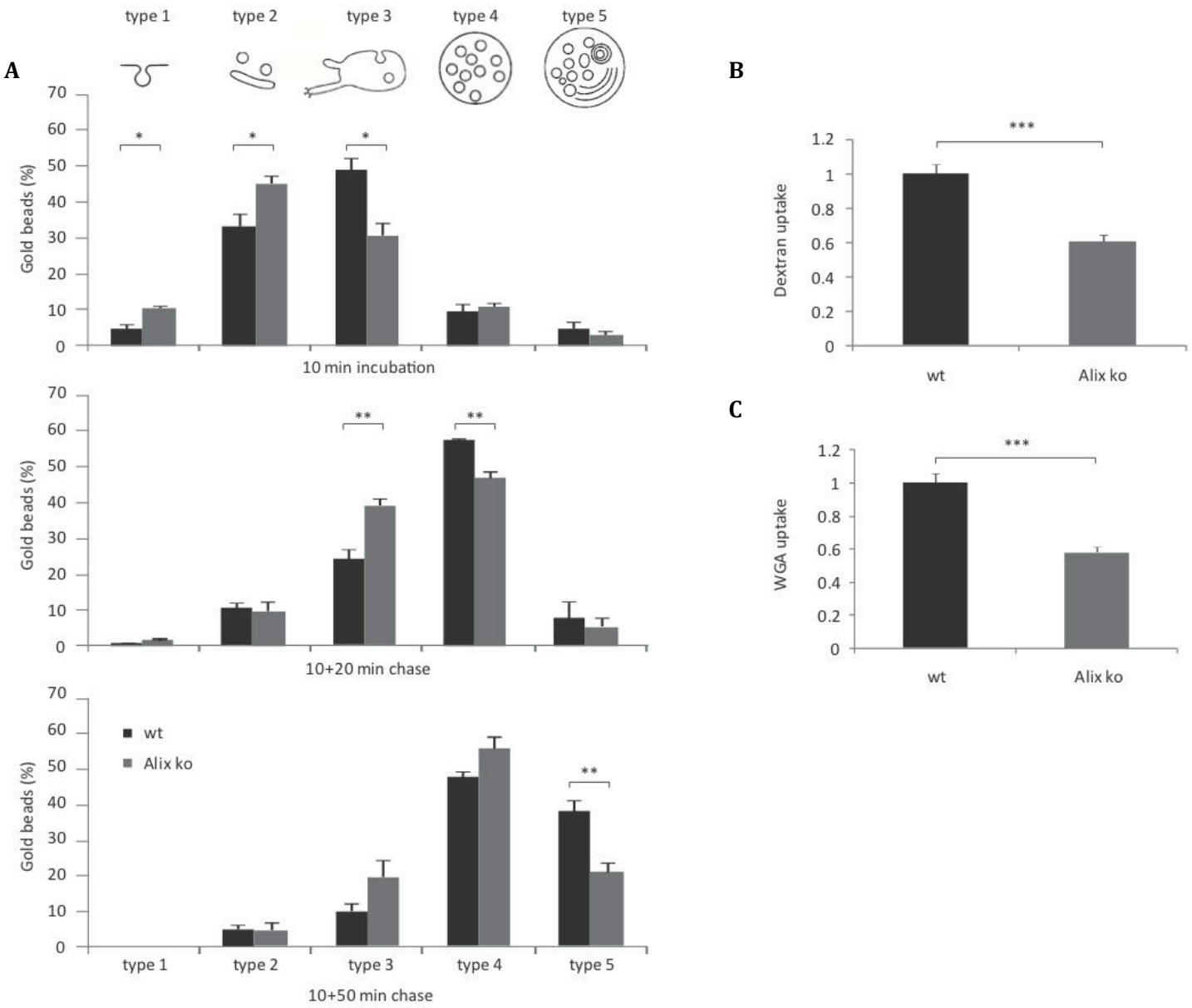



**Figure 2. Endocytosis is delayed in Alix ko cells.**

a) EM quantification of BSA-gold particles endosomal trafficking. MEFs were incubated with BSA-gold for 10 min at 37°C and fixed immediately (top panel), or washed and further incubated at 37°C for 20 min (middle panel) or 50 min (bottom panel). 1000 gold particles were counted for each condition and were attributed to each compartment type: type 1: plasma membrane invaginations, type 2: endocytic vesicles, type 3: early endosomal compartments, type 4: multivesicular bodies (MVB), type 5: late endosomes/ lysosomes (*P< 0.05; **P< 0.01, two-tailed Student's t-test).

b) MEFs were incubated 10 min with dextran-TRITC at 37°C, washed and fixed. Mean fluorescent values per cell were estimated using ImageJ (Number of cells: wt, n= 123; Alix ko, n=116 in 3 independent experiments ***P<0.001, two-tailed Mann–Whitney U test). c) MEFs were stained for 5 min with fluorescent WGA at 4°C, washed and incubated 5 min at 37°C. Mean fluorescent values per cell were estimated using ImageJ (Number of cells: wt, n= 114; Alix ko, n= 107 in 3 independent experiments ***P<0.001, two-tailed Mann–Whitney U test).

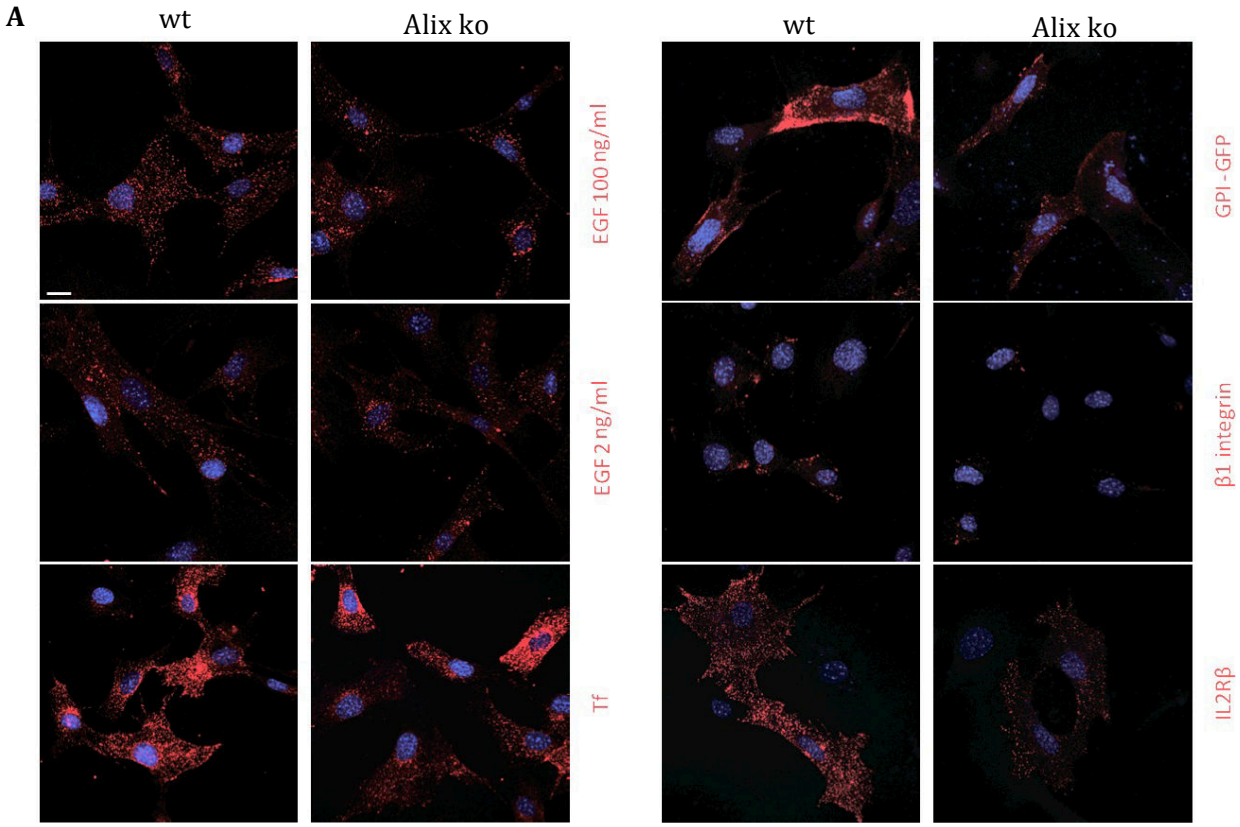



**Figure 3. CIE is selectively disrupted in Alix ko cells while CME is unaffected.**

a) Representative photographs of wt and Alix ko MEFs after endocytosis of EGF, Tf, GPI-GFP, β1 integrin and IL2Rβ. Serum-starved MEFs were incubated with EGF-TRITC (EGF, 2 or 100 ng/ml) or transferrin-TRITC (Tf) at 4°C, followed by 10 min incubation at 37°C. MEFs expressing GPI-GFP or IL2Rβ-GFP were incubated with anti-GFP antibodies at 4°C, followed by 5 min incubation at 37°C. To follow β1integrin endocytosis, MEFs were incubated at 4°C with anti-active-β1 integrin antibodies followed by 10 min incubation at 37°C. In both latter cases, cell surface bound antibodies were removed by acid treatment. Scale bar: 20 μm. b,c) Mean fluorescence values per cell were estimated using ImageJ. Number of cells in 3 independent experiments: EGF 100 ng/ml, wt, n= 161; Alix ko, n= 128; two-tailed Student's t test; EGF 2 ng/ml, wt, n= 95; Alix ko, n= 85; Tf, wt, n= 87; Alix ko, n= 96; GPI-GFP, wt, n= 59; Alix ko, n= 82 , two-tailed Mann–Whitney U test β1 integrin, wt, n= 81; Alix ko, n= 76; two-tailed Student's t-test; IL2Rβ, wt, n= 100; Alix ko, n= 102; two-tailed Mann–Whitney U test; ***P< 0.001).

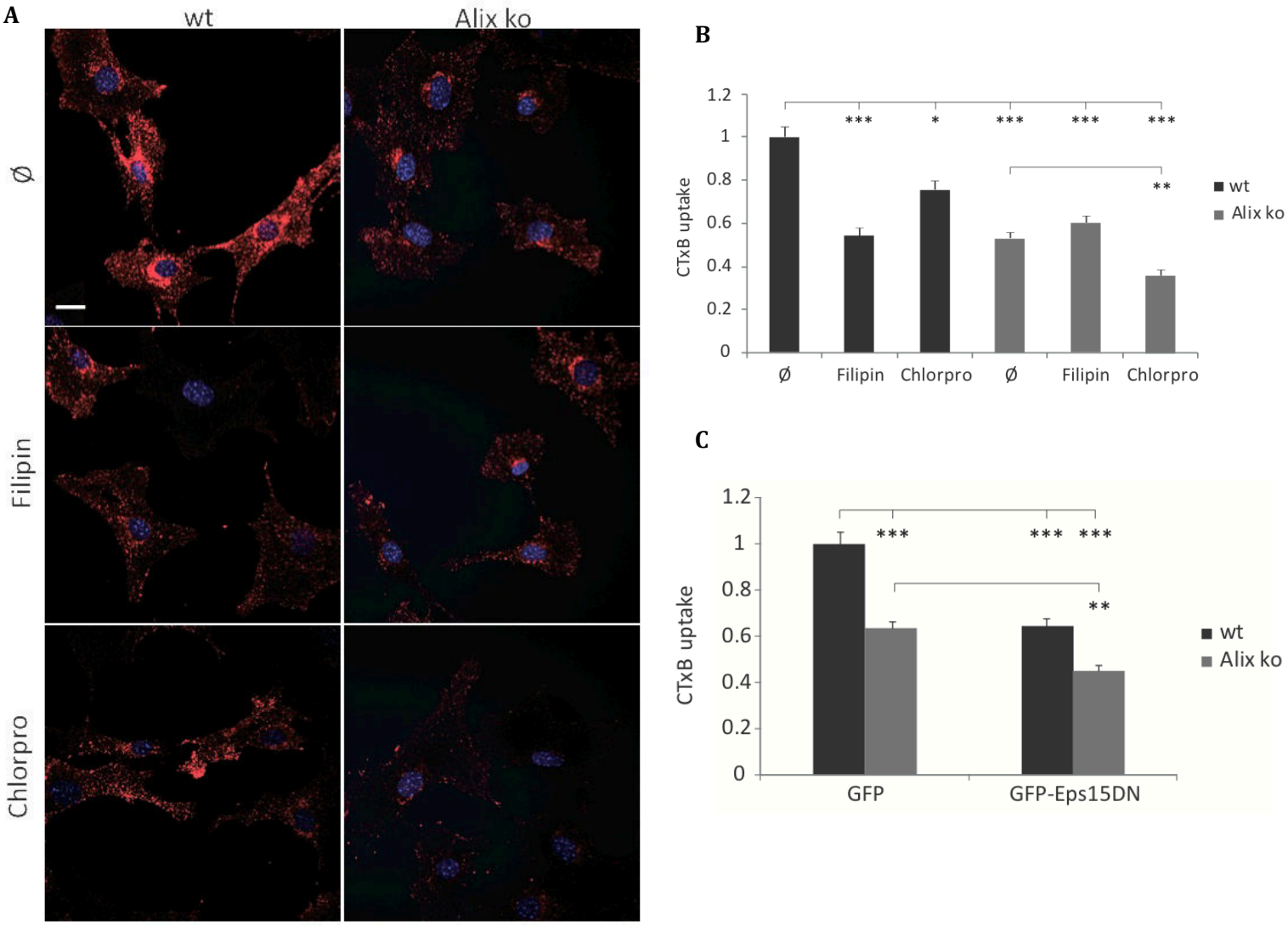


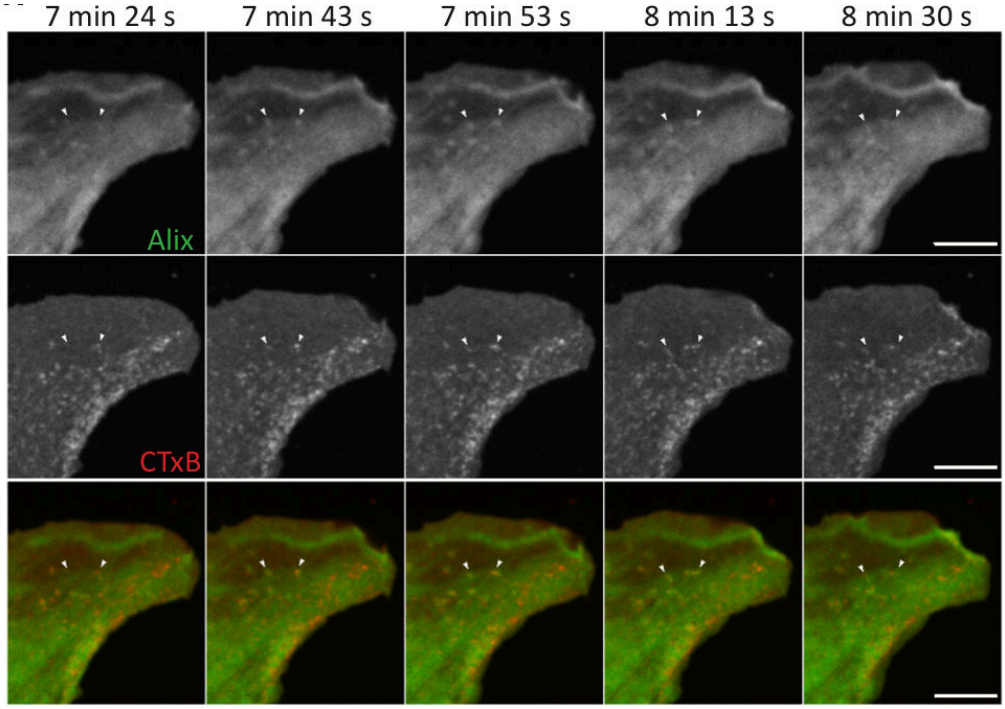

**Figure 4. CIE but not CME of CTxB is impaired in Alix ko cells.**

a) Representative images of 5 min CTxB-TRITC uptake by wt and Alix ko MEFs. The reduced endocytosis of CTxB-TRITC seen in Alix ko cells is further decreased by chlorpromazine (chlorpro) but not by filipin. Cells were left untreated (Ø) or pretreated with filipin or chlorpromazine which were left during incubation with the toxin. Scale bar: 20 μm.

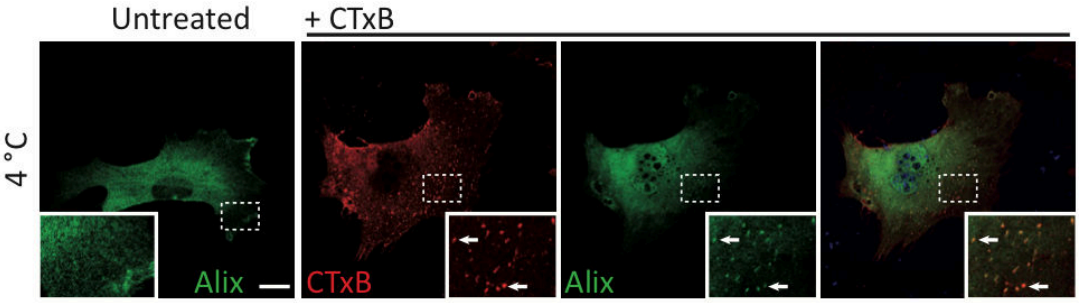
b) Quantification of the experiment shown in (a). Mean fluorescence values per cell were calculated using ImageJ (Number of cells in 3 independent experiments: wt Ø, n= 107; wt filipin, n= 90; wt chlorpro, n= 72; Alix ko Ø, n= 145; Alix ko filipin, n= 100; Alix ko chlorpro, n= 95; *P< 0.05; **P< 0.01; ***P<0.001, Dunn's multiple comparison test).

c) Quantification of 5 min CTxB uptake by wt and Alix ko MEFs expressing GFP or GFP-Eps15DN. Mean fluorescence values per cell were calculated using ImageJ (Number of cells in 5 independent experiments: wt GFP, n= 147; wt GFP-Eps15DN, n= 93; Alix ko GFP, n= 147; Alix ko Eps15DN, n= 105; **P< 0.01; ***P<0.001, Dunn's multiple comparison test).

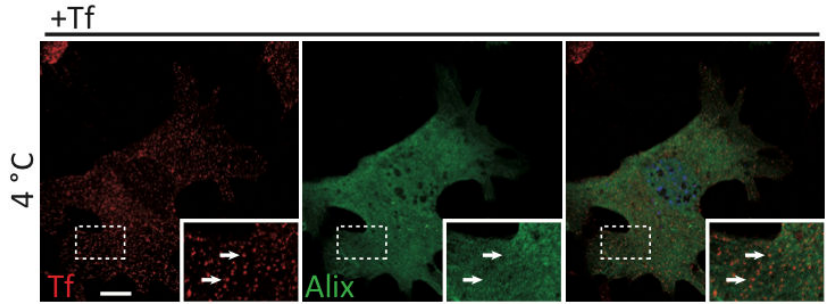
**A**


7 min 24 s
7 min 43 s
7 min 53 s
8 min 13 s
8 min 30 s
Alix
CTxB

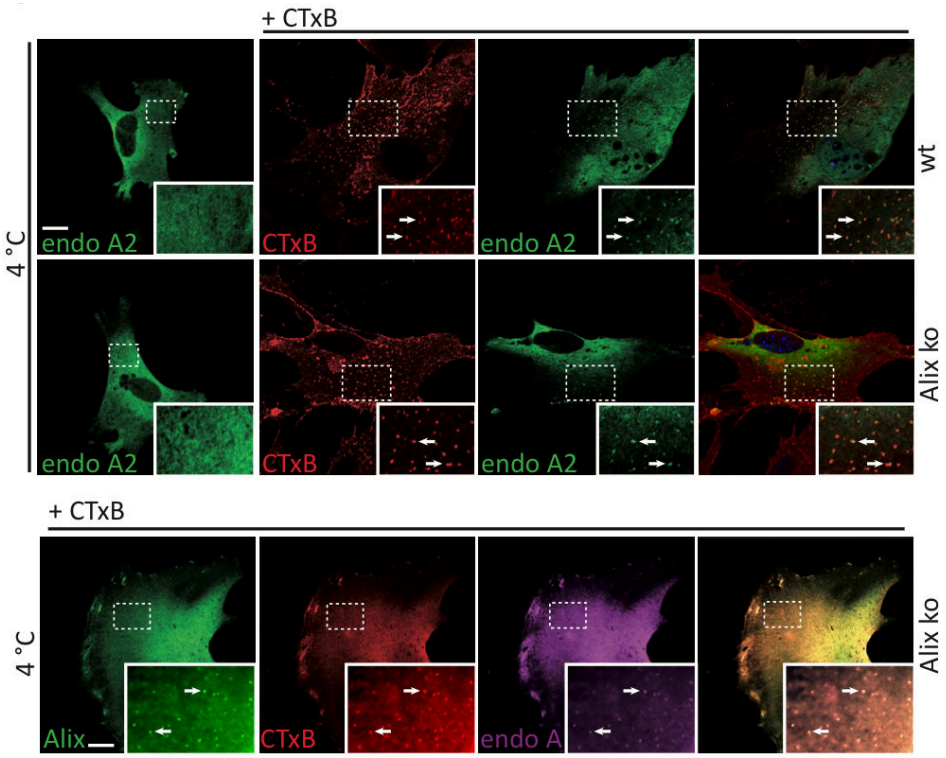
**B**


Untreated
+ CTxB
4 °C
Alix
CTxB
Alix

**C**


+Tf
4 °C
Tf
Alix

**D**




**E**

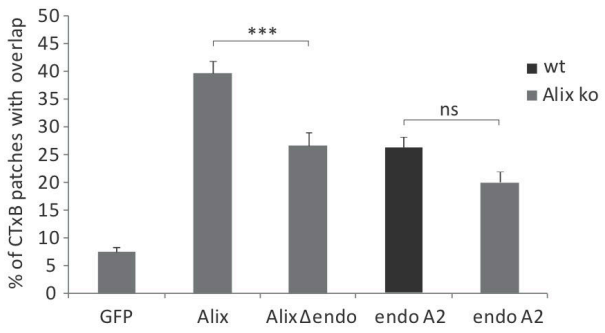



**Figure 5. Alix and endophilin A2 relocalise to CTxB labelled membrane patches.**

a) Images from a time-lapse video microscopy, acquired by spinning-disk confocal microscopy of an Alix ko MEF expressing GFP-Alix 5 min after addition of CTxB-TRITC (red). Arrows indicate GFP-Alix recruitment at the level of preexisting (right) or appearing (left) CTxB labelled patches. Both arrows show disappearance of CTxB and Alix GFP. Scale bar: 5 μm.

b) Recruitment of Alix to CTxB patches. Alix ko MEFs expressing GFP-Alix were left untreated, or incubated for 20 min with CTxB-TRITC (red) at 4°C prior to fixation.

c) Alix is not recruited to membrane patches containing TfR. Alix ko MEFs expressing GFP-Alix were incubated for 20 min with Tf-TRITC at 4°C prior to fixation. Scale bar: 20 μm.

d) Upper panels: Endophilin A2 recruitment to CTxB patches in both wt and Alix ko cells. wt MEFs and Alix ko MEFs expressing Myc-endophilin-A2 (endo A2), were left untreated, or incubated with CTxB-TRITC for 20 min at 4°C before fixation and immunostaining with anti-Myc antibodies (green). Lower panel: Endophilin A2 and Alix colocalize to CTxB patches. Alix ko MEFs expressing GFP-Alix (green) and Myc-endophilin were incubated with CTxB-TRITC (red) for 20 min at 4°C before immunolabelling with anti-Myc antibodies (magenta). The image on the right shows the 3-colour merge. Arrows indicate representative patches containing all 3 proteins. Scale bars: 20 μm.

e) Graph showing the percentage of CTxB labelled patches colocalizing with GFP, GFP-Alix, Flag-AlixDendo or Myc-endophilin-A2 in wt (black) or Alix ko cells (gray). Quantification was performed using ImageJ (Number of cells in 3 independent experiments : GFP, n= 31; Alix, n= 53; AlixΔendo, n= 43; endoA2, n= 57 for wt and n= 56 for Alix ko. ***P<0.001, one way ANOVA and Dunett's test).

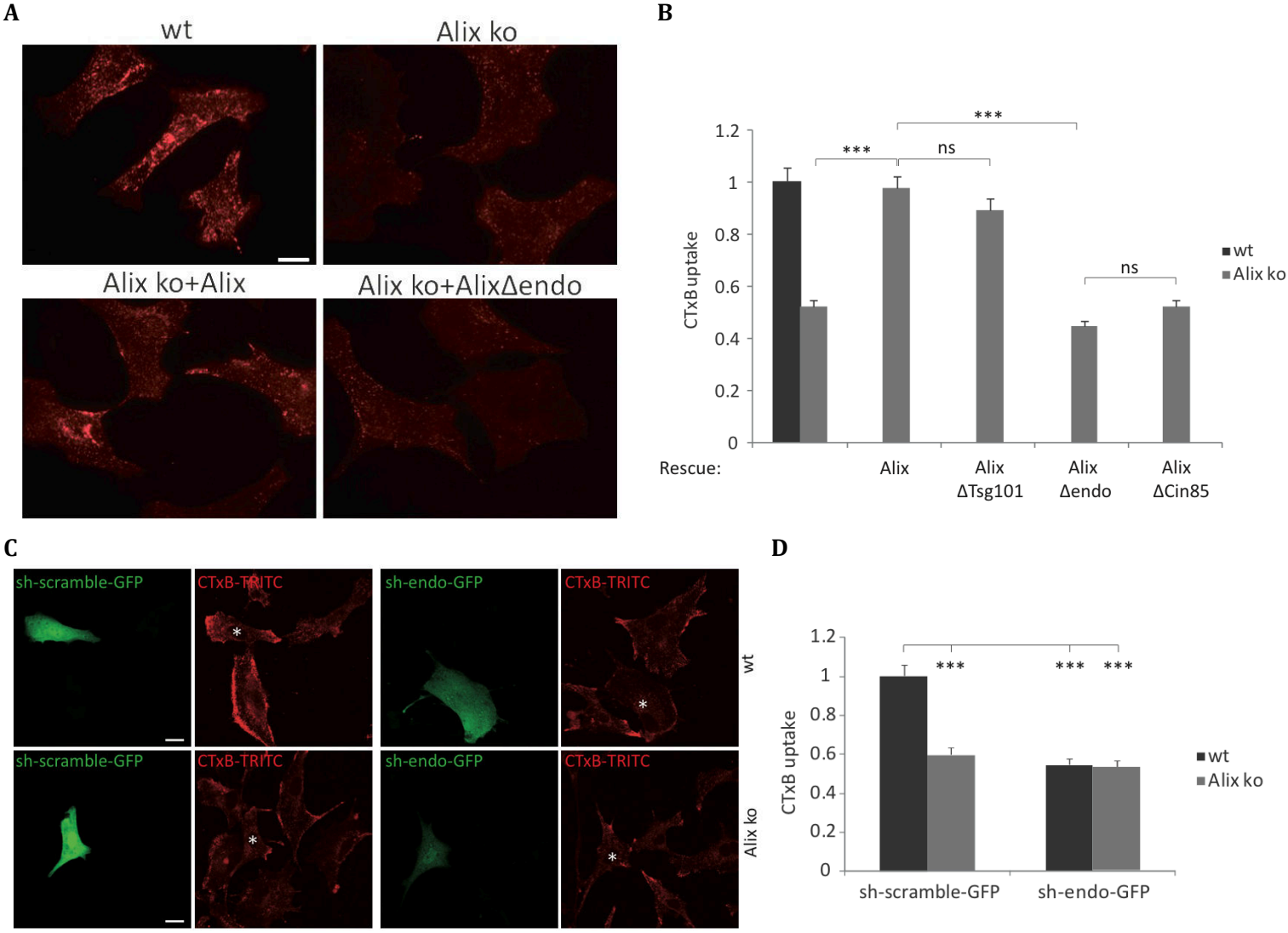



**Figure 6. Alix and endophilin A2 mediate CIE of CTxB.**

a) Alix mediated CIE of CTxB requires binding to endophilins.

CTxB-TRITC uptake by wt and Alix ko MEFs (upper panel) or by Alix ko cells transduced with viruses (lower panel) encoding for Alix (Alix ko+Alix), or for a mutant of Alix unable to bind to endophilin-A (Alix ko+AlixΔendo). Cells were incubated with CTxB during 20 min at 4°C, followed by 5 min at 37°C and acid stripping. Scale bar: 20 µm.

b) Quantification of CtxB uptake using the same type of experiments as shown in (a). Uptake of CTxB was quantified in wt or Alix ko cells or in Alix ko cells transduced with Alix or Alix deletion mutants lacking several amino-acids of the PRD corresponding to binding sites for Tsg101 (AlixΔTsg101: AlixΔP$^{717}$-P$^{720}$), endophilin-A (AlixΔendo: AlixΔP$^{748}$-P$^{761}$), or Cin85 (AlixΔCin85: AlixΔP$^{739}$-R$^{745}$). Mean fluorescence values per cell were estimated using ImageJ. (Number of cells in 3 independent experiments: wt, n= 104; Alix ko, n= 98; rescue Alix, n= 112; AlixΔTsg101, n= 117; AlixΔendo, n= 147; AlixΔCin85, n= 133. ***P<0.001, Dunn's multiple comparison test).

c) Endophilin-A2 and Alix act in a common pathway in CIE of CTxB.

wt and Alix ko MEFs were transfected with plasmids containing sh-endophilin and coding for GFP (sh-endo-GFP) or a scrambled version of the same shRNA sequence (sh-scramble-GFP), and cultured for 72 h. Cells were then incubated with CTxB-TRITC (red) for 20 min at 4°C, followed by 5 min at 37°C. Surface bound toxin was removed by acid treatment prior to fixation and processing. Asterisks indicate the nuclei of transfected cells. Scale bar: 20 µm.

d) Quantification of the experiments shown in (c). CTxB mean fluorescence values per transfected cell were calculated using ImageJ software (Number of cells in 3 independent experiments: wt sh-scramble-GFP, n= 93; wt sh-endo-GFP, n= 70; Alix ko sh-scramble-GFP, n= 76; Alix ko sh-endo-GFP, n= 67. ***P< 0.001, one way ANOVA and Dunett's test).

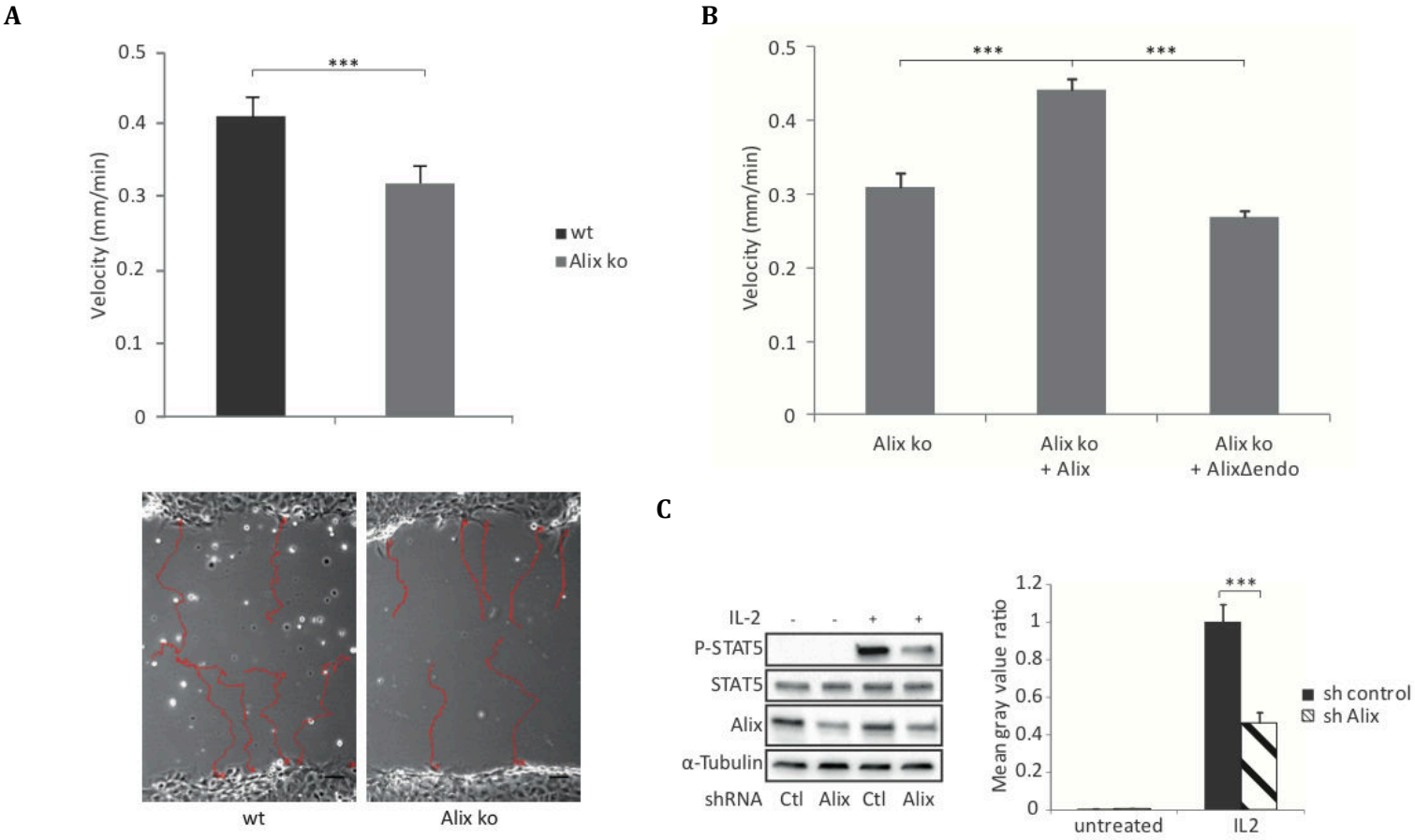



**Figure 7. Physiological consequences of loss of Alix expression.**

a) Decreased motility of Alix ko cells in a wound healing assay. Cells migrating into the gap were observed for 20 h and migration rates were measured using Metamorph (Number of cells in 2 independent experiments: wt and ko, n=200; ***P< 0.001, two-tailed Student's t-test). Representative recordings of migration tracks are shown in the lower panel. Scale bar: 50 µm. b) Phenotypic rescue of Alix ko cells transduced with Alix (Alix ko+Alix) or AlixΔendophilin (Alix ko+AlixΔendo). Velocities were measured as in (a) (Number of cells in 2 independent experiments: Alix ko+Alix and Alix ko+AlixΔendo, n=200; ***P< 0.001, one-way ANOVA and Tukey HSD).

c) Alix knock-down in EBV-B cells decreases IL2-induced phosphorylation of STAT5. Cells were transfected with pSuper-empty or pSuper-shAlix and stimulated with IL2 for 10 min. Immunoblots were performed to analyse the effect on tyrosine phosphorylation of STAT5. Band intensities were estimated using ImageJ. P-Stat5 and Stat5 intensities were normalised to a-tubulin intensities. Graph shows the ratio between P-Stat5 and Stat5 values (n=3; ***P< 0.001, two-tailed Student's t-test).

## Supplemental material

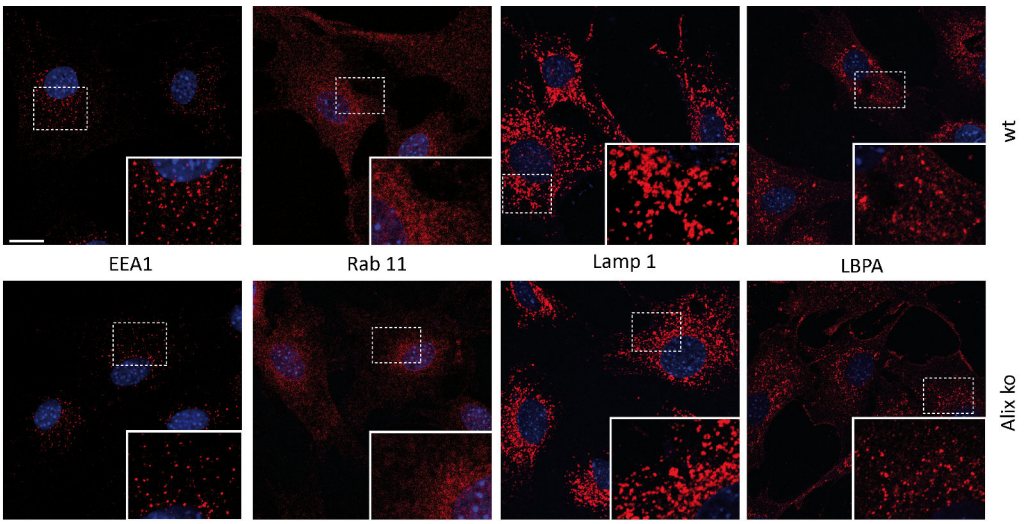



**Figure S1. Endosome size and distribution are not significantly altered in Alix ko cells.** wt and Alix ko MEFs were immunolabelled to reveal specific endosomal compartments using the endosomal markers as follows: EEA1 (early endosomes), Rab 11 (recycling endosomes), LAMP1 (late endosomes and lysosomes) and LBPA (multivesicular bodies). Scale bar: 20 μm.

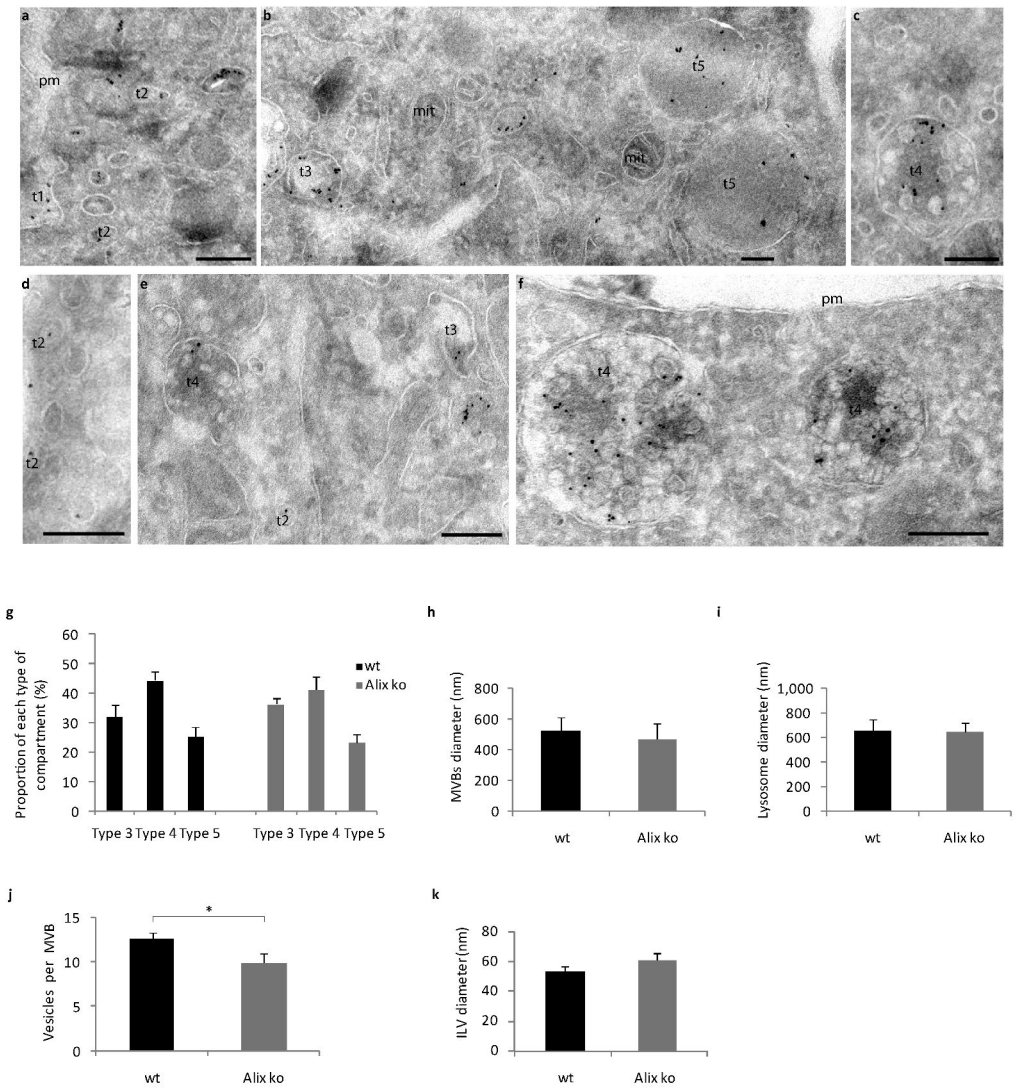



**Figure S2. Electron microscopy showing typical vesicular compartments containing internalized BSA-gold particles.**

a,b,c) wt MEFs; (d,e,f) Alix ko MEFs. type 1: plasma membrane invaginations, type 2: endocytic vesicles, type 3: early endosomal compartments, type 4: multivesicular bodies, type 5: late endosomes/ lysosomes. pm : plasma membrane, mit : mitochondria. Scale bars: 200 nm

a,d) BSA gold was observed in endocytic structures after 10 minute of internalization.

b,e) After a 20 minute chase period, BSA gold was observed throughout all types of endocytic structures including MVBs and lysosomes. c,f) Particles accumulated in type 4, MVBs following a 50 minute chase period. Note the similar morphology of MVBs in wt (c) and ko (f) cells.

Graphs show vesicle parameters for different endosomal structures in wt and Alix ko MEFs. g) Relative numbers of each type of endosomal compartments (Number of cells on 3 individual grids: wt, n= 27; Alix ko, n= 26 cells). h,i) Mean diameters of MVBs (h) and lysosomes (i) (Number of MVBs on 3 individual grids: wt, n= 137; Alix ko, n= 138; Number of lysosomes on 3 individual grids: wt, n= 117; Alix ko, n= 114). j) Average numbers of vesicles per MVB (Number of MVBs on 3 individual grids: wt, n= 95; Alix ko, n= 97. *P< 0.05, two-tailed Student's t-test). k) Mean ILV diameter (Number of ILVs on 3 individual grids: wt, n= 177; Alix ko, n= 184).

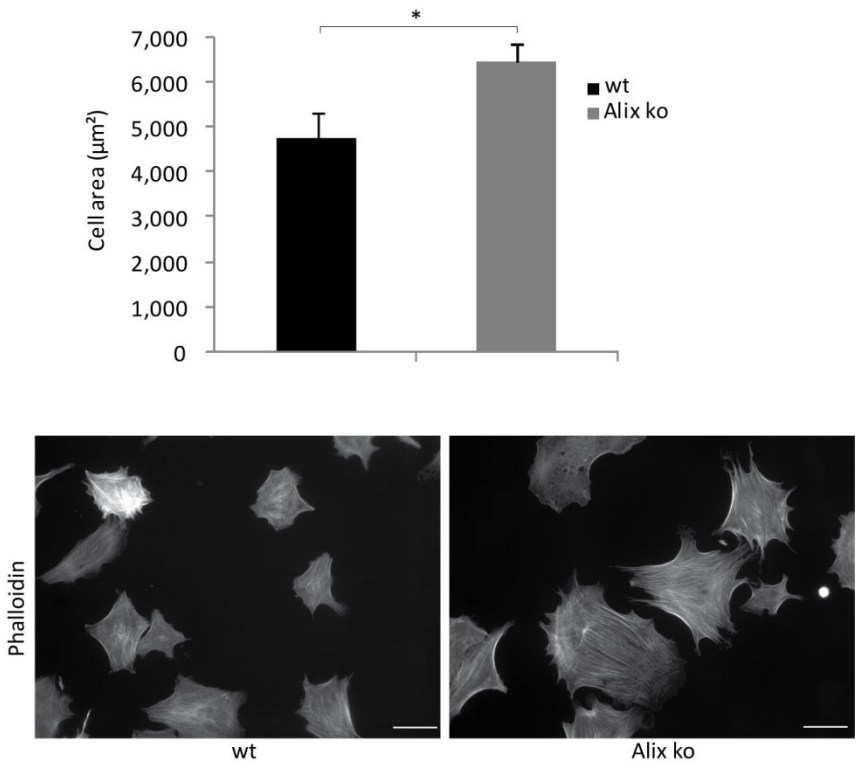



**Figure S3. The lack of Alix expression increases cell spreading.**
Dissociated MEFs were allowed to adhere to fibronectin-coated glass for 2 h. Cells were stained with phalloidin and average cell areas were calculated using ImageJ (Number of cells in 3 independent experiments: wt, n= 938; Alix ko, n= 1214; *P< 0.05, two-tailed Student's t-test). Scale bars: 20 µm.

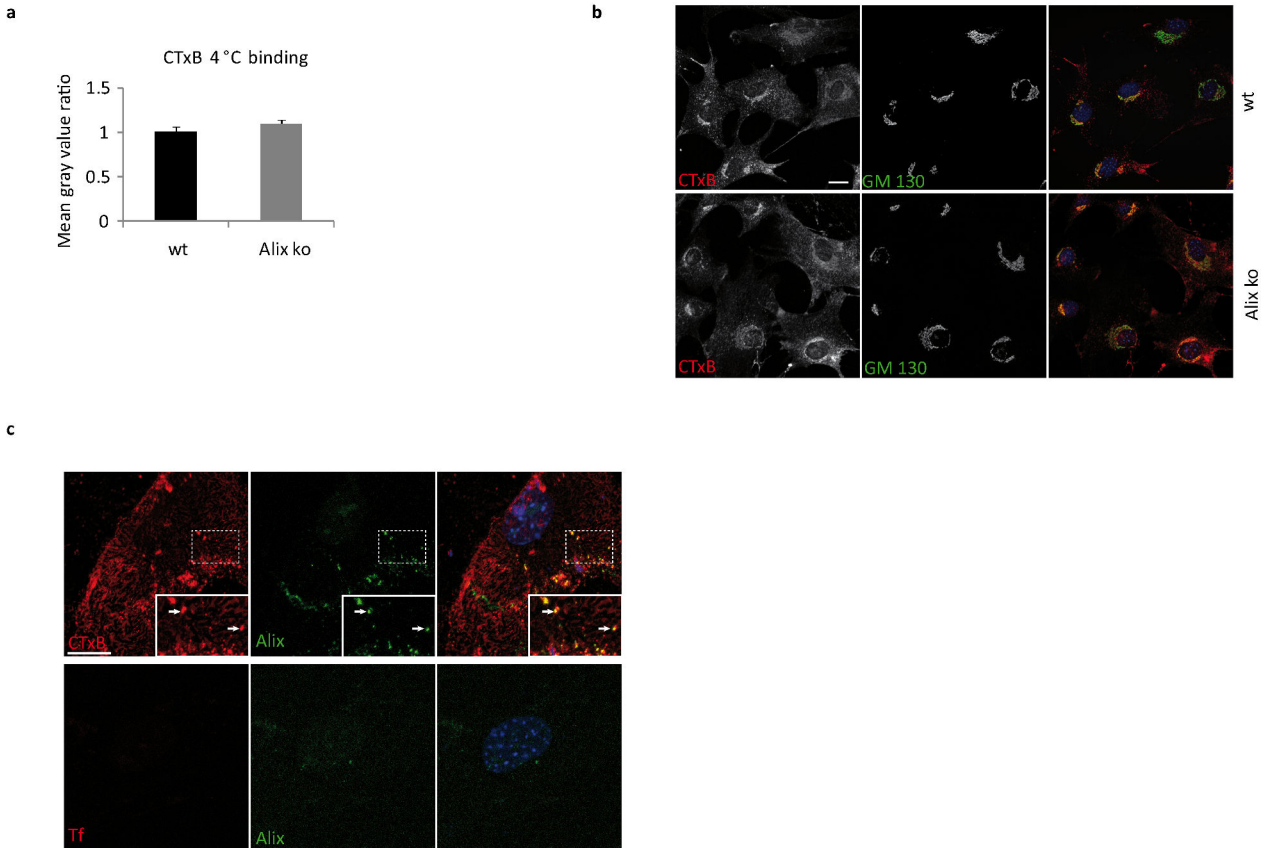



**Figure S4. a) CTxB binding does not differ between Alix ko and wt MEFs.**
wt and Alix ko MEFs were incubated with CTxB-TRITC during 20 min at 4°C and mean fluorescence values per cell were estimated using ImageJ (Number of cells in 3 independent experiments: wt, n= 98; Alix ko, n= 104).
**b) CTxB endocytosed by wt and Alix ko cells is similarly targeted to the Golgi apparatus.** Cells were incubated with CTxB-TRITC during 20 min at 4°C, washed and further incubated for 30 min at 37°C before fixation. The Golgi apparatus was immunostained using anti GM130 antibody (green). Scale bar: 20 µm.
**c) Alix colocalises to CTxB-Triton-X100-insoluble membrane patches.** Alix ko MEFs expressing GFP-Alix were incubated with CTxB-TRITC or Tf-TRITC during 30 min at 4°C. Cells were then incubated 1 min at 4°C with 0.5% Triton-X100, fixed and analyzed. Scale bar: 20 µm.

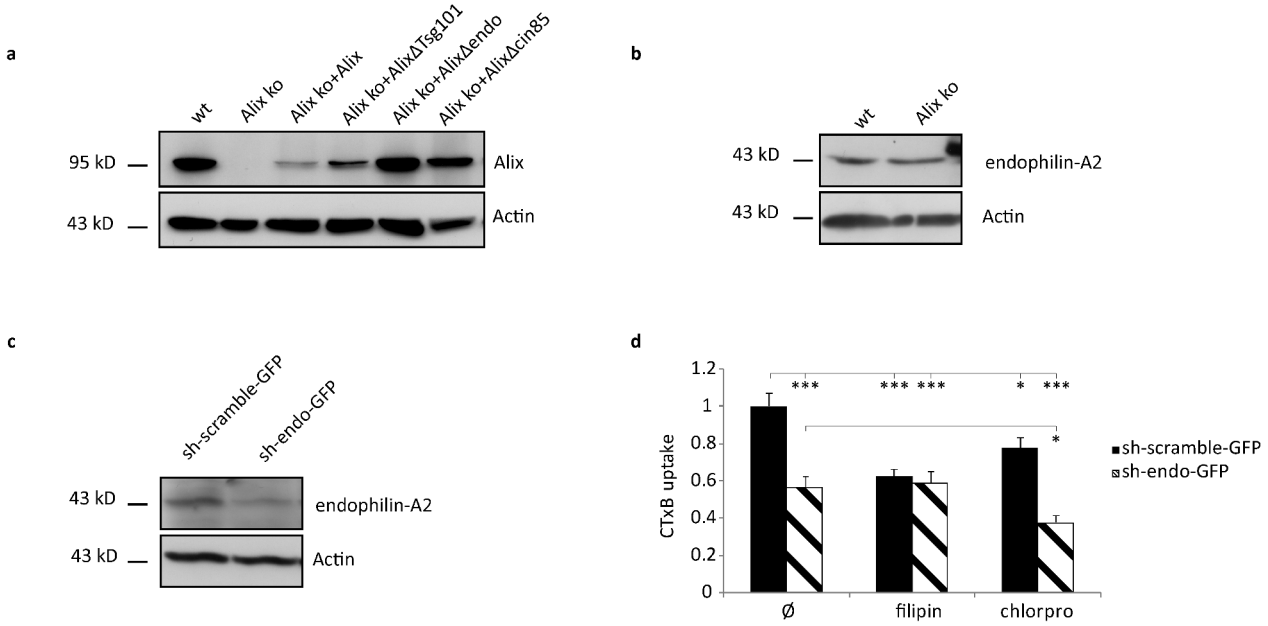



Figure S5: a) Alix levels in wt, and Alix ko cells transduced with viruses encoding for Alix and Alix mutants revealed by Western blot analysis using anti Alix antibodies.
b) Endophilin-A2 level of expression in wt and Alix ko cells revealed by Western blot analysis using anti-endophilin-A2 antibodies.
c) Western blot analyses using anti-endophilin antibodies demonstrate the efficacy of the sh-endophilin plasmid in downregulating endophilin expression in N2a cells 72h after transfection.
d) Endophilin-A2 depletion affects only CIE of CTxB.
wt MEFs were transfected with an sh vector directed against endophilin (sh-endophilin-GFP, hatched bars) or a control vector (sh-scramble-GFP, black bars). After 72 h, cells were incubated with CTxB for 20 min at 4°C, followed by 5 min at 37°C and internalized CTxB was quantified. Cells were incubated with filipin to disrupt CIE or chlorpromazine (chlorpro) to disrupt CME, prior to and during CTxB internalization (Number of cells in 2 independent experiments; sh-scramble-GFP Ø, n= 36; sh-scramble-GFP filipin, n= 30; sh-scramble-gfp chlorpro, n= 25; sh-endo-GFP Ø, n= 36; sh-endo-GFP filipin, n=29; sh-endo-GFP chlorpro, n= 33. *P<0.05; ***P<0.001, one way ANOVA and Dunett's test).

## 2. Rôle d'Alix dans le développement du système nerveux central

Les résultats de cette partie sont présentés sous la forme d'un article en préparation que je signe en premier auteur. Ma contribution personnelle a concerné les expériences mettant en évidence le phénotype de la souris Alix ko adulte. J'ai ainsi caractérisé la microcéphalie chez l'adulte, le nouveau-né et partiellement chez l'embryon. J'ai également participé à l'élaboration des recherches et à la préparation des figures de l'article. L'article en préparation est présenté en l'état, précédé du contexte dans lequel cet article s'intègre à mes travaux de thèse.

### 2.1. Contexte de l'étude

Alix a été découverte en tant qu'interacteur de Alg-2 (apoptosis linked gene 2) (Missotten et al., 1999). Depuis lors, elle a été impliquée dans divers processus contrôlant la survie cellulaire. Elle est notamment importante pour l'adhésion cellulaire, la cytocinèse et la régulation de la mort cellulaire par apoptose (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Mahul-Mellier et al., 2008; Schmidt et al., 2005; Strappazzon et al., 2010). Les fonctions cellulaires impliquant Alix sont aujourd'hui bien caractérisées. Cependant, aucun mécanisme moléculaire clair n'a été mis en évidence jusqu'à présent.

Afin de mieux comprendre la fonction physiologique de cette protéine, nous avons développé une souris knockout pour le gène *alix* (Alix ko). Ces souris sont viables et fertiles, avec une durée de vie comparable aux animaux contrôles.

L'étude du phénotype des souris Alix ko nous a permis d'observer une réduction du volume cérébral et testiculaire chez les souris adultes dont l'origine est décrite dans cet article en préparation.

L'analyse de la réduction du volume cérébral met en évidence un phénotype de microcéphalie caractérisé par une réduction de toutes les structures cérébrales observées (Figure 1). Nous nous sommes ensuite focalisés sur le cortex cérébral, une des structures les plus altérées, et avons observé une réduction de l'expansion latérale

et radiale du cortex. De manière intéressante, les cerveaux prélevés chez les nouveau-nés présentent déjà une réduction de l'expansion latérale du cortex sans aucune altération de l'expansion radiale (Figure 2). Ces résultats démontrent que la réduction de la surface du cortex est due à un défaut développemental embryonnaire et post-natal. La réduction de l'expansion latérale du cortex est observée dès les premiers stades de l'embryogenèse à E12,5 (Figure 3). A ce stade de développement, le cortex est majoritairement constitué des cellules progénitrices commençant à former les premiers neuroblastes. Ces cellules sont donc directement responsables de la dimension latérale du cortex. Nous avons tout d'abord cherché à savoir si la prolifération des cellules progénitrices était altérée. Cependant, mise à part une augmentation de la durée du cycle cellulaire, aucune altération de la prolifération n'a été observée (Figure 4). En revanche, l'apparition d'une vague apoptotique massive et transitoire entre E11,5 et E12,5, aboutit à la mort des cellules progénitrices et les neuroblastes qui en découlent (Figure 5). La disparition rapide des cellules apoptotiques, majoritairement phagocytées par les cellules de la microglie (Figure 6), permet aux progéniteurs épargnés de poursuivre la neurogenèse, aboutissant à la mise en place des couches corticales.

La réduction de l'expansion radiale, strictement post-natale, est corrélée avec une réduction de l'arborisation dendritique (Figure 7). Cette réduction de l'arbre dendritique résulte d'un retard de pousse neuritique associé à une altération du cône de croissance. Les réarrangements morphologiques du cône de croissance responsables de la pousse neuritique sont étroitement associés à l'endocytose des molécules d'adhésion telles que les intégrines. Nous avons pu observer que l'endocytose induite par l'ajout de toxine du choléra, en partie indépendante de la clathrine, est également altérée dans les neurones Alix ko (Figure 9).

Ces résultats démontrent que la protéine Alix est requise pour le développement normal du cortex cérébral aussi bien pendant les stades embryonnaires que post-nataux. Les défauts observés en absence d'Alix peuvent s'expliquer par la capacité d'Alix à contrôler la mort par apoptose et par sa fonction nouvellement décrite dans l'endocytose indépendante de la clathrine.

## 2.2. Article 2 – « Alix is required for development of the mouse brain to normal size »

**Alix is required for development of the mouse brain to normal size**

Marine Laporte[1,2], Christine Chatellard-Causse[1,2], Victoria Vauchez[1,2], Fiona J. Hemming[1,2], Jean-Christophe Deloulme[1,2], Frédérique Vossier[1,2], Béatrice Blot[1,2], Sandrine Fraboulet[1,2*] and Rémy Sadoul[1,2,*]

1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 836, F-38042 Grenoble, France

2) Université Grenoble Alpes, Institut des Neurosciences, F-38042 Grenoble, France

* corresponding authors

**Running Title:** Alix knock-out microcephaly.

**Keywords:** Neural progenitors, neurite outgrowth, apoptosis, PDCD6IP, testis.

## Abstract

Alix (ALG-2 interacting protein X), has been assigned roles in membrane deformation and fission both in endosomes and at the plasma membrane and thereby intervenes in numerous biological processes ranging from virus egress, cell proliferation to apoptosis. Here we have developed a mouse line knock-out for *alix* . Alix ko mice do not differ from wild type littermates in size and lifespan and all organs appear normal except for testis hypotrophy and severe reduction in the brain volume. Remarkably, organization of the small brains is an essentially normal with all regions being equivalently reduced. Selectively knocking out *alix* in neural progenitors also led to microcephaly. We focussed our study on the cerebral cortex, which has a reduced surface and thickness but shows unperturbed layering. In embryos, proliferation of cortical progenitors is unaffected, but massive and transient apoptosis occurs in E11.5 and E12.5 telencephalon of Alix ko mice. We also demonstrate that Alix is required for normal dendritic development post-natally allowing the thickening of cortical layers. Thus, Alix is required during early embryogenesis of the central nervous system to prevent apoptosis of neural progenitors and post-natally for dendrite outgrowth, and therefore represents a master switch for sizing the brain.

## Introduction

The endolysosomal system is central for integrating multiple cellular activities explaining why its disruption is associated with numerous pathologies.

Among the main actors of the sorting proteins destined for degradation in lysosomes are endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT). These complexes deform endosomal membranes into intraluminal vesicles but also also drive topologically identical deformations of the plasma membrane processes to allow virus budding, cytokinesis or membrane repair [1]. One key protein in recruiting ESCRT proteins onto membranes is Alg-2 interacting protein X (Alix), a 95 kD cytoplasmic protein binding both CHMP4B of ESCRT-III and the Tsg-101 component of ESCRT-I [2-4]. Alix also binds to Cbl Interacting protein-85 (CIN85) and endophilin-A, which are both involved in endocytosis. Alix is ubiquitously expressed [2] and has been described as involved in numerous biological processes including programmed neuronal death [5,6], virus egress [7], cytokinesis [8], cell spreading [9,10], membrane repair[11], in ways tightly dependent on its capacity to recruit ESCRT proteins. More recently Alix was also found to drive clathrin independent endocytosis through interactions with endophilins and CIN-85 (Mercier et al. submitted).

In order to better appreciate the role of the protein in vivo, we have made an Alix ko mouse line. We report here that these mice are viable and appear normal except for severe reduction of the size of testes and brain. We propose an explanation for how the microcephaly due to the lack of Alix takes place.

The size of adult brains is the result of a delicate balance between neural progenitor proliferation, differentiation and neurite outgrowth, which occur both during the embryonic period and postnatally. The telencephalon gives rise to the cerebral cortex and the basal ganglia. During early development, proliferation of the neuroepithelial cells surrounding the ventricle allows thickening of the telencephalon [12]. Between embryonic days 9.5 (E9.5) and 10.5 (E10.5) in the mouse, neuroepithelial cells mature into radial glial cells (RGCs), which are the progenitors cells during the subsequent neurogenesis starting around E11.5. At this time RGCs can divide asymmetrically to give rise to neuroblasts or intermediate progenitors which then divide away from the ventricule to generate neurons [13]. Newly generated neuroblasts migrate along RGC

processes towards the pial surface to form the cortical neuron layers. The lateral expansion of the neocortex during embryonic development is the result of the proliferation and survival of RGCs, whereas the radial dimension is dictated by the extent of neurogenesis. Thus, a reduction of the lateral dimension of the neocortex, likely due to a deficit in the number of RGCs, or a reduction in the radial dimension, caused by impairments in neurogenesis, might both lead to smaller brains [14].

We observed a massive but transient wave of apoptosis in the dorsal telencephalon of Alix ko embryonic brains, which occurs around E11.5 and E12.5. Subsequent developmental steps appear normal giving rise to P0 brains with reduced volumes but normal cortical layering and thickness. However, postnatal development is altered as shown by the thickness of the cortex, which is significantly reduced in adult animals. This post-natal alteration is not due to a loss of cells but correlates with a reduction in postnatal neurite extension detected both *in vivo* and *in vitro*. Thus, in vivo, Alix plays major roles in controlling brain size by controlling RGCs survival at the start of neurogenesis and later on by regulating post-natal dendrite development.

## Results

### *Alix* knock out results in mice with smaller brains and testes

We made *alix* floxed animals that we crossed with mice expressing Cre under an actin promoter to knock out *alix* ubiquitously (Fig.S1). As already described elsewhere, Alix is expressed in all organs and we showed that the protein is absent from all the organs tested from Alix ko animals (Fig. S2C). Despite this, Alix ko mice had a normal life span and the body weight of embryos, pups and adults was not different between ko and wt littermates (Fig. S2A). The size of the adult animals was also equivalent between wt and Alix ko animals as assessed by the length of the femur, (Fig. S2B). No gross organ abnormalities were detected, except for the testes which were severely reduced in size, but had an apparently normal organization (Fig. S2D,E). The only other obvious difference in the mutants was the significant reduction in their brain volume (Fig. 1). The reduced brain size of Alix ko compared to wt littermates was already obvious at birth (Fig. 1A) and the total brain weight reduced at all ages studied (Fig. 1B). T2-weighted MRI sections of the brain of adult living animals demonstrated a 30% reduction in total brain volume, with brain ventricules almost doubled in size (Fig. 1C). Examination of anatomically matched hematoxylin/eosine (not shown) or Cresyl violet-stained coronal sections of adult brains, showed no gross abnormalities in the overall brain architecture despite a significant reduction in the size of all regions examined (Fig. 1D). This is in agreement with the fact that Alix is equally expressed in all regions examined in wt brains (Fig. 1E).

### Alix ko cortex is thinner but normally layered.

We then focussed our study on the neocortex, which was reduced in both the medial-to-lateral and radial dimensions of Alix-ko adult brain (Fig. 2A,B). Noteworthy, the thickness of the neocortex was equivalently reduced all along the antero-posterior axis (not shown). The layer organization of the adult cortex seemed preserved even though all layers were thinner, with layers 5/6 being the most affected (Fig. 2C). In contrast, at P0 the size of the cortex was only significantly reduced in the medio-lateral dimension

whereas it was slightly but not significantly diminished in the radial dimension (Fig. 2D,E), in good agreement with the fact that the number of DAPI stained nuclei counted in the radial dimension was the same in mutants and wt P0 cortex (Fig. S6A). Immunostaining with antibodies against cTip2 to better discriminate cortical layers of P0 brains, showed no significant difference in the thickness of the different layers, even though there was a tendency for a reduction in layers 5 and 6 (Fig. 2F). Thus, in Alix ko brains, the decrease in the length of the neocortex observed at P0 indicates an impairment of lateral expansion during embryogenesis (Fig. 2E), whereas a thinner cortex only seen in adult and not P0-brains, uncovers Alix-driven processes implicated in the postnatal thickening of the neocortex (see below).

**The ventricular surface and progenitor number are reduced in Alix ko embryos.**

The reduction in the medio-lateral cortical length seen at P0, without significant changes in cortical layers, suggests that Alix ablation affects the number of neural precursors without impairing their competence to differentiate into neuronal cell types. In order to test this, we next studied early embryogenesis in the dorsal telencephalon. We found that the length (Fig. 3A,C) and thickness (Fig. 3B,C) of the dorsal telencephalon of Alix ko embryos are already reduced at embryonic day 12.5 and 13.5 (E12.5, E13.5). The reduced thickness was correlated with a significant drop in the number of DAPI stained nuclei counted in the radial dimension of E12.5 Alix ko embryos (Fig.3D). Quantification of cells immunostained with Tbr2, which labels intermediate progenitors directly generated from RGCs, showed a decreased in their numbers in Alix ko E13.5 telecephalon (Fig.3E). Furthermore, immunostaining of E13.5 telencephalon with Tuj-1, which recognises newly formed neurons building the cortical plate, demonstrated a reduction in the thickness of this layer in Alix ko brains. Thus, these observations suggest that during early development, Alix ko telencephalon contains fewer neural precursors and as a consequence fewer Tbr2 and Tuj-1 positive neurons which differentiate from these precursors.

**The lack of Alix expression does not affect proliferation, but results in transient apoptosis of neural precursors.**

The reduced number of neural precursors in Alix ko animals could be due to a decrease in cell proliferation or to an increase in cell death. To quantify cell proliferation, we first used the mitotic (M)-phase marker phospho-histone H3 on E12.5 embryo sections. As shown on Figure 4A, no significant difference was observed in the number of M-phase cells even though a tendency for more M-phases could be detected in the basal part encompassing the SVZ.

To label E12.5 cortical progenitors undergoing S-phase, pregnant mice were injected with BrdU and sacrificed 1.5h later. BrdU fluorescence intensity per surface area of the VZ was increased by 30% in Alix ko embryos (Fig. 4B), reflecting an equivalent increase in the percentage of BrdU positive cells (not shown). This is unlikely to result from an increase in the cell proliferation rate given the lack of increase in M-phase cells at the same age. Instead, flow cytometry analysis of dissociated E12.5 cortical cells suggests a longer S phase shown by an increase S-phase and a decrease of cells in G1/G0 (Fig. 4C). Surprisingly, FACS analysis did not reveal any increase in 4N or 8N cells as might have been expected from the reported necessary function of Alix and ESCRT complexes during cytokinesis.

As proliferation defects do not seem to explain the observed reduction in the cortex size, cell death was investigated at early embryonic stages using antibodies against the active form of caspase-3 (C3a) to label apoptotic cells. As expected, no labeling could be observed in the dorsal telencephalon of E.12.5 wt embryos (Fig. 5A). In sharp contrast, a high number of C3a positive cells was observed in Alix ko 12.5 telencephalon homogeneously distributed along the rostro-caudal and medio-lateral dimensions (Fig.5A) including the ganglionic eminences but not in the midbrain (data not shown). Western blot analysis of dorsal telencephalon protein extracts prepared at different embryonic stages, revealed a sudden rise of caspase-3 activation peaking at E.11.5, and declining at E12.5 to become almost undetectable at E13.5 (Fig.5B). On sections of E11.5 telencephalon, C3a was detected in cells often aligned radially whereas at E12.5, C3a positive cells were scattered and more abundant in the basal half of the telencephalon (Fig. 5C,D). A similar distribution of dying cells was observed in E12.5 embryos using TUNEL labeling (Fig. 5C, upper panel). Co-immunostaining with Tuj-1, revealed Tuj-1 expressing cells stained with C3a or TUNEL (arrowheads, fig.5C). Most of the Tuj-1 dying cells were found within the preplate and more rarely in the ventricular

zone (VZ). Immunostaining for nestin at E11.5, allowed us to reveal activation of caspase-3 inside some nestin positive RGCs (Fig.5D). Thus, our results suggest that, at the beginning of neurogenesis, Alix is necessary for the survival of some RGCs and of their daughter cells including Tuj-1+ neuroblasts and Tbr2+ intermediate progenitors. Of note is that Alix seems equally expressed in all cells of the E12.5 telencephalon (Fig. S3A,B). Another striking feature of E11.5-13.5 Alix ko brains is the presence of aggregates of pyknotic nuclei, found scattered throughout the entire cortical wall (Fig 6A.). Pyknotic-nuclei containing-aggregates were not seen at E15.5, an age when C3a could no longer be detected (data not shown). Immunofluorescent staining of IBA1, which is expressed by microglia, revealed that the pyknotic nuclei were often engulfed inside IBA1 positive cells (Fig6B). Electron microscopy also revealed typical pictures of clusters of dying cells containing apoptotic bodies and other electron-dense amorphous materials with unidentifiable organelles, which were clearly surrounded by a healthy engulfing cell (Fig.6C). Thus, apopotosis occurring inside Alix ko telencephalon is accompanied by an increase of microglial proliferation or invasion allowing the disposal of apoptotic bodies.

We conclude that the lack of Alix expression induces apoptosis of neural progenitors around E11.5 when differentiation of RGC into neuroblasts begins. This abnormal cell death seems to compromise lateral expansion of the cortex. We verified that the microcephaly phenotype of Alix ko mice is due to the lack of Alix expression in neural precursors by using conditional Alix ko animals (Nestin;Alix$^{fl/fl}$) obtained from crossing Alix –floxed mice (Alix$^{fl/fl}$) with nestin-Cre mice, which express cre recombinase in embryonic precursors starting around E10.5 [15]. Western blot analysis of different organs of Nestin;Alix$^{fl/fl}$ mice showed that Alix was barely detectable in brain extracts but normally expressed in all other organs, apart from kidney were nestin is also present (Fig. S4A,B). Adult cortex sections of Nestin;Alix$^{fl/fl}$ showed a reduction in the length and thickness of the cortex similar to that observed in Alix ko mice (Fig. S4C). This demonstrates that microcephaly detected in Alix ko mice is the consequence of the lack of Alix expression in neural progenitors.

Interestingly, the level of apoptosis in cultured neural precursor cells dissociated from E12.5 telencephalon was not different between wt and Alix ko cells, suggesting that caspase-3 activation occurring *in vivo* is not a cell-autonomous process (Fig. S5).

After the transient caspase-3 activation from E11.5 to E12.5, differentiation and neuroblast migration seem to occur normally as shown by the apparently normal cortex layering observed at P0. It must be noted that the lack of *alix* leads to a lethal phenotype with varying penetrance. Indeed we observed a significant reduction in the proportion of homozygous Alix ko mice born from Alix heterozygotes crossings (15 % vs the expected normal 25 % Mendelian ratio). Lethality must occur after E12.5 since we found normal Mendelian ratios in E12.5 litters, reinforcing our observation of a normal development until E10.5 (Fig. S3C).

**Lack of Alix expression impairs postnatal dendrite development.**

As stated above, the neocortical thickness was significantly reduced in adult Alix ko brains but not significantly different in P0 animals, pointing to a deficiency in the thickening of the neocortex layers in Alix ko animals. Despite the reduced thickness seen in Alix ko animals, the number of neurons in the radial dimension was equivalent to that of wt animals, correlating well with the higher density of NeuN positive neurons in Alix ko animals (Fig. S6B,C). This shows that the reduced thickness of the cortex is not due to excessive post-natal neuronal death occurring in Alix ko animals. The higher neuronal density is not due to a smaller size of Alix ko neurons which seems equivalent to that observed in wt (Fig. 6E). Glial cell differentiation from neural precursors occurs late in development and contributes to the radial growth of the cortex. Thus, another possibility could be a lower number of glial cells in Alix ko animals. This does not seem to be the case as the ratio between the number of NeuN positive neurons and the total number of DAPI positive cells is not different between wt and mutant cortices (Fig. S6D). Another contributor to radial growth is dendritic outgrowth and we therefore determined whether the lack of Alix expression had impaired this process. To test this, brains of 2 month-old animals were stained using the Golgi method and dendrites of neurons from layers 5 and 6 analyzed using Sholl analysis. As shown in Fig. 7 (A,B) dendritic arborisation is significantly reduced in Alix ko animals. Defects in arborization were also observed in 2 week-old cultures of hippocampal neurons dissociated from P0 Alix ko brains, suggesting that the defect in dendritic arborization seen *in vivo* is intrinsic to Alix ko neurons (Fig. 7C,D). Furthermore, we found that early steps of neuritogenesis were affected by Alix ablation, since the number of neurites growing from dissociated neurons cultured for 24h was significantly reduced in Alix ko neurons

(Fig. 8A,B). On the same neurons, we also observed a delay in the maturation of axons as well as a reduced axonal and dendritic outgrowth (Fig. 8C,D). These defects in neurite outgrowth could be related to abnormal architecture, and actin organisation of growth cones that we observed in Alix ko neurons (Fig. 9A,B).

Growth cone activity is highly dependent on endocytosis, which allows the fast recycling of surface molecules required for growth cone movements. Since we recently demonstrated that Alix selectively controls clathrin-independent endocytosis in fibroblasts and thereby their migration, we tested if Alix ko growth cones are impaired in this type of endocytosis. Quantification of the uptake of the B chain of Cholera toxin (CTxB), a prototype for cargoes entering cells through clathrin independent endocytosis [16], indeed revealed significantly delays, indicating that the lack of Alix in neurons perturbs endocytosis at growth cones (Fig.9C,D). Thus, Alix ko neurons suffer from impaired neuritogenesis and differentiation, which could explain some of the defects in the postnatal radial expansion of the cortical layers.

## Discussion

The development of the mammalian brain involves a series of mechanisms including progenitor cell proliferation, survival and differentiation, neuronal migration and neurite outgrowth and impairment in any one of these is susceptible to influence brain size and organization.

In this study we present the first analysis of a mouse mutant for *alix*. We show that knocking out *alix* has a major effect on the size of the brain without affecting its global organization. We concentrated our study on the development of the cortex and found that the lack of Alix expression leads to massive apoptosis of neural progenitors, which peaks at E11.5 and is already returned to normal at E13.5. Past this abnormal apoptosis phase, we found a significant reduction in the length of the P0 and adult cortex even though the cortical layer organization was intact. Remarkably we found no significant difference in the thickness of the P0 cortex, whereas it was reduced in adult animals, a reduction that we correlated with impairments in dendrite outgrowth. In the embryo, apoptosis affects radial glial cells (RGCs) and their neuroblast progenies, as shown by caspase-3 activation in both Nestin- and Tuj1-positive cells. Interestingly, none of the Tbr2+ intermediate progenitors were labeled with C3a, consistent with the fact that no apoptotic cells could be detected at E13.5 a time at which the Tbr2+ cell number is massively increased. Therefore, the decrease in Tbr2+ positive cells seen at E13.5, seems to result from the earlier decrease in the number of RGCs. At E11.5, C3a positive cells were often aligned radially suggesting that they correspond to cells originating from, and migrating on the same RGC. At E12.5 the dying cells were more scattered in the basal part of the ventricular zone but Tuj1+ dying cells were almost exclusively found in the cortical plate suggesting that apoptosis can also occur at later stage of the neuroblast differentiation.

The extent of apoptosis is known to influence the size of the developing cortex as shown by caspase-3 and 9 which lead to overgrowth of the neocortex [17,18]. On the other hand increase in apopotosis as a consequence of Notch or EphA misregulations leads to microcephaly [19,20]. In Alix ko the transient but massive apoptosis has obvious consequences on the length but not on the thickness of the P0 neocortex. Our results are therefore fully compatible with the radial unit hypothesis predicting that

depletion of early progenitors and of their progeny will affect the lateral expansion of the neocortex [14]. In Alix ko brains the very limited window of cell death allows the surviving RGCs to give rise to their normal progeny and therefore do not impair the growth of the neocortex in the radial dimension.

Alix has been involved in the control of cytokinesis by recruiting ESCRT complexes at midbodies in order to allow their fission [21] and one could hypothesize that apoptosis occurs during abortive mitosis of neural precursor cells (NPCs). In fact mouse and rat mutants have revealed that defects in cytokinesis may lead to microcephaly phenotypes reminiscent to that seen in Alix ko mice [22,23]. However, this possibility seems very unlikely as abnormal caspase activation in Alix ko cortical NPCs is only *observed in situ* and not in dissociated cultures, indicating that it is not a cell autonomous process. Furthermore, unlike published work using siRNA to downregulate Alix [21,24], we have not been able to observe any impairment of cytokinesis in Alix ko fibroblasts (Chatellard et al. unpublished). Finally no increase in pluri-nucleated cells indicative of defects in cytokinesis could be detected in Alix ko brains.

Our previous work has shown that Alix also controls cell death through its capacity to modulate caspase-9 and 8 activites [25,26]. Indeed we showed that overexpression of the protein in the chick neural tube provokes a massive apoptosis of the neuroepithelial cells leading, 48 h later, to a 25 % reduction in the width of the neural epithelium [5]. Thus, both the overexpression and the absence of Alix have the same effects on the survival of NPCs. This suggests that the absence or the excess of Alix have similar consequences on the balance of apoptotic regulators, which, when deregulated leads to caspase activation. Noteworthy, the deleterious effect of Alix misregulation seems to be specific to NPCs and neurons since neither overexpression nor downregulation of the protein threatens the survival of non neural cells.

Apoptosis during development of the telencephalon is tightly regulated by cell-cell interactions, growth factors and interleukins, which act in concert to sustain survival or trigger apoptosis [27]. Notch points out as a main regulator of the integrity of RGCs in part through regulation of apoptosis of both RGCs and of their direct progenies [19]. This occurs through activation of Notch from RGCs by its ligand Delta-like-1 expressed by neuroblasts and intermediate progenitors [28,29]. We have recently demonstrated

that Alix is necessary for clathrin-independent endocytosis (Mercier et al. submitted) and Delta-1 can be endocytosed independently of clathrin a way of entry which can allow Notch activation [30]. One may therefore postulate that defects in Notch ligands internalization leads to apoptosis of both RGCs and their progeny. Other signalization pathways including those controlled by Wnt, EphA, FGF, which were all shown to control the fate of RGC could also possibly be impaired by the absence of Alix and thereby transiently induce apoptosis [20,31,32]. Further work is now needed to discover which of these pathways might be altered in Alix ko brains and thereby induce NPC death.

In contrast to newborns, the smaller cortex of adult Alix ko mice is not due to a reduction in the length but also in the thickness of the cortical wall. This incapacity of the cortex to expand radially after birth correlates well with an impairment in dendrite outgrowth that we could demonstrate *in vivo*. This impairment seems intrinsic to the neurons as we observed that Alix ko P0 neurons take more time to grow neurites after their plating and in older cultures their arborization is simplified. The growth and arborisation of neurites is under control of growth cones, and these appear abnormal in Alix ko neurons. Furthermore we found that the absence of Alix retards clathrin-independent endocytosis at growth cones. Endocytosis is a fundamental process for growth cone movements as it allows the tight regulation of the surface expression of adhesion molecules and integrins needed to grow on different substrates [33]. Thus, the absence of Alix seems to affect growth cones and this could be tightly related to the defects in dendrite outgrowth necessary for the post-natal radial expansion of the cortical wall.

In most cases human microcephaly, is accompanied by defects in brain architecture [34]. Exceptions to the rule are the autososomal recessive primary microcephalies (MCPH) in which the brain and cortex organization remain grossly normal [35]. Until today most genes causing these diseases (MCPH1-12) code for proteins related to the mitotic spindle or centrosome. A number of ko mouse lines have been made to model MCPH. When not lethal, they lead to microcephalies with severe decrease in the number of cortical neurons in both the length and the radial dimension. Alix ko microcephaly is to our knowledge unique in that it affects only the lateral expansion of the embryonic cortex and its radial expansion after birth.

## Materials and methods

### Generation of Alix knockout mice

C57BL/6N mice with an *Alix* floxed allele were generated by la Clinique de la souris (Strasbourg, France). Briefly, a flippase recognition target (FRT)-flanked neomycin cassette was inserted downstream of exon 2 of the *alix* gene. The *loxP* sites were inserted upstream and downstream of exon 2. The floxed mice were then backcrossed with Rosa26-FlpE mice to remove the neomycin cassette and with either Actin-Cre or Nestin-Cre mice to obtain complete ko (Alix ko) or conditional ko restricted to the brain (Nestin;Alix$^{fl/fl}$) respectively. In both cases, the Cre recombination changes the reading frame introducing a stop codon at 10718 pb of *alix* gene thus abolishing the expression of Alix protein (Fig. S1).

### Animals

Animals were handled and killed in conformity with European law and internal regulations of INSERM. Pregnant heterozygotes (for *alix)* females were sacrificed, the embryos removed by Caesarean section and their brains dissected for further treatment. Adult wt and ko mice of both sexes were sacrificed by cervical dislocation to obtain brains (and occasionally testes). Newborn pups (P0) were used for primary neuron cultures.

### Antibodies and other reagents

See table 1 for antibodies used in this study.

Cresyl violet, haematoxylin, eosin, BrdU, laminin, poly-D-lysin, phalloidin-Texas red (Sigma), TUNEL detection kit (In Situ Cell Death Detection kit; Roche), Golgi staining kit (generous gift of Dr F. Du, FD Neurotechnologies, Baltimore, USA), cholera toxin B (CTxB)(Molecular probes).

### Cell culture and transfections

Primary cultures of neural progenitor cells were prepared as follow. Cortices from E12.5 embryos were dissected in HBSS containing 2 mM $MgSO_4.7H_20$, 10 mM HEPES, 0.1% penicillin/streptomycin. After removing meninges and white matter, dorsal telencephalons were isolated by removing lateral and medial ganglionic eminences and treated with 0.05% trypsin-0.53mM EDTA for 10 min at 37°C. Following trypsinization, cells were washed three times with HBSS, mechanically dissociated and then seeded at 25 000 cells/cm$^2$ on coverslips in DMEM/F12

medium containing 2 mM glutamine, 1% B27 complement, 20 ng/ml EGF and 10 ng/ml bFGF. Coverslips were coated with 100 µg/ml poly-D-lysine overnight and then with 20 µg/ml laminin for 2 h.

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as follow. Briefly, hippocampi were dissected from P0 mouse pups in HBSS, treated with trypsin-EDTA 0.25%-1 mM for 10 min at 37°C followed by, 2 mM trypsin soybean inhibitor for 2 min at 37°C. Tissues were washed and dissociated in HBSS by five cycles of aspiration and ejection through a micropipette 1000 ml tip followed by ten cycles with a micropipette 200 ml fixed to the 1000 ml tip. Dissociated hippocampal cells were seeded in seeding medium (DMEM containing 10% horse serum, 0.5 mM L-glutamine) in 35 mm dishes containing 14 mm coverslips. pre-coated for 4 h with 50 mg/ml poly-D-lysine followed by 10 mg/ml laminin for 1 h . After adhesion for 3 h, the seeding medium was replaced by serum-free neuronal culture medium (Neurobasal medium containing 2% B27 complement, 0.5 mM L-glutamine).

For Sholl analysis, neurons were transfected at 13 DIV using a calcium phosphate method optimized for highly mature neuronal cultures (Goetze et al., 2004; Jiang and Chen, 2006). Five microliters 250 mM $CaCl_2$ were added to 45 ml water containing 3µg DNA, mixed and immediately added dropwise to 50 ml 2 N, N-Bis (2-hydroxyethyl)- 2 aminoethanesulfonic acid (BES)-buffered saline solution, pH 7.1. The mixture was gently stirred by tapping the tube and bubbling air once, left to incubate for 10 min, and added to coverslips in 1 ml of transfection medium [Eagle's MEM containing 2.2% NaHCO3 and supplemented with 2% B27, 0.5 mM glutamine, and 20 mM glucose]. After 1 h in the incubator, the coverslips were transferred to dishes containing 2 ml transfection medium (without B27) pre-incubated for 30 min in 10% $CO_2$. The dishes were quickly returned to 5% CO2 and left for 5–10 min before returning the coverslips to their original (conditioned) neuronal culture medium. Neurons were fixed 20 h after transfection.

**Histology**

Embryos (E11.5-15.5) and postnatal mice (P0) were dissected in PBS and heads or brains were fixed for between 1.5 h and overnight at 4°C with 4% paraformaldehyde (PFA) in 120 mM phosphate buffer pH 7.4, 4% sucrose. For cryosectioning, the samples were further equilibrated at 4°C in 30% sucrose in phosphate buffer and then embedded in 15% gelatin in phosphate buffer containing 30% sucrose and frozen at -65°C in chilled isopentane and stored at -80°C. All

cryostat sections were cut at 14 µm for embryos and 16 mm for P0, attached to Superfrost Plus microscope slides (Thermo Scientific) and stored at -20°C before use.

Adult brains were dissected and either frozen in chilled isopentane for cryosectioning (at 16mm) or fixed in Carnoy's solution (60% ethanol, 30% chloroform, 10% acetic acid) for 4 h before further dehydration in alcohol 100%, clearing in butanol (2 x 1 h) then paraffin embedding and sectioning (at 7 mm). Coronal sections were stained with haematoxylin-eosin or Cresyl violet.

Testes were pierced at their extremities with a fine needle and immersion fixed overnight in Bouin's fluid (6% formol, 5% acetic acid in saturated picric acid). During dehydration they were cut transversally into two halves and then paraffin embedded and sectioned as above. Sections were stained with haematoxylin-eosin.

**Immunofluorescence and immunohistochemistry**

For cryosections, immunofluorescence staining was performed after rehydration for 10 min in PBS followed by permeabilization with 0.3% Triton X-100 in PBS for 45 min. Non-specific sites were blocked by incubation in 10% Goat Preimmune serum (GPi) for 45 min before primary and secondary antibody incubation. Unfixed antibodies were washed out by 0.1% Tween20 in PBS.

Antigen retrieval was performed for the antibodies indicated (See Table 1) by boiling in a cooker in 10 mM sodium citrate pH6, 0.1% Tween20, followed by 5 washes in PBS. Primary antibody was incubated overnight at 4°C and the secondary antibody for 2 h at room temperature. All sections were co-stained with DAPI.

NeuN was revealed on paraffin sections by immunohistochemistry as described previously (Hemming et al 2004): endogenous peroxidase was blocked by hydrogen peroxide (10 min, 0.3%), anti NeuN was incubated overnight at 1/500 in 0.1 M Tris-buffered saline, pH 7.6 (TBS), and revealed by biotinylated anti-mouse/anti-rabbit secondary antibody (Vector, Burlinghame, USA) followed by amplification by horse-radish peroxidase-(HRP) conjugated avidin-biotin and Vectastain Elite revelation with nickel intensification. TBS Tween was used for washing.

For cell cultures, neurons or NPC were fixed by 4% PFA containing 4% sucrose in PBS for 20 min. After permeabilization with 0.3% Triton-X100 in PBS containing 3% GPi or BSA for 20 min, antibodies were applied for 1 h at room temperature, then revealed by appropriate secondary

antibodies, diluted in permeabilization solution (see table 1). Nuclei were stained using Hoechst 33258 (Sigma). Coverslips were mounted in Mowiol (Calbiochem).

**BrdU labeling**

BrdU labeling was carried out by intraperitoneal injection of BrdU (100 mg/kg) into pregnant females at 12.5 days *post-coitum*. Mice were sacrificed 1.5 h after injection, and embryos were processed for cryosectioning as described above. For BrdU immunofluorescence, cryosections were subjected to 2 M HCl treatment at 37°C, followed by 2 washes in borate buffer 100 mM , pH 8.5 then in PBS containing 10% GPi before antibody incubation.

In neural progenitor cell cultures, 30 µM BrdU were pulsed for 1 h before fixation. Cells were treated with 2M HCl, 0.5% Triton X-100 for 20 min at room temperature, rapidly neutralized with 100 mM borate buffer pH 8.5 then in PBS containing 1% BSA. Antibodies were diluted in PBS, 0.1% BSA and 0.5% Tween 20.

**TUNEL labeling**

To visualize DNA fragmentation, the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method described by Gavrieli et al. (1992) was used. Sections were permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS and treated in a cooker in 10 mM sodium citrate pH6, 0.1% Tween20, for 35 min followed by 5 washes in PBS. Incubation with terminal deoxynucleotide transferase (In Situ Cell Death Detection kit; Roche) for 1 h at 37°C in a solution containing TMR red dUTP was done after saturation in 10% (GPi), 3% BSA in PBS for 1 h.

**Golgi staining**

For Golgi staining impregnation, we used FD Rapid GolgiStain kit (FDNeuroTechnologies, INC.). Whole brains were immersed in equal volumes of solution A and B (5 ml pr cm3) during 4 d and then washed with solution C for 48 h. The brains were frozen in chilled isopentane and 100 mm thick cryosections were cut. For revelation, slices were washed twice in double distilled water and incubated for 10 min in a mixture of solutions D, E and double distilled water (1:1:2). Sections were washed twice, dehydrated in increasing concentrations of ethanol and mounted in Permount solution.

In each of three animals per genotype, 20-25 cortical neurons from layers 5/6 were were submitted to Sholl analysis. Briefly, neurons visualised with a Zeiss Axioskop 50 microscope with x20 objective (NA 0.5; Plan Aprochromat) coupled to a CCD camera (Zeiss). Starting from the soma, neurons were traced by hand following dendritic and axonal processes on a thickness of 100 mm. Drawings were scanned and Sholl analysis was performed (5 mm radius steps over 150 mm) using ImageJ software.

**Analysis of cell cycle by FACs**

Dissociated neural progenitor cells were fixed in 70% ethanol at 4°C overnight. Then they were centrifuged (500g 10 min), washed three times with PBS and resuspended in a solution containing 50 µg/ml propidium iodide, 100µg/ml Rnase A in PBS. Cells were analysed by flow cytometry (BD Accuri C6).

**CTxB Internalization**

Neurons (2 DIV) were washed with cold Neurobasal medium containing 0.2% BSA and 20 mM Hepes, and incubated with 2 µg /ml CTxB-TRITC for 5 min at 4°C. Unbound proteins were removed by washing with cold HBSS and neurons were then incubated for 2 min at 37°C in Neurobasal containing 0.2% BSA to allow internalization. Surface bound CTxB was removed by treatment with stripping solution (200 mM acetic acid, 500mM NaCl, pH 2.4). After washing with cold HBSS, neurons were fixed for 15 min with 4% PFA containing 4% sucrose in PBS and processed for microscopic examination.

**Fluorescent microscopy**

Images were acquired by Metamorph with a Zeiss Axiovert microscope using 5x, 10x, 20x, 40x objectives or 63x Plan-Apochromatic oil immersion objective (NA 1.3, Zeiss) or by Zen software with a Zeiss LSM 710 inverted confocal microscope with 20x, 40x oil objective (NA 1.3, Zeiss) or 63x oil objective (NA 1.4, Zeiss). Laser lines at 488 nm, 561 nm and 633 nm were used for exciting fluorophores. Pinhole size was usually set to generate 1 µm-thick optical slice at all wavelengths.

**Magnetic Resonance Imaging**

MRI was performed at 7T Bruker Biospec Avance III using a volume transmit/surface receive coil combination. The anaesthetized animal (1.5% isoflurane in air) was placed in a heated cradle, regulated at 37 °C. T2-weighted spin-echo images (TR/TE = 5,000/42 ms, field of view =

15x15 $mm^2$, slice thickness = 0.6 mm, 30 slices) were obtained across the entire brain (from the cerebellum to olfactory bulb). The scan duration was 20 min/animal. Subsequently, the following contours of ventricle and brain were manually delineated on the T2-weighted images.

**Electron microscopy**

The antero-dorsal part of the developing cortex was dissected from E12.5 embryos and fixed for 2 h in 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3. After washing and 1 h post-fixation in 1% osmium tetroxide, they were dehydrated and embedded in Epon. Sections were cut and stained classically, with uranyl acetate and lead citrate, and observed with a 1200EX JEOL TEM microscope.

**Western blotting**

Mouse brains and cortices were homogenized in ice-cold istonic lysis buffer (0.32 M sucrose, 4mM HEPES, pH 7.4, protease inhibitors [EDTA- free Complete; Roche Molecular]), 15mM NaF and b-glycerophosphate, 2mM EDTA). The homogenate was centrifuged at 1400 g for 10 min to remove nuclei. The postnuclear supernatant was further homogenized by adding 0.5% Triton-X100 to the lysis buffer, stirred 30 min in the cold room and cleared at 12,000 g for 10 min. Tissue lysates were resuspended in Laemmli buffer and resolved by SDS-PAGE 10% acrylamide gels and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore). Membranes were blocked for 30 min in TBS containing 0.1% Tween 20 and 5% dry milk and incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by incubation with secondary HRP-conjugated antibodies for 1 h at room temperature before revelation. Membranes were washed in TBS 0.1% Tween 20 and incubated with luminescence-generating HRP substrate, and bound antibodies were revealed using luminography on film. Protein bands were quantified using plot profile of ImageJ program.

**Statistical Analyses**

Results shown are means and error bars represents standard errors of the mean (s.e.m). Expriments were repeated at least 3 times. Statistical analyses were conducted using Microscoft Excel. Statistical significance was determined either by two-tailed Student's t-test (2 groups) or by one-way Anova and Dunnett's test (more than 2 groups) as appropriate.

**Acknowledgements:** We thank E. Denarier for helping with the design of the targeting vector,

la Clinique de la Souris (Strasbourg), N. Cristina and C. Thibert for helping to raise the Alix ko mouse line, J. Roland for technical help, A. Depaulis, M. Albrieux, S. Humbert, J. Nardelli (Paris) for kind gifts of reagents, all members of the laboratory and K. Sadoul for critically reading the manuscript. This work was funded by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR), MALZ program. M. L. was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

**Conflicts of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**References**

1. McCullough J, Colf LA, Sundquist WI (2013) Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway. *Annu Rev Biochem* **82:** 663-692

2. Missotten M, Nichols A, Rieger K, Sadoul R (1999) Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ* **6:** 124-129

3. Sadoul R (2006) Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse. *Bio Cell* **98:** 69-77

4. Bissig C, Gruenberg J (2014) ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol* **24:** 19-25

5. Mahul-Mellier AL, Hemming FJ, Blot B, Fraboulet S, Sadoul R (2006) Alix, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death in vivo. *J Neurosci* **26:** 542-549

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

7. Martin-Serrano J, Yarovoy A, Perez-Caballero D, Bieniasz PD, Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG (2003) Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins

AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 12414-12419

8. Morita E, Sandrin V, Chung HY, Morham SG, Gygi SP, Rodesch CK, Sundquist WI (2007) Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *Embo J* **26:** 4215-4227

9. Schmidt MH, Dikic I, Bogler O (2005) Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities. *J Biol Chem* **280:** 3414-3425

10. Cabezas A, Bache KG, Brech A, Stenmark H (2005) Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J Cell Sci* **118:** 2625-2635

11. Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F (2014) ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* **343:** 1247136

12. Paridaen JT, Huttner WB (2014) Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep* **15:** 351-364

13. Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* **7:** 136-144

14. Rakic P (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci* **18:** 383-388

15. Chen Q, Arai D, Kawakami K, Sawada T, Jing X, Miyajima M, Hirai S, Sakaguchi K, Furushima K (2015) EphA4 Regulates the Balance between Self-Renewal and Differentiation of Radial Glial Cells and Intermediate Neuronal Precursors in Cooperation with FGF Signaling. *PLoS ONE* **10:** e0126942

16. Orlandi PA, Fishman PH (1998) Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* **141:** 905-915

17. Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* **94:** 325-337

18. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA (1999) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Cell Death Differ* **6:** 1043-1053.

19. Mason HA, Rakowiecki SM, Gridley T, Fishell G (2006) Loss of notch activity in the developing central nervous system leads to increased cell death. *Dev Neurosci* **28:** 49-57

20. Depaepe V, Suarez-Gonzalez N, Dufour A, Passante L, Gorski JA, Jones KR, Ledent C, Vanderhaeghen P (2005) Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* **435:** 1244-1250

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

22. Mitchell BD, Gibbons B, Allen LR, Stella J, D'Mello SR (2001) Aberrant apoptosis in the neurological mutant Flathead is associated with defective cytokinesis of neural progenitor cells. *Brain research Developmental brain research* **130:** 53-63

23. Janisch KM, Vock VM, Fleming MS, Shrestha A, Grimsley-Myers CM, Rasoul BA, Neale SA, Cupp TD, Kinchen JM, Liem KF, Jr. *et al* (2013) The vertebrate-specific Kinesin-6, Kif20b, is required for normal cytokinesis of polarized cortical stem cells and cerebral cortex size. *Development* **140:** 4672-4682

24. Morita E, Colf LA, Karren MA, Sandrin V, Rodesch CK, Sundquist WI (2010) Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107:** 12889-12894

25. Mahul-Mellier AL, Strappazzon F, Petiot A, Chatellard-Causse C, Torch S, Blot B, Freeman K, Kuhn L, Garin J, Verna JM *et al* (2008) Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death. *J Biol Chem* **283:** 34954-34965

26. Strappazzon F, Torch S, Chatellard-Causse C, Petiot A, Thibert C, Blot B, Verna JM, Sadoul R (2010) Alix is involved in caspase 9 activation during calcium-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **397:** 64-69

27. Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P (2000) Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* **23:** 291-297

28. Yoon KJ, Koo BK, Im SK, Jeong HW, Ghim J, Kwon MC, Moon JS, Miyata T, Kong YY (2008) Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells. *Neuron* **58:** 519-531

29. Campos LS, Duarte AJ, Branco T, Henrique D (2001) mDll1 and mDll3 expression in the developing mouse brain: role in the establishment of the early cortex. *J Neurosci Res* **64:** 590-598

30. Windler SL, Bilder D (2010) Endocytic internalization routes required for delta/notch signaling. *Curr Biol* **20:** 538-543

31. Chenn A, Walsh CA (2002) Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* **297:** 365-369

32. Sahara S, O'Leary DD (2009) Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron* **63:** 48-62

33. Vitriol EA, Zheng JQ (2012) Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron* **73:** 1068-1081

34. Bizzotto S, Francis F (2015) Morphological and functional aspects of progenitors perturbed in cortical malformations. *Frontiers in cellular neuroscience* **9:** 30

35. Kaindl AM, Passemard S, Kumar P, Kraemer N, Issa L, Zwirner A, Gerard B, Verloes A, Mani S, Gressens P (2010) Many roads lead to primary autosomal recessive microcephaly. *Prog Neurobiol* **90:** 363-383

Figure 1

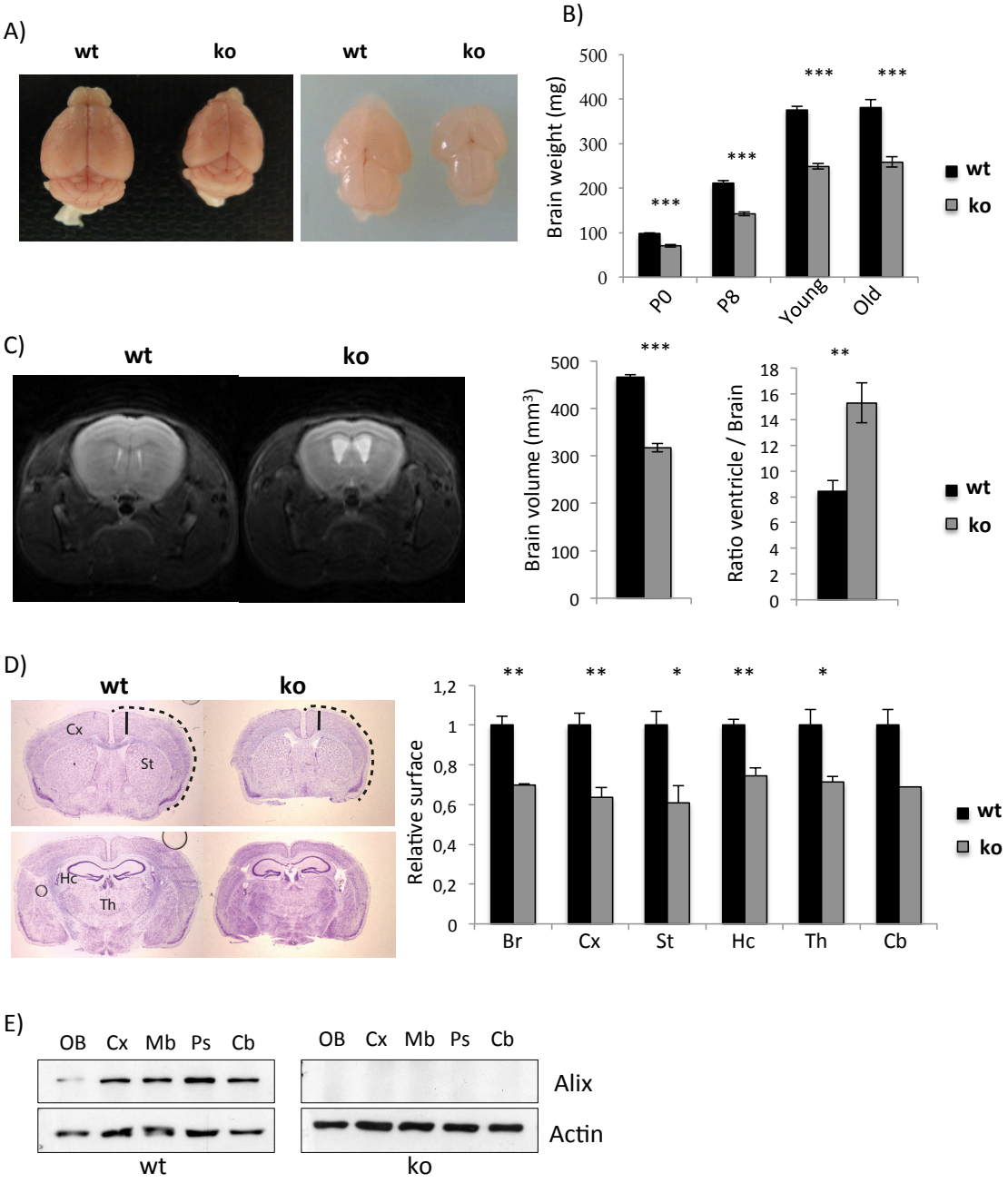



**Figure 1. Alix ko brains are smaller**

A) Representative picture of whole brain of adult (left panel) and newborn mice (right panel) of the indicated genotype.

B) Whole brain weight from newborn (P0), pups (P8), young (< 2 months) and old mice (> 10 months). (n=6; *** $p < 0.001$)

C) MRI sections and quantification showing volume reduction in Alix ko adult brains together with relative increase in the size of the ventricle (n=5; **$p<0.01$; ***$p< 0.001$).

D) Coronal sections of adult brain stained with Cresyl violet. Upper panel: rostral coronal section ; lower panel: section through hippocampus. Relative surface areas of brain (Br), cortex (Cx), striatum (St), hippocampus (Hc), thalamus (Th) and cerebellum (Cb). Note the reduction of the size of the neocortex (Cx) in both the radial and medio-lateral dimensions (solid and dashed lines respectively) Scale bar = 1 mm. (n=4; *$p<0.05$; **$p<0.01$)

E) Western blot analysis of Alix expression in olfactory bulb (OB), cortex (Cx), midbrain (Mb), Pons (Ps) and cerebellum (Cb) from adult Alix wt and ko brains.

Figure 2

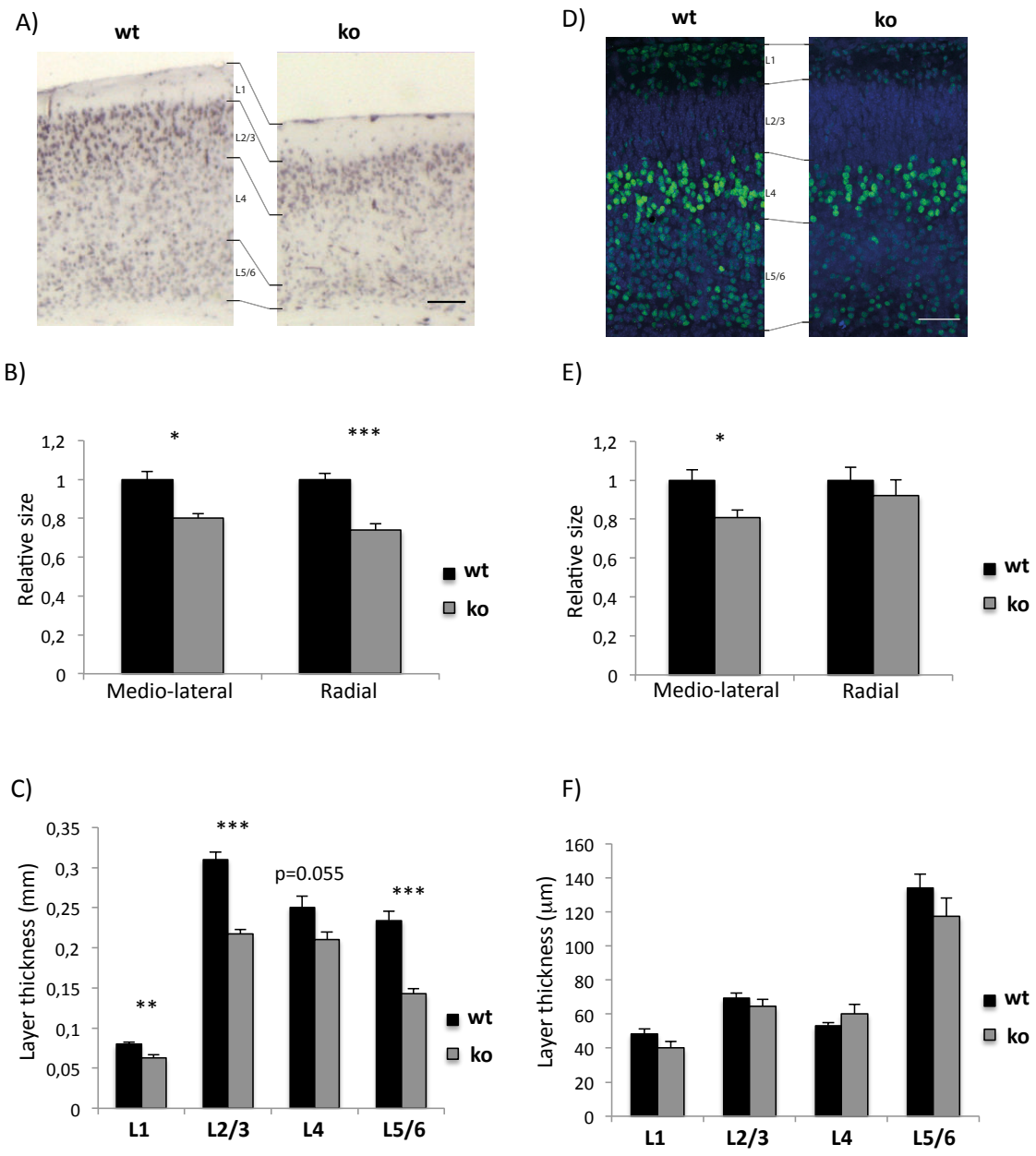



**Figure 2. Cortical layers are thinner in Alix ko brains**

A, D) Cortical sections of adult (A) and P0 (D) mice labeled with NeuN (A) and cTip2 (D) antibodies (L : Layers). Scale bars = 250 µm (A) and 50 µm (B).

B, E) Length (Medio-lateral) and thickness (Radial) of adult (B) and P0 cortices (E) (n=4; *p<0.05; ***p<0.001).

C, F) Thickness of cortical layers 1, 2/3, 4 and 5/6 of adult (C) and P0 (F) mice (n=4; **p<0.01; ***p<0.001).

Figure 3

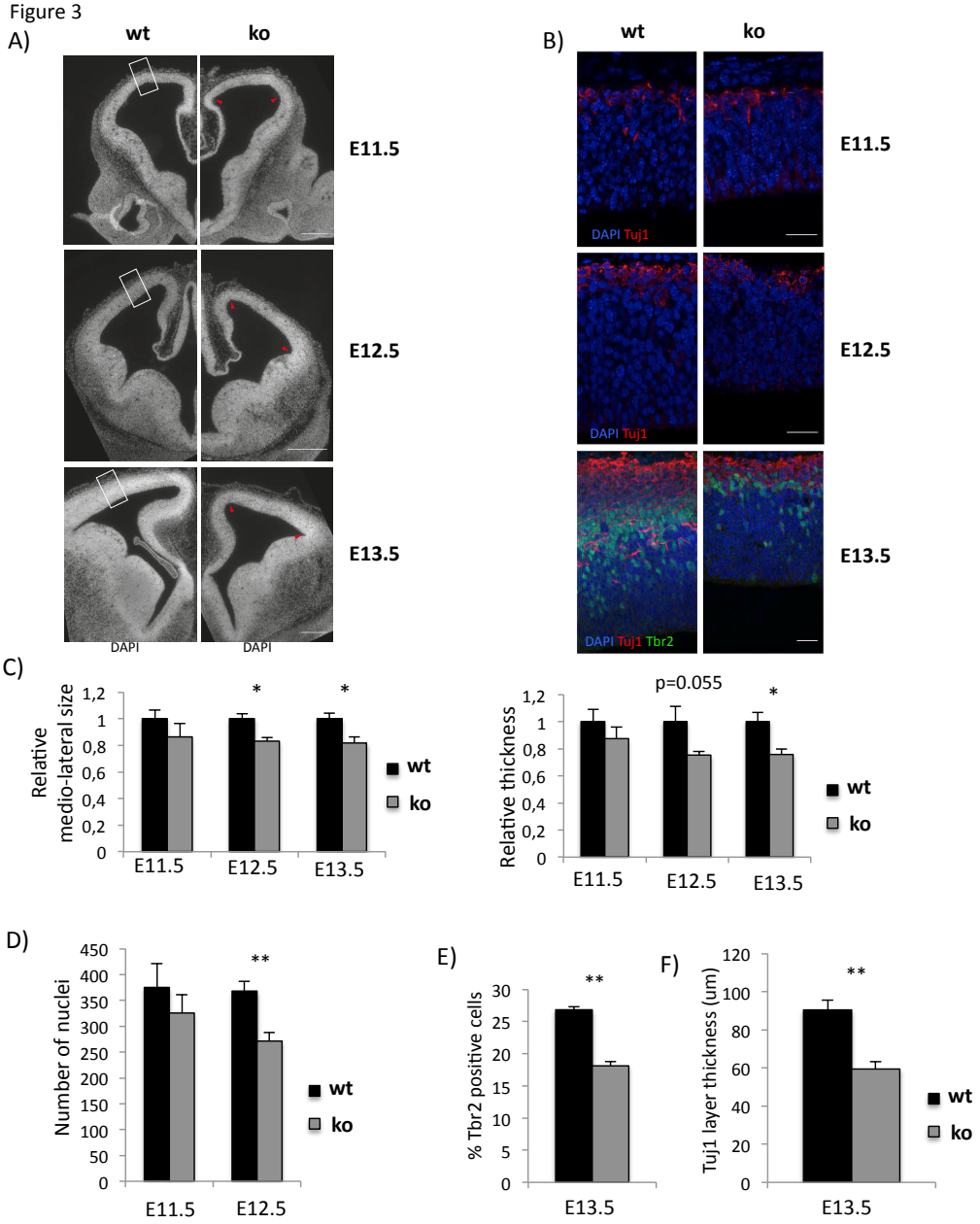



**Figure 3. Reduced cortical size in Alix ko embryos is accompanied by a loss of intermediate progenitors and differentiated neurons**

A) DAPI staining of coronal sections in the neocortex of E11.5, E12.5, E13.5 embryos. Red arrowheads indicate the limits of the dorsal telencephalon. White frames represent the approximate regions used for all quantifications of the telencephalon thickness. Scale bar = 500 μm.

B) Telencephalon wall labeled with DAPI and anti- Tuj1, and Tbr2 for E13.5 sections only. Scale bar = 25 μm.

C) Length (medio-lateral size - right panel) and thickness (radial size - left panel) of cortices at E11.5, E12.5, E13.5 (n=3; *p<0.05).

D) Number of DAPI+ nuclei counted in the total thickness of the telencephalon in a ventricle length of 150 μm. (n=3; **p<0.01).

E) Number of Tbr2 positive cells (expressed as a % of total nuclei counted in a length of 75 μm of cortical wall) at E13.5 (n=3; **p<0.01).

F) Thickness in μm of the Tuj1-positive differentiated neuron layer at E13.5 (n=3; **p<0.01).

Figure 4

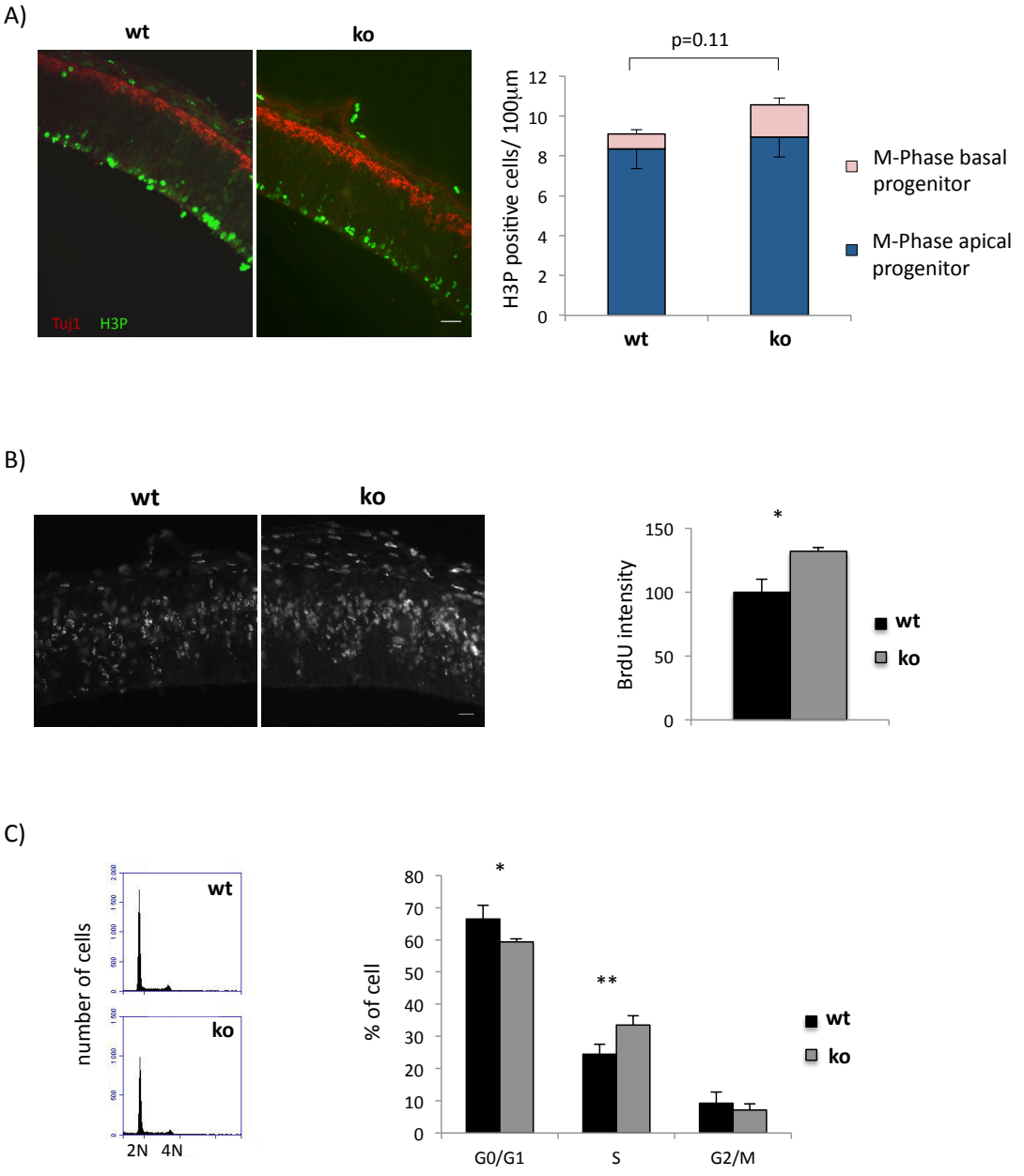



**Figure 4. Modified cell proliferation does not account for the reduced cortical size in Alix ko brains**

A) Wt and ko cortices double stained with anti-phospho-histone H3 (H3P, M-phase nuclei in green) and Tuj-1 (differentiating neurons in red). Counts were done within 30 µm from the ventricle for apical progenitors or 30 µm away from the ventricle for basal progenitors, in a length of 100 µm of cortical wall (n=3; * $p<0.05$). Scale bar = 50 µm

B) BrdU incorporation revealed on cortical sections by immunostaining with anti-BrdU antibody. Right panel: Fluorescence intensity/ surface area (arbitrary units) of cortex. Dashed lines delimit the ventricular surface (n=3; *$p<0.5$). Scale bar = 50 µm

C) Flow cytometry analysis of cells dissociated from E12.5 telencephalon.

Left panels show typical profiles of DNA content of wt and ko cells stained with propidium iodide. Note the absence of 8N cells. The average percentage of cells in each cell cycle phase is shown in right panel (n=3; *$p<0.05$; **$p<0.01$).

Figure 5

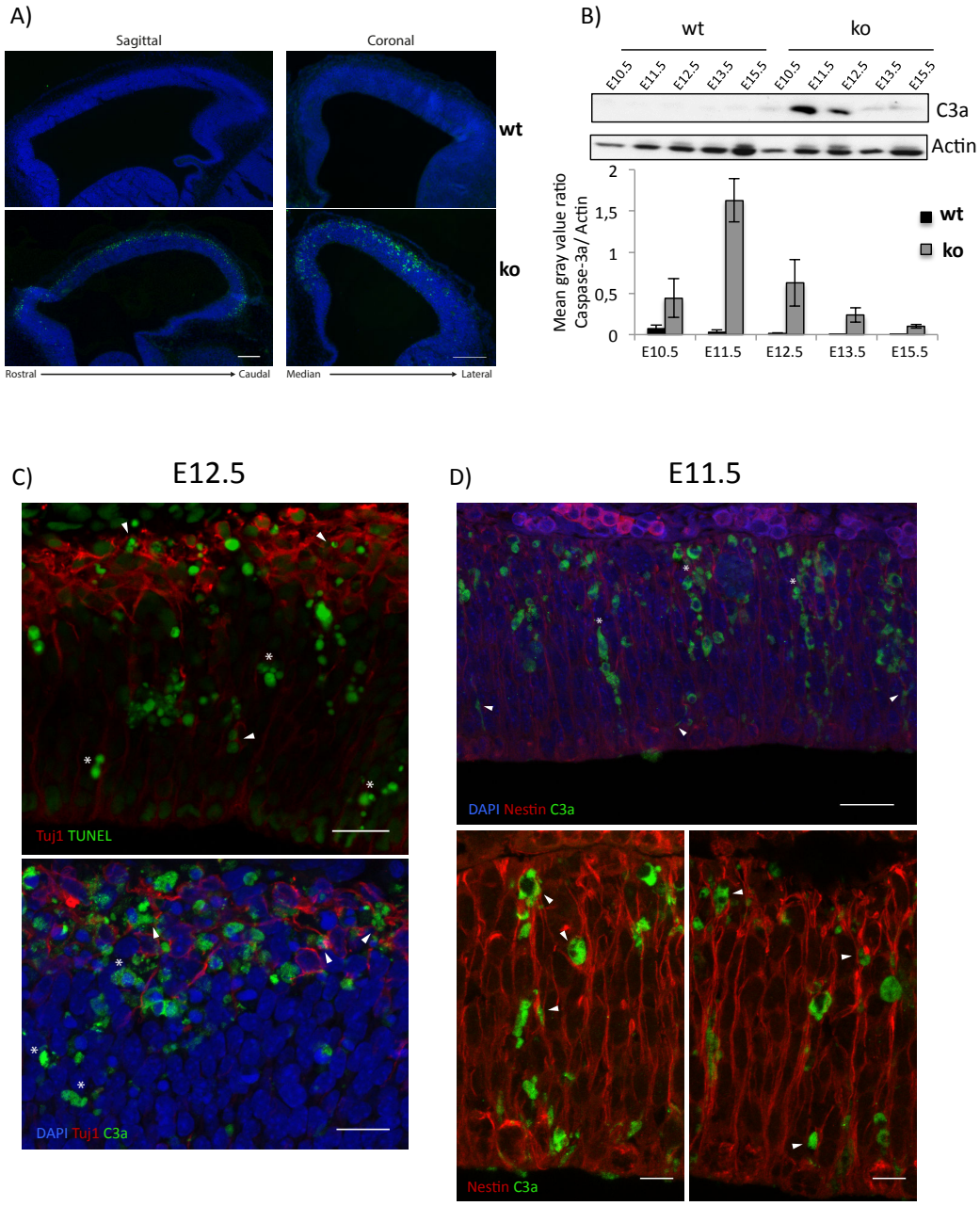



**Figure 5. Massive apoptosis in Alix ko cortices during early development**

A) Sagittal and coronal sections of E12.5 forebrains labeled with anti-active capase-3 antibody and DAPI. Note the homogeneous distribution of activated caspase-3-cells along the antero-posterior and medio-lateral axes. Scale bar = 250 μm

B) Western blot analysis of embryonic dorsal telencephalon stained with anti-Alix, anti-activated caspase-3 (C3a) and anti-actin. Quantification shows that actived caspase-3 is only detectable at E11.5 and E12.5 (n=4).

C) Tuj-1 and TUNEL (Upper panel) or C3a (lower panel) double staining of E12.5 coronal sections show dying cells spread throughout all layers of the cortical wall. Arrowheads indicate colocalization betwenn Tuj-1 and TUNEL or C3a; asterisks indicate the absence of Tuj-1 labeling in some dying cells. Scale bar = 50 μm.

D) Double C3a and Nestin staining in the E11.5 telencephalon. Upper photograph shows alignment of C3a positive cells (asterisks) and the presence of C3a in cytoplasmic radial processes (arrowheads). Scale bar = 25 μm. Higher magnification (lower panel) shows Nestin positive RGCs filled with C3a. Scale bar = 10 μm.

Figure 6

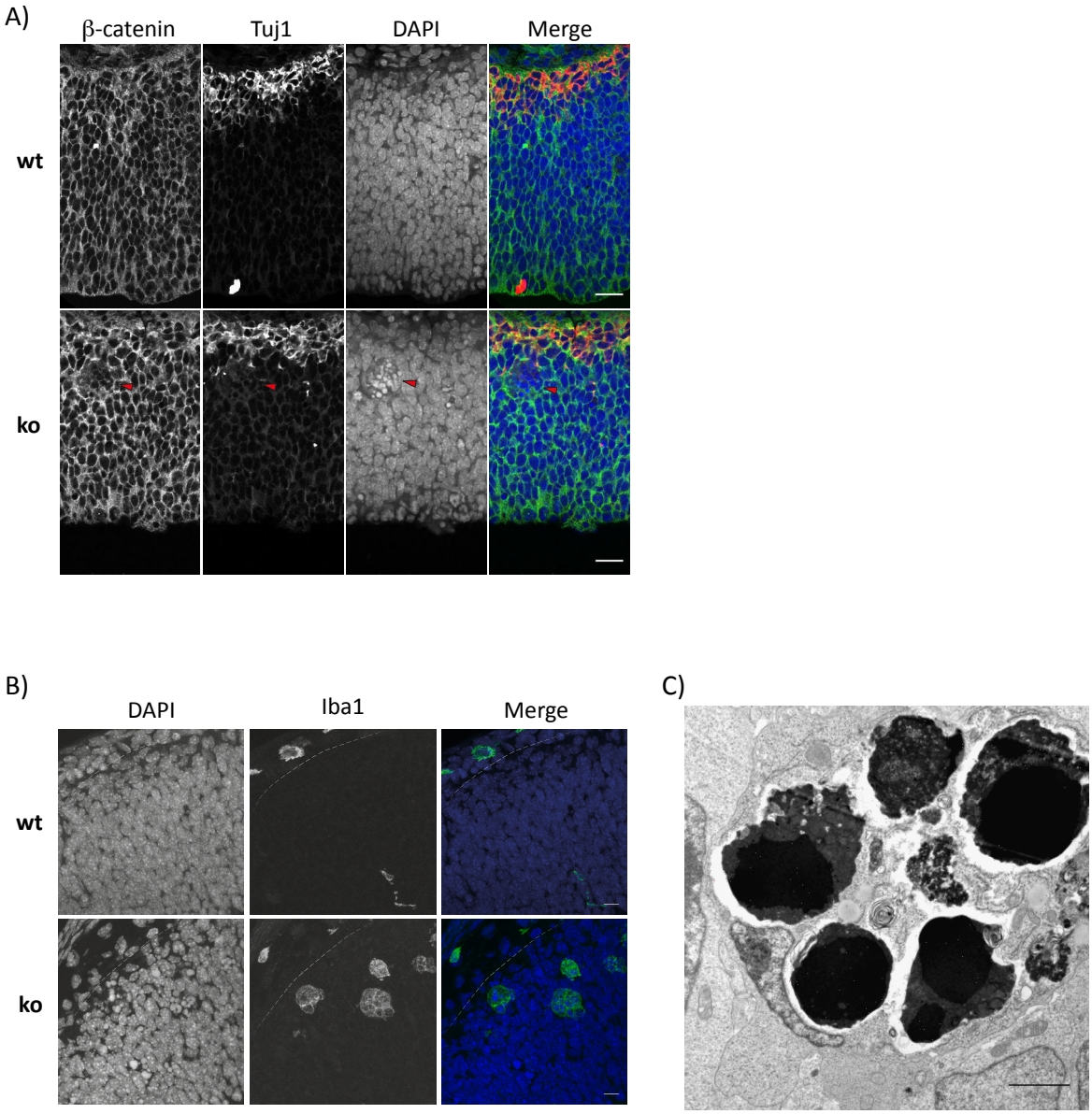



**Figure 6. Clusters of dying cells are engulfed by microglia.**

A) Coronal section of E12.5 forebrains labeled with anti-βcatenin, anti-Tuj-1 antibodies and DAPI showing an aggregate of pyknotic nuclei (arrowhead). Scale bar = 20 μm.

B) Coronal section of E12.5 brains in neocortex showing nuclei (DAPI) and microglial cells (Iba1). Note that pyktonic nuclei scattered throughout the cortical wall are surrounded by microglial cells in ko sections while only few microglial cells can be seen in wt neocortices.

Dashed lines delineate the brain pial surface. Scale bar = 10 μm.

C) Clumps of apoptotic cells surrounded by microglia observed by EM in sections of E12.5 ko cortices. Scale bar = 2 μm

Figure 7

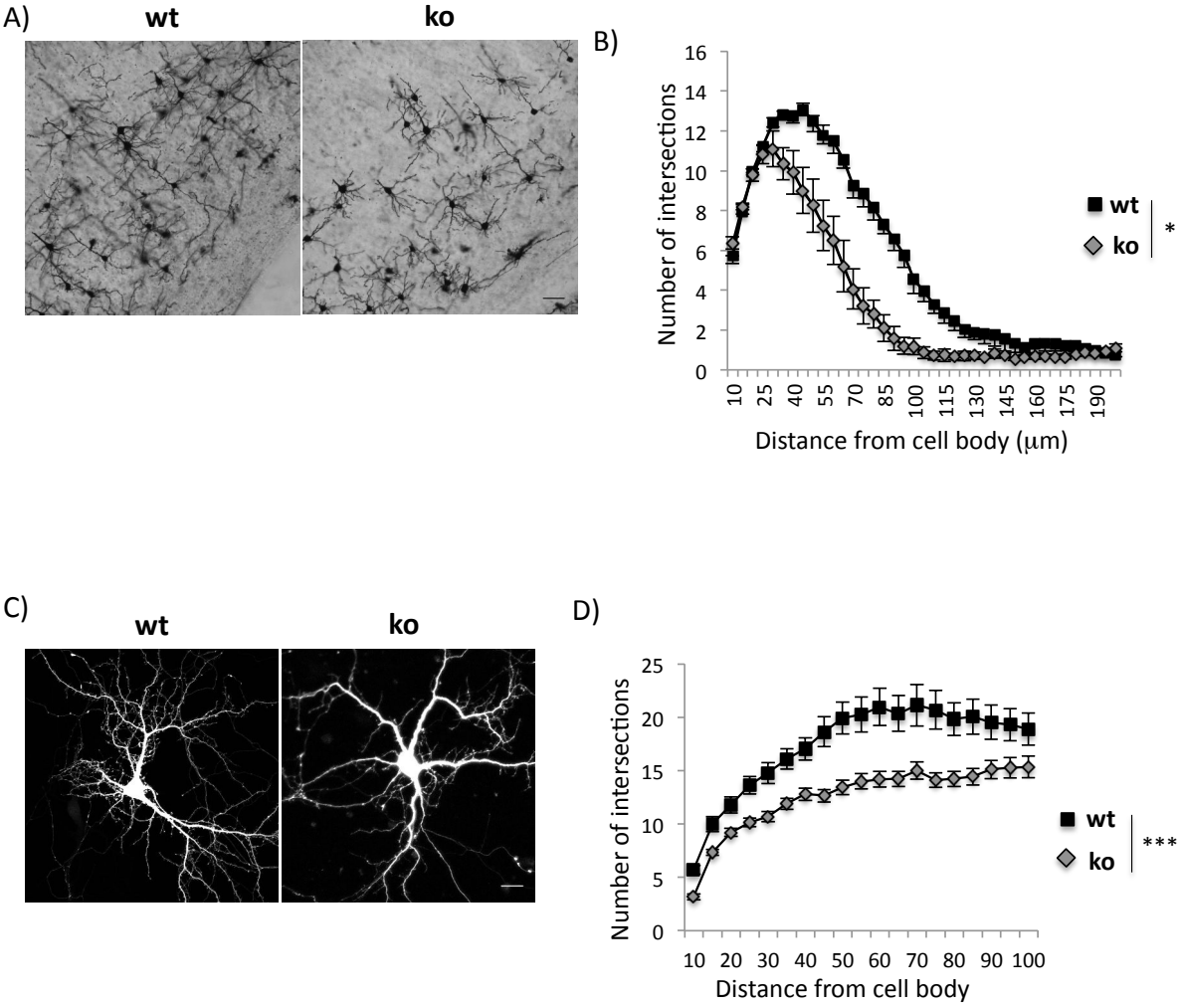



**Figure 7. Reduction in dendritic arborization in Alix ko neurons *in vivo* and *in vitro***

A) Golgi-stained cortical neurons in coronal sections. Scale bar = 50 μm.

B) Sholl analysis of dendritic arborization of cortical neurons of L5 and L6. For each genotype, the graph shows mean numbers of dendritic branches as a function of the distance from the soma (n=3, * $p<0.05$).

C) Confocal images of wt (left) or Alix ko (right) 15 DIV hippocampal neurons expressing mcherry. Scale bar = 20 μm.

D) Sholl analysis of dendritic arborizations of 15 DIV hippocampal neurons. For each genotype, the graph shows mean numbers of dendritic branches as a function of the distance from the cell body (n=70 neurons, *** $p<0.001$).

Figure 8

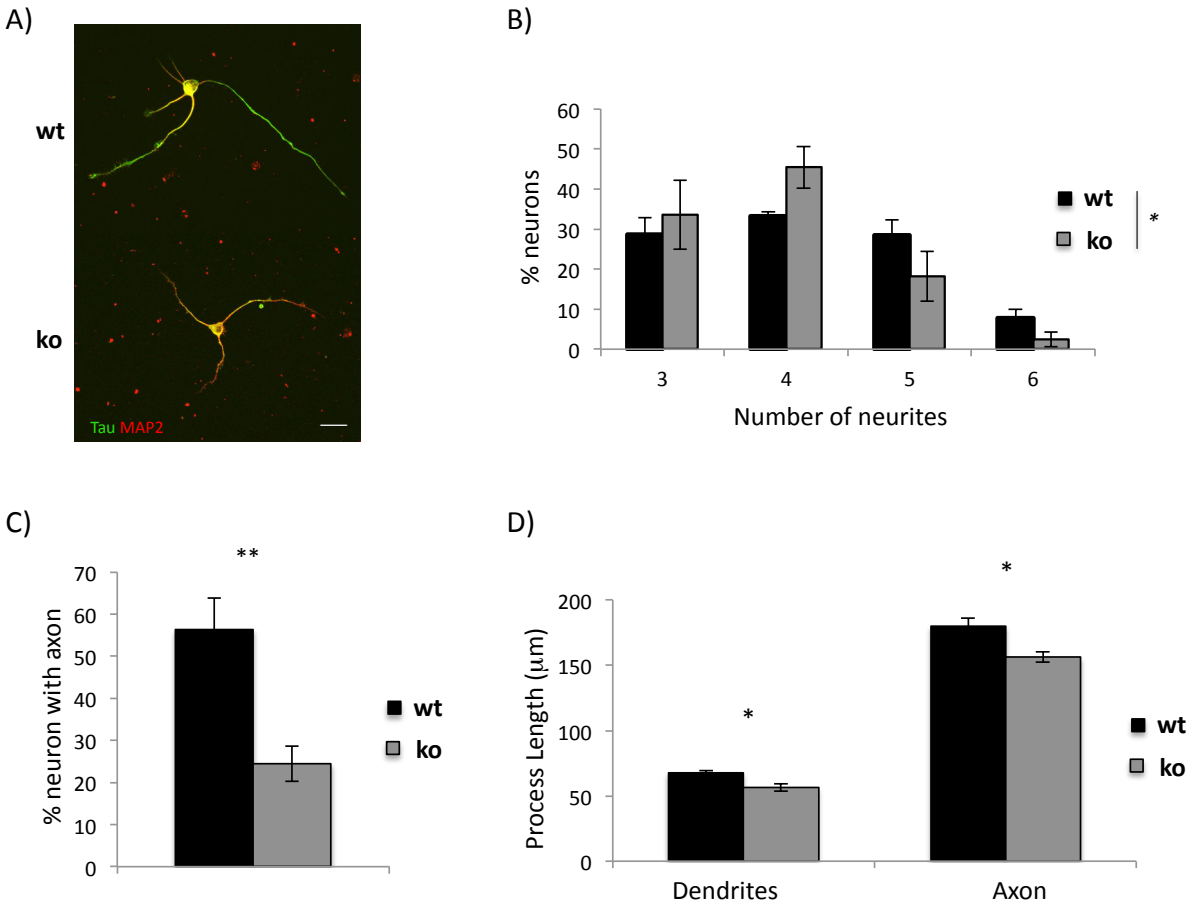



**Figure 8. Neurite outgrowth is impaired in cultured Alix ko neurons.**
A) 1DIV hippocampal neurons stained with anti-MAP2 (red) and anti-Tau (green). Scale bar =20 µm.
B) Number of primary neurites growing from P0 hippocampal neurons cultured 1DIV. (n=3; * $p<0.05$).
C) Percentage of neurites labeled with Tau (axon) growing from P0 hippocampal neurons cultured for 1DIV on laminin.
D) Dendrite and axon length growing from P0 hippocampal neurons cultured for 1DIV on laminin (n=3; *$p<0.05$).

Figure 9

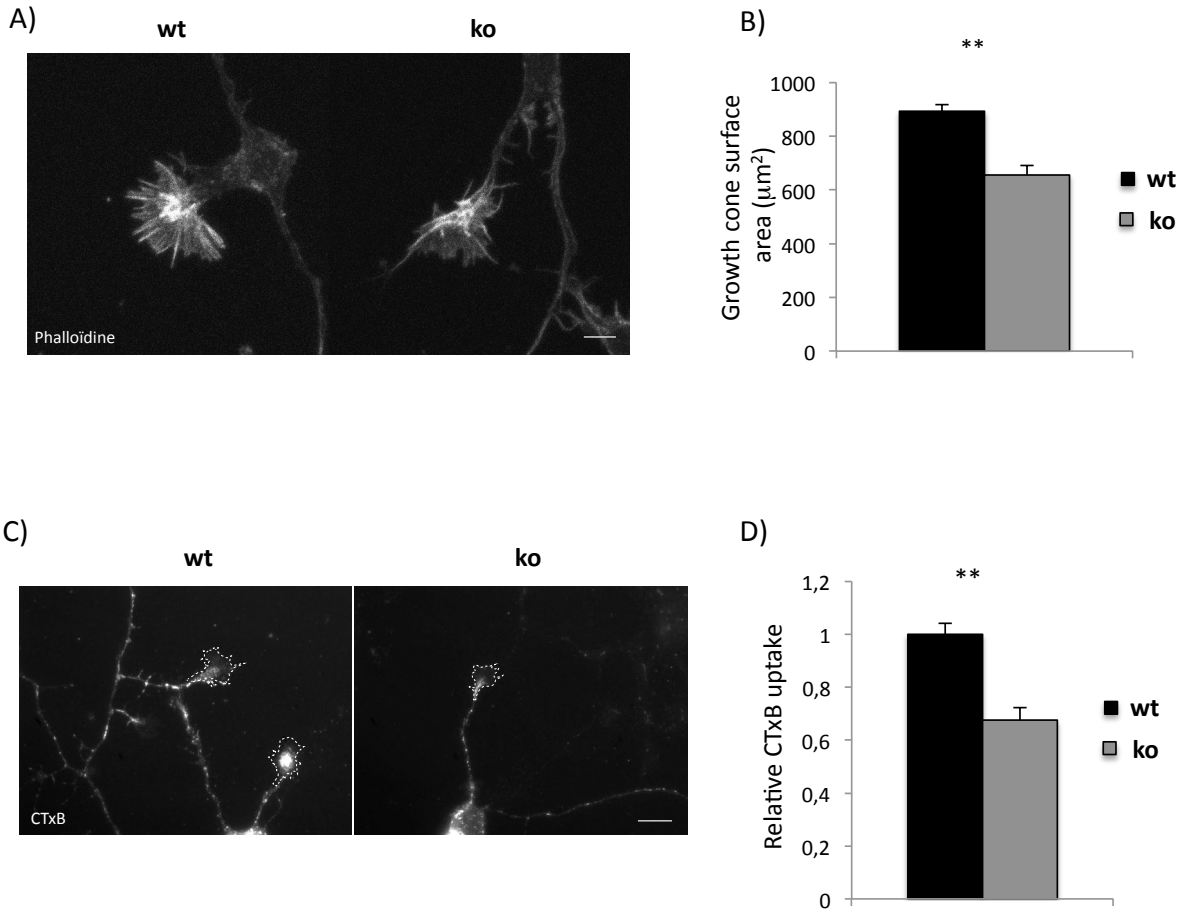



**Figure 9. Abnormalities in growth cones of Alix ko neurons.**

A) Growth cones of 1DIV neurons stained for F-actin with phalloïdin-texas red. Scale bar = 5 µm.

B) Quantification shows the reduction of the surface due to the lack of Alix expression (n=3; **p<0.01).

C,D) CTxB endocytosis at growth cones is impaired in Alix ko hippocampal neurons. C) Growth cones labeled with CTxB-TRITC were incubated for 2mn at 37°C, fixed and stained with anti-Tau antibodies. Scale bar = 10 µm .

D) Quantification of CTxB endocytosis per growth cone (n=3; **p<0.01)

FigureS1

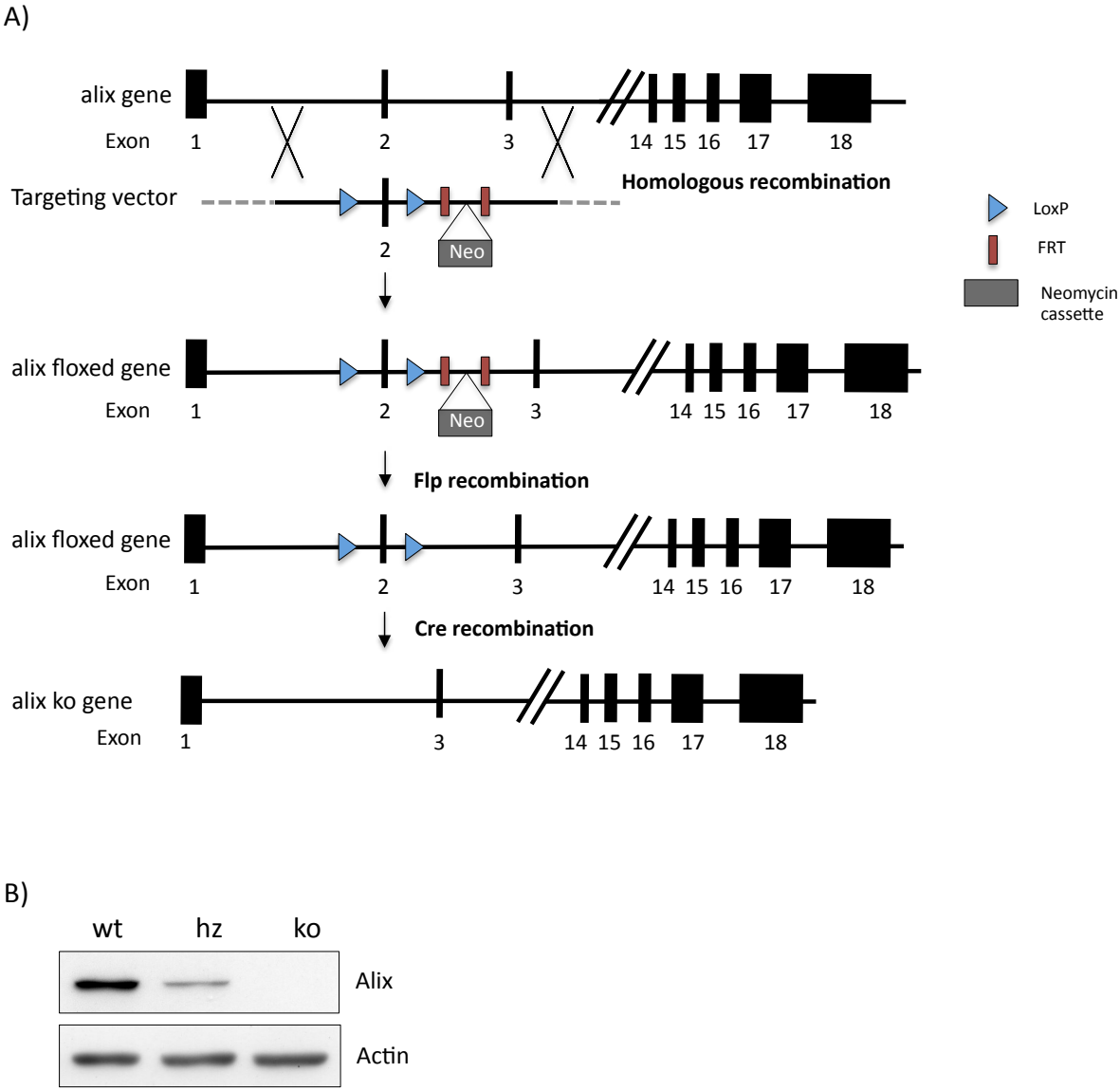



**Figure S1. Strategy used for the development of Alix knock-out mice**

A) Schematic representation of the constructs used for recombination. The LoxP sites were introduced upstream and downstream of Exon 2 of the *alix* gene (chromosome 3). The neomycin cassette was removed by flippase recombination. The Cre recombinase allows excision of exon 2.

B) Western blot detection of Alix protein levels in total brain lysates from mice of the indicated genotypes

Figure S2

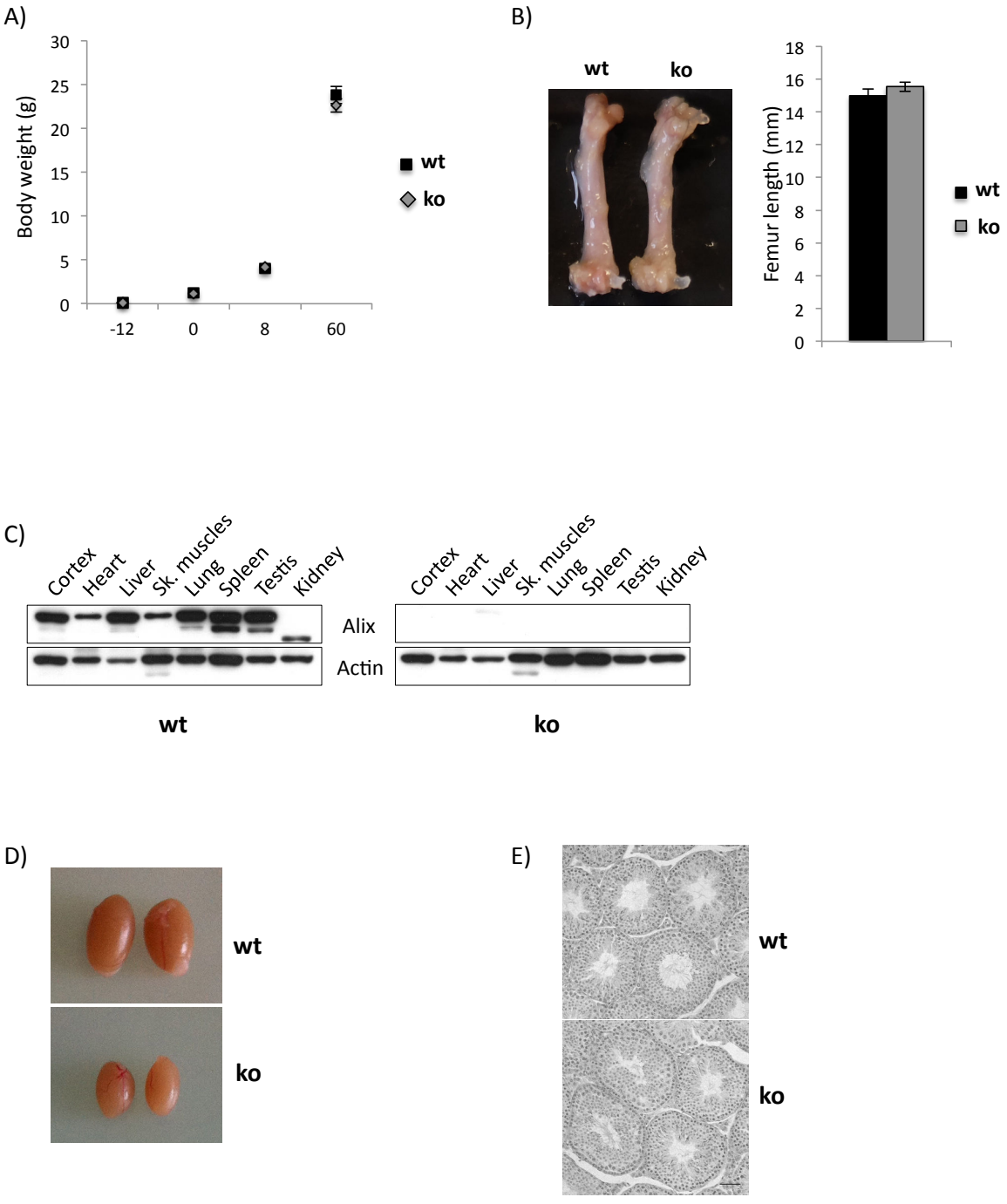



**Figure S2. Physical features of Alix ko mice**

A) Body weight measurement from E12 to adults show no difference at any age tested (n=6).

B) Measurement of femur length of adult wt and Alix ko mice (n=3).

C) Western blot of Alix protein in the indicated organs from wt and Alix ko mice.

D) Pictures showing the dramatic reduction in size of testes dissected from adult Alix ko (lower panel) compared to wt mice (upper panel).

E) Histological analysis on paraffin sections of adult testes stained by hematoxylin-eosin show an overall normal organization of seminiferous tubules in Alix ko testis. Scale bar = 50 μm

Figure S3

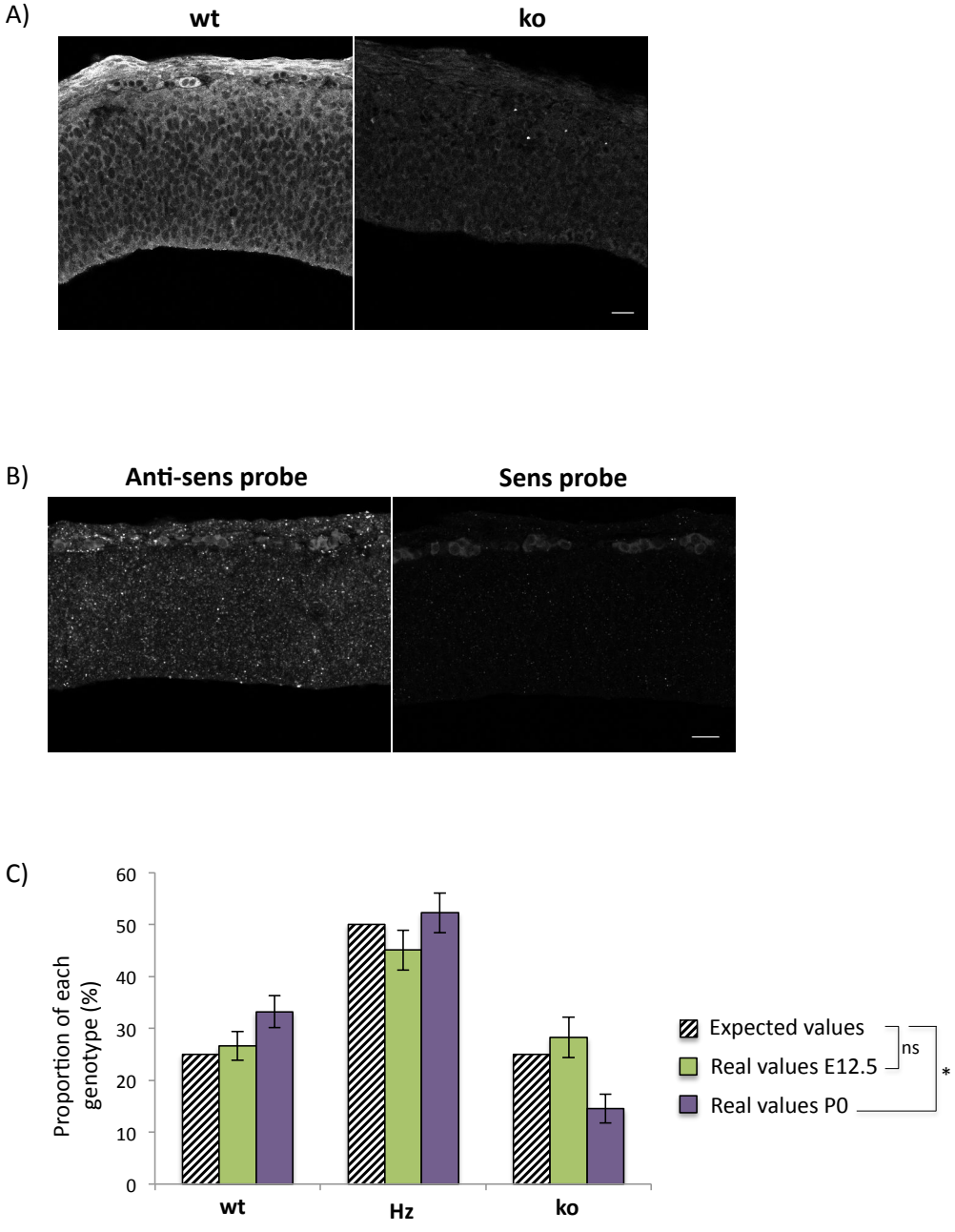



**Figure S3.**
A,B) Alix protein and mRNA expression levels in the dorsal telencephalon.
A) Coronal section of E12.5 forebrains labeled with anti-Alix antibodies shows an homogeneous expression of Alix in the cortical wall of wt. Scale bar = 20 μm
B) Fluorescent In Situ Hybridization on coronal section of E12.5 wt shows Alix mRNA expression homogeneously distributed throughout the cortex. Scale bar = 20 μm
C) Mendelian inheritance in Alix heterozygous (Hz) progeny is abnormal: fewer Alix ko pups than expected were born from crossing Hz mice. However, the normal expected number of Alix ko E12.5 embryos were found, demonstrating that the absence of *alix* leads to a lethal phenotype with varying dependence. (n=20; *p<0.05).

Figure S4

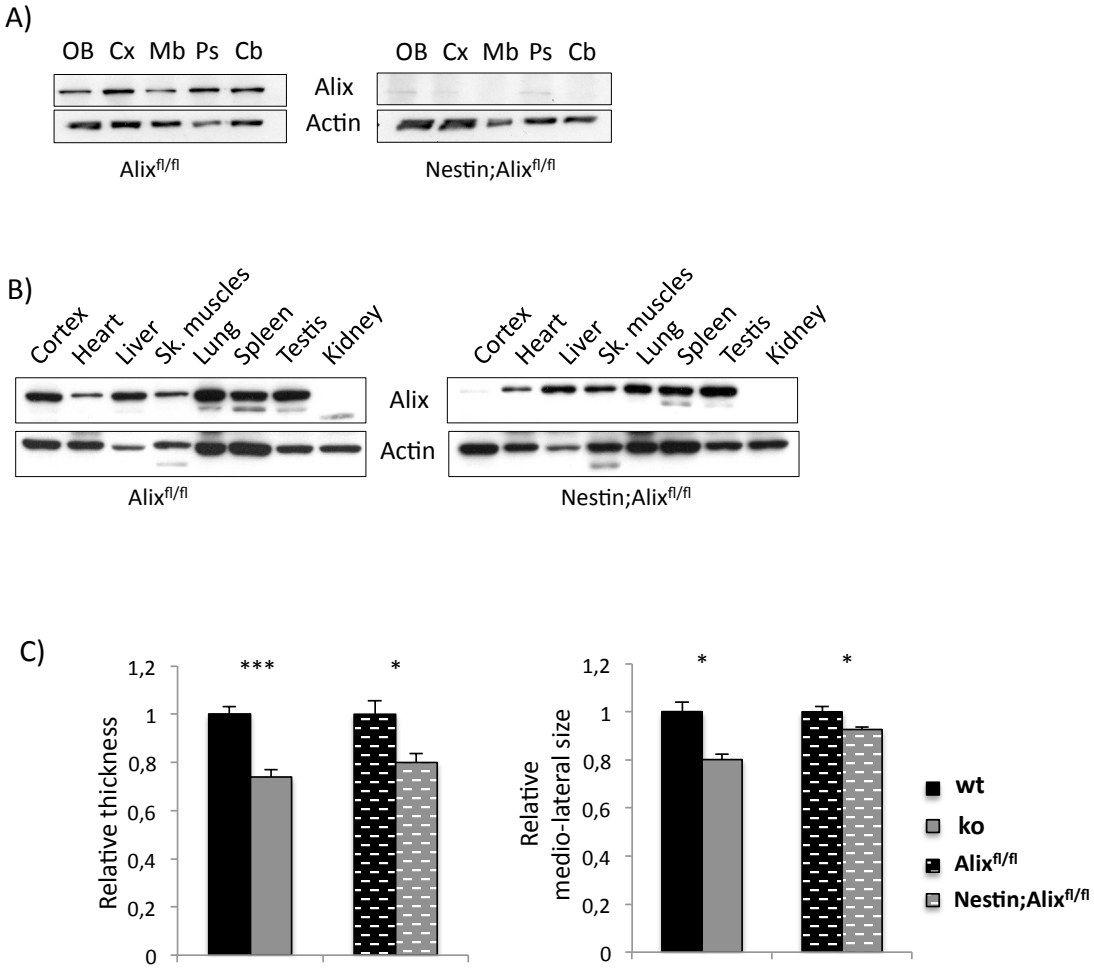



**Figure S4. Ablation of *alix* in neural precursors leads to the same microcephaly as that seen in Alix ko mice.**

A,B) Western blot of Alix protein in olfactory bulb (OB), cortex (Cx), midbrain (Mb), pons (Ps) and cerebellum (Cb) (A) organs (B) lysates from Alix$^{fl/fl}$ and Nestin;Alix$^{fl/fl}$ mice.

C) Length (Medio-lateral) and thickness (Radial) of adult wt, ko, Alix$^{fl/fl}$ and Nestin;Alix$^{fl/fl}$ cortices (n=4; *p<0.05).

Figure S5

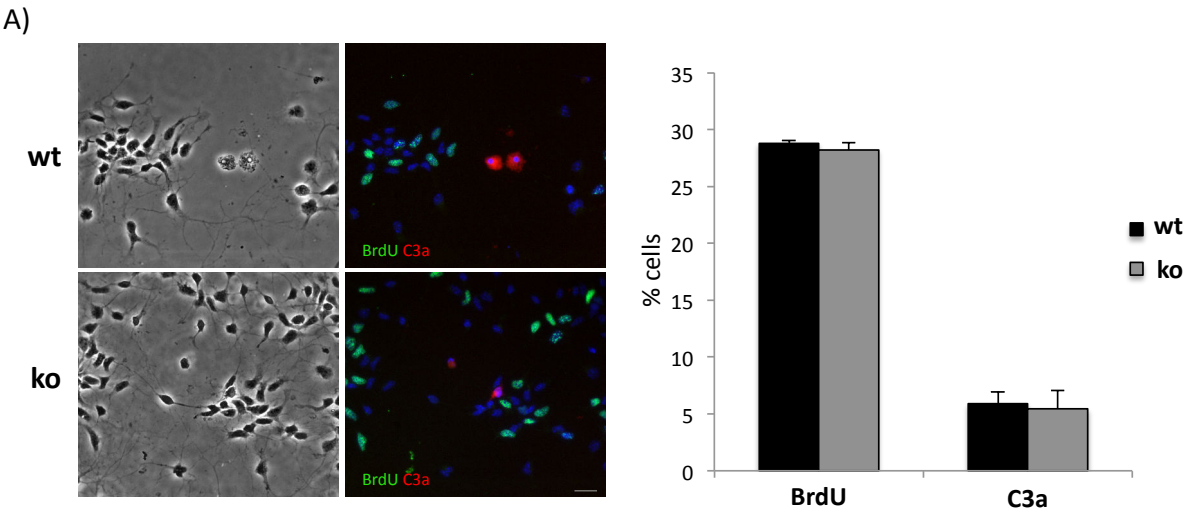



**Figure S5. The Massive apoptosis in Alix ko cortices is not cell autonomous**

A) 2 DIV neural precursor cell stained with anti-C3a and anti-BrdU antibodies. Scale bar =

B) Percentage of C3a or BrdU positive cell in wt or Alix ko neurons after 2 DIV (n=3; * $p<0.05$).

Figure S6

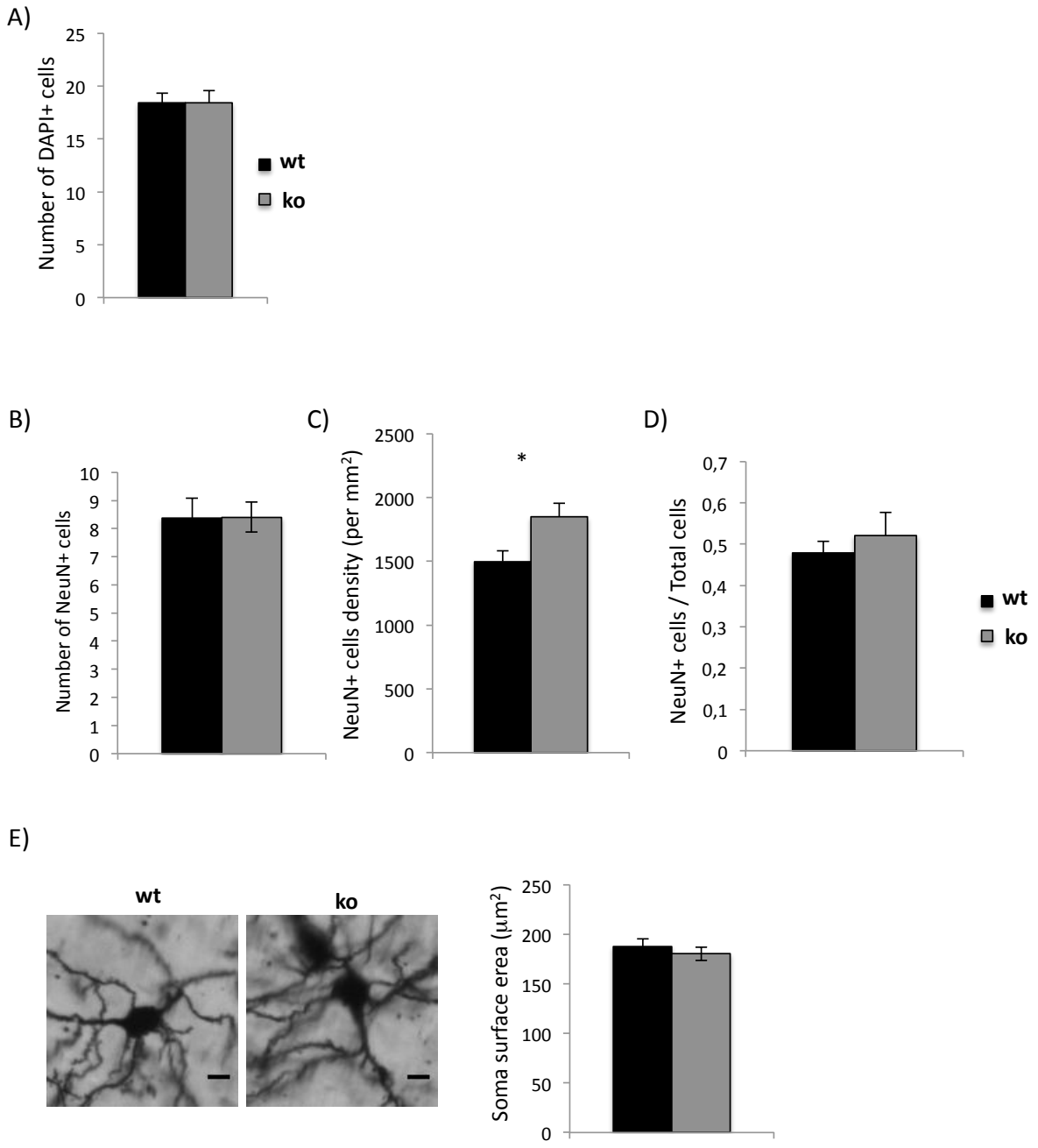



**Figure S6.**

A) Number of DAPI-stained nuclei counted per 5 μm wide radial columns of P0 cortical wall (n=4).

B) Number of NeuN-positive neurons counted per 5 μm wide radial columns of adult cortical wall (n=4).

C) Density of NeuN-positive cortical neurons (n=4; *$p<0.05$).

D) Ratio of the number of NeuN-positive neurons on the total number of cells stained with hematoxylin-eosin counted in the cortex (n=4).

E) Size of the cell body in adult cortex stained by Golgi impregnation method (n=3). Scale bar = 10 μm.

| Antibody | Species | Reference | Dilution IH | IF | WB |
|---|---|---|---|---|---|
| Tuj1 | Mouse monoclonal | BioLegend | 500 | | 1000 |
| Anti-cleaved caspase 3 | Rabbit polyclonal | Cell signaling | 700 | 1000 | 2000 |
| Anti-Pax6 | Rabbit polyclonal | Covance | 300* | | |
| Anti-Nestin (RC2) | Mouse IgM monoclonal | dshb | 5* | | |
| Anti-BrdU | Rat monoclonal | Eurobio-abCys S.A. | 500 | 1000 | |
| Anti-phosphohistoneH3 | Rabbit polyclonal | Millipore | 500 | 3000 | |
| Anti-Tbr2 | Rabbit polyclonal | Abcam | 200* | | |
| Anti-Alix | Rabbit polyclonal | Covalab | 100* | | 10000 |
| Anti-MAP2 | Mouse monoclonal | Abcam | | 500 | |
| Anti-Tau1 | Rabbit polyclonal | Dako | | 5000 | |
| Anti-Actin | Mouse monoclonal | Millipore | | | 10000 |
| Anti-Iba1 | Rabbit polyclonal | Eurobio-abCys S.A. | 200 | | |
| Anti-NeuN | Mouse monoclonal | Gift from A. Buisson's laboratory | 250 | | |
| Anti-cTip2 | Rat monoclonal | Gift from P. Gressens laboratory | 500* | | |
| Anti-Foxp1 | Rabbit polyclonal | Gift from P. Gressens laboratory | 1000* | | |
| Anti-cTip2 | Rat monoclonal | Gift from P. Gressens laboratory | 250 | | |
| Anti-Mouse HRP | Goat polyclonal | Jackson ImmunoResearch | | | 10000 |
| Anti-Rabbit HRP | Goat polyclonal | Jackson ImmunoResearch | | | 10000 |
| Anti-Mouse Alexa Fluor 488 | Goat polyclonal | Molecular Probes | 500 | 1000 | |
| Anti-Mouse Alexa Fluor 594 | Goat polyclonal | Molecular Probes | 500 | 1000 | |
| Anti-Rabbit Alexa Fluor 488 | Goat polyclonal | Molecular Probes | 500 | 1000 | |
| Anti-Rabbit Alexa Fluor 594 | Goat polyclonal | Molecular Probes | 500 | 1000 | |
| Anti-Rat Alexa Fluor 488 | Goat polyclonal | Molecular Probes | 500 | 1000 | |
| * Antigen retrieval | | | | | |

**Table 1. Antibodies used in this study**

## 3. Rôle d'Alix dans la morphologie et la fonction des synapses

Les résultats présentés dans cette partie sont associés à un article publié en 2015 dans Journal of Neuroscience que je signe en sixième auteur. Ma contribution personnelle étant mineure, cet article apparaît dans l'annexe 1 de ce manuscrit. Cependant, ces travaux menés par Romain Chassefeyre sur le rôle du complexe ESCRT-III dans la morphologie des épines dendritique sont étroitement reliés au phénotype adulte des souris Alix ko. Les résultats sur le phénotype synaptique des souris Alix ko seront donc précédés d'une brève description de ces travaux et du contexte dans lequel ils s'intègrent à mes travaux de thèse.

### 3.1. Contexte de l'étude

La morphologie et l'organisation moléculaire des épines dendritiques conditionnent de manière importante l'efficacité de cette transmission synaptique. Des altérations du fonctionnement des épines dendritiques sont considérées comme une cause majeure des dysfonctionnements neuronaux observés dans de nombreuses maladies neurodégénératives.

Des études ont montré l'implication des protéines du complexe ESCRT-III, et plus particulièrement la sous unité CHMP2B, dans le contrôle de la morphologie des épines dendritiques. La forme mutée de CHMP2B, associée à des formes familiales de démences fronto-temporales, retarde la maturation des épines dendritiques et altère leur morphologie (Belly et al., 2010). CHM2B, ainsi que tout le complexe ESCRT-III étant capable d'induire des déformations de la membrane plasmique (Bodon et al., 2011), il est intéressant de comprendre par quels mécanismes CHMP2B est capable de réguler le fonctionnement des épines dendritiques.

L'hypothèse de cet article est que CHMP2B pourrait réguler la morphogenèse des épines dendritiques et, de ce fait, être nécessaire pour la transmission et la plasticité synaptique.

Les principaux résultats de cet article décrivent CHMP2B comme une protéine neuronale, principalement enrichie dans les dendrites où elle forme des aggrégats souvent associés aux épines dendritiques (Figures 1 et 2). Cette localisation est corrélée avec l'analyse de la fonction de CHMP2B dans le développement de l'arborisation dendritique. La réduction de l'expression de CHMP2B ou l'expression de mutants d'interaction avec CHMP4B réduisent la maturation des neurones, en accord avec les travaux d'Agnès Belly (Figure 3). La perturbation du couple CHMP2B/CHMP4B a également une incidence sur la transmission synaptique et le maintien des synapses matures *in vitro* et *in vivo* (Figure 4 et 5). Enfin, la démonstration *in vitro* que l'absence de CHMP2B abolit les changements morphologiques des épines accompagnant la plasticité synaptique prouve, la encore, l'implication de CHMP2B dans le fonctionnement des épines matures (Figure 6). La suite de l'article caractérise la localisation ultrastructurale de CHMP2B au sein des épines dendritiques en microcopie électronique et en biochimie. L'analyse en microscopie électronique indique que CHMP2B est majoritairement localisée à proximité de la membrane plasmique en contact avec la densité post-synaptique (PSD) (Figure 7). Les analyses biochimiques ont permis de confirmer les données de microscopie électronique en montrant une forte association de la protéine avec les membranes dans une fraction enrichie en protéines de la PSD. Les extraits biochimiques contenant CHMP2B ont été isolés et soumis à une chromatographie d'exclusion de taille révélant qu'un tiers de CHMP2B est retrouvé dans une fraction de haut poids moléculaire (> 1,5 MDa). Cette fraction contient également la majeure partie de CHMP4B et d'Alix présents dans l'extrait initial (Figure 8).

L'ensemble de ces résultats indique donc que CHMP2B forme un complexe stable contenant, entre autres, CHMP4B et Alix au sein des épines dendritiques. La protéine CHMP2B semble être l'élément central de ce complexe indispensable à la régulation du développement, de la transmission et de la plasticité synaptique. La présence d'Alix au sein du complexe synaptique suggère qu'il assure une fonction régulatrice, comme il a déjà été montré dans la cytocinèse, le bourgeonnement viral et la réparation membranaire

## 3.2. Etude de la fonctionnalité synaptique chez les souris Alix ko

### 3.2.1. Morphologie des synapses chez la souris Alix ko

Les souris Alix ko présentent un phénotype développemental sévère ayant des conséquences importantes sur la différenciation neuronale. A l'âge d'adulte, les souris Alix ko présentent une hypofertilité et souffrent d'une perte de poids au cours du vieillissement sans réduction de leur durée de vie.

La caractérisation du phénotype neuronal de cette souris nous a permis de mettre en évidence l'apparition d'un neurodégénérescence. Nous avons effectué un suivi longitudinal du volume cérébral des souris Alix ko de 1 mois à 15 mois par IRM. Ce suivi met en évidence une réduction du parenchyme cérébral dès 1 mois, que nous expliquons par le phénotype décrit dans l'article 2. Cette réduction du parenchyme s'accentue avec l'âge à partir de 6 mois chez les souris Alix ko, comme l'atteste l'augmentation du volume des ventricules cérébraux (Figure 36).

Cette neurodégénérescence n'est pas accompagnée de mort neuronale ou de réaction astrocytaire, deux caractéristiques observées dans les pathologies neurodégénératives. Les altérations de la morphologie et du fonctionnement des épines dendritiques, telles que ce qui a été décrit en absence de CHMP2B et présenté dans l'article 3, sont des caractéristiques majeures des pathologies neurodégénératives causant une perte de la connectivité neuronale.

Nous avons alors cherché à savoir si l'absence d'Alix pouvait provoquer de telles perturbations morphologiques et fonctionnelles des synapses en perturbant le nouveau complexe synaptique formé des CHMPs.

#### 3.2.1.1. Déstabilisation du complexe ESCRT-III en absence d'Alix

L'analyse de l'absence d'Alix sur le complexe ESCRT-III synaptique a été réalisée sur des synaptosomes purifiés de cerveaux de souris Alix ko et wt. L'isolement de la fraction insoluble aux détergents au sein de ces synaptosomes permet d'analyser spécifiquement la présence des protéines associées à la densité post-synaptique. Nous avons pu mettre en évidence, par Western Blot, une réduction de la quantité de CHMP2B associée à la PSD dans les cerveaux Alix ko. Il semblerait également que la

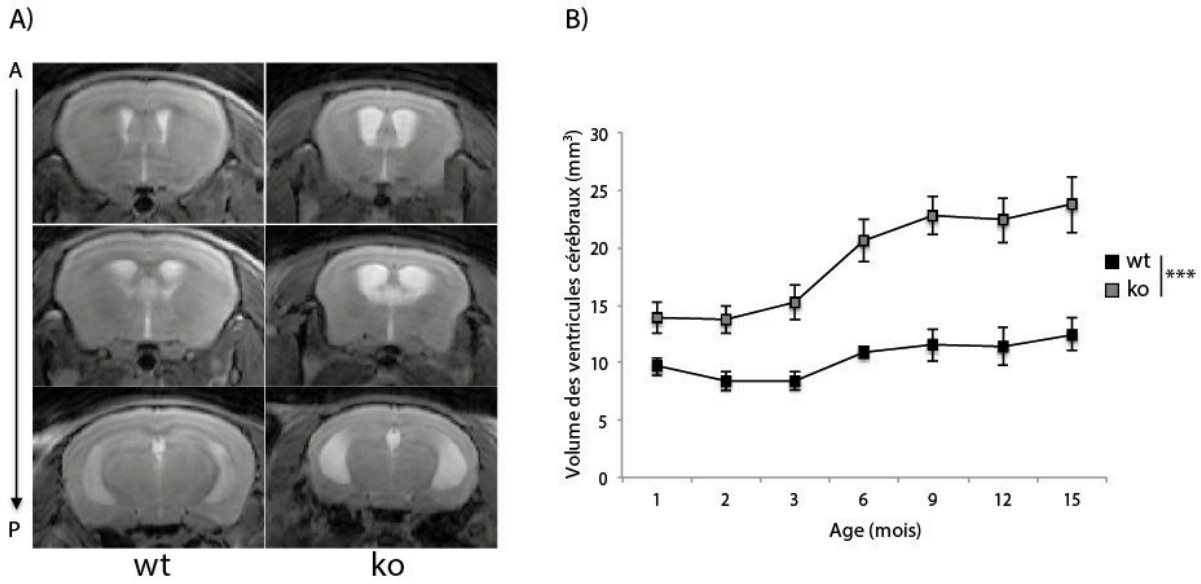



**Figure 36. Les souris Alix ko développent une neurogénérescence à partir de 6 mois**
A) Images IRM de cerveaux de souris âgées de 6 mois mettant en évidence l'augmentation des ventricules cérébraux des souris Alix ko selon l'axe antéro-postérieur.
B) Graphique représentant l'augmentation du volume ventriculaire au cours du vieillissement chez les souris wt et Alix ko. L'augmentation du volume ventriculaire est plus importante chez les souris ko à partir de 6 mois (n=5 ; ***p<0,001).

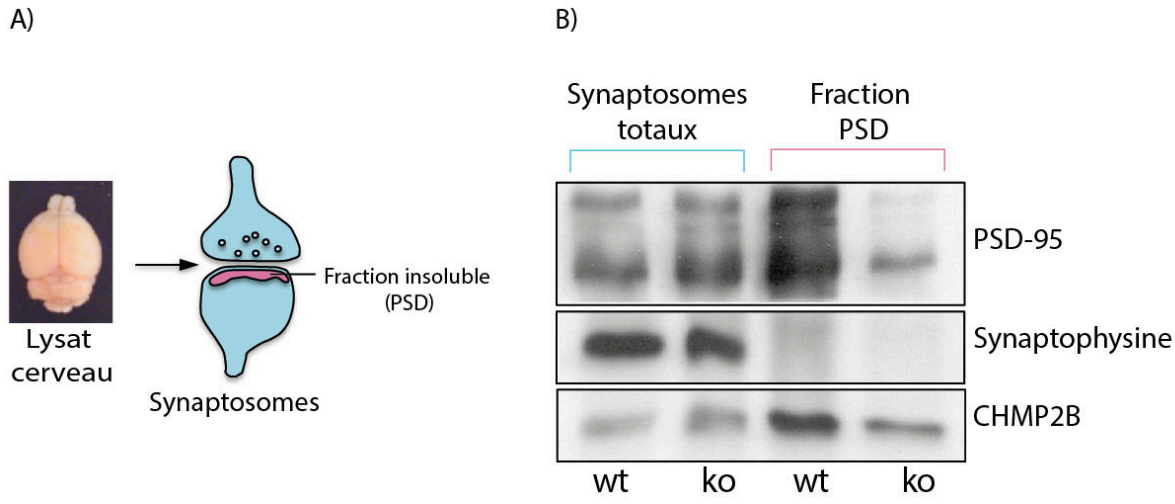



**Figure 37. Déstabilisation du complexe ESCRT post-synaptique chez les souris Alix ko**
A) Schéma illustrant le protocole expérimental utilisé pour purifier les synaptosomes et isoler la fraction PSD, insoluble aux détergents. Les synaptosomes sont solubilisés en Triton-X100 (0,5%), la fraction insoluble isolée par ultracentrifugation comprends les protéines du cytosquelette et les protéines associées à la densité post-synaptique. Les protéines cytosoliques ou uniquement présentes dans le bouton axonal en sont exclues.

quantité de PSD-95, la protéine résidente majeure la PSD, soit également réduite dans la fraction PSD des cerveaux Alix ko.

Alix semble dont participer à l'association de CHMP2B au complexe synaptique mis en évidence dans l'article 3 (Figure 37).

Suite aux expériences dans les fibroblastes démontrant que la surexpression de CHMP2B induit la formation de protrusions membranaires exclusivement formées de CHMP2B polymérisé sous forme de filaments (Bodon et al., 2011), nous avons testé la capacité des MEFs Alix ko à former ces tubes après la surexpression de CHMP2B. Nous avons pu mettre en évidence une réduction de 40% du nombre de cellules présentant des protrusions membranaires formées de CHMP2B (Figure 38).

Ensemble, ces résultats suggèrent qu'Alix pourrait réguler la présence du complexe ESCRT-III au niveau des membranes plasmiques leur permettant ainsi d'induire les remodelages membranaires qui leur sont propres. Compte tenu de ces résultats, nous avons étudiés la morphologie des épines dendritiques chez les souris Alix ko.

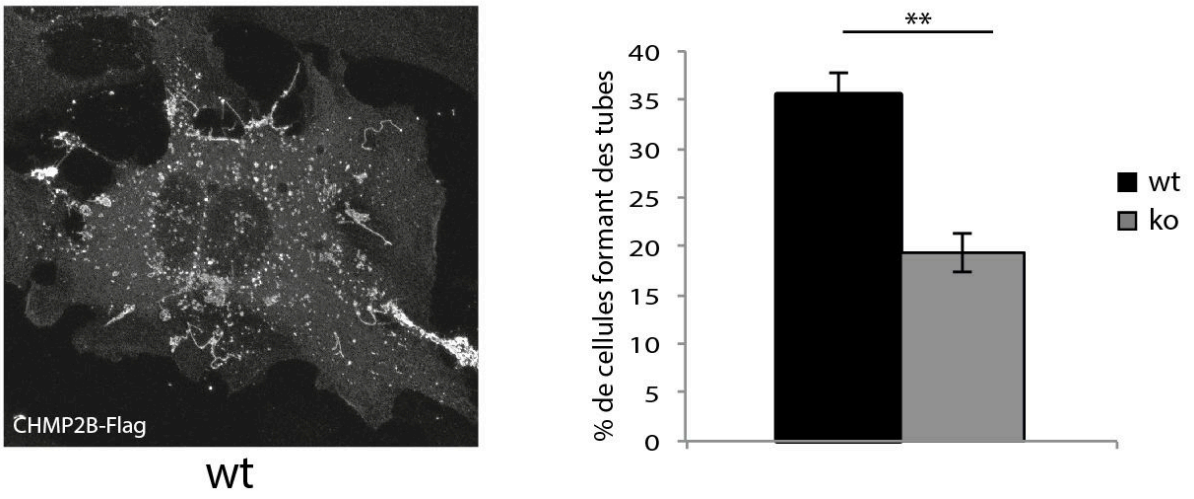



**Figure 38. Réduction de la stabilisation de CHMP2B en absence d'Alix**

La surexpression de CHMP2B induit la formation de protrusions membranaires uniquement composés de polymères de CHMP2B. La photo illustre la formation de tubes membranaires révélés par un anticorps anti-Flag dans une cellule considérée comme positive pour la quantification (n=3 ; *p<0,01).

### 3.2.1.2. Morphologie des synapses Alix ko *in vivo*

La morphologie des synapses influence leur efficacité de transmission. Les épines les plus efficaces étant les épines en « champignon » possédant une tête renflée d'un diamètre au moins deux fois supérieur à celui du cou qui la sépare du dendrite. De plus, le volume de la tête est directement proportionnel à celui de la PSD. Ces propriétés structurales conditionnent l'efficacité de la transmission synaptique en modulant le nombre de récepteur AMPA à la surface de l'épine et l'activation des cascades de signalisation mises en place au sein de l'épine.

L'observation des synapses dans l'hippocampe de souris Alix ko en microscopie électronique a révélé une altération de la morphologie des épines dendritique sans en diminuer la densité. Nous observons même une augmentation de la densité synapses de 25%, pouvant refléter un nombre absolu de synapse identique, compte tenu de la réduction du volume cérébral (30%) chez les souris Alix ko.

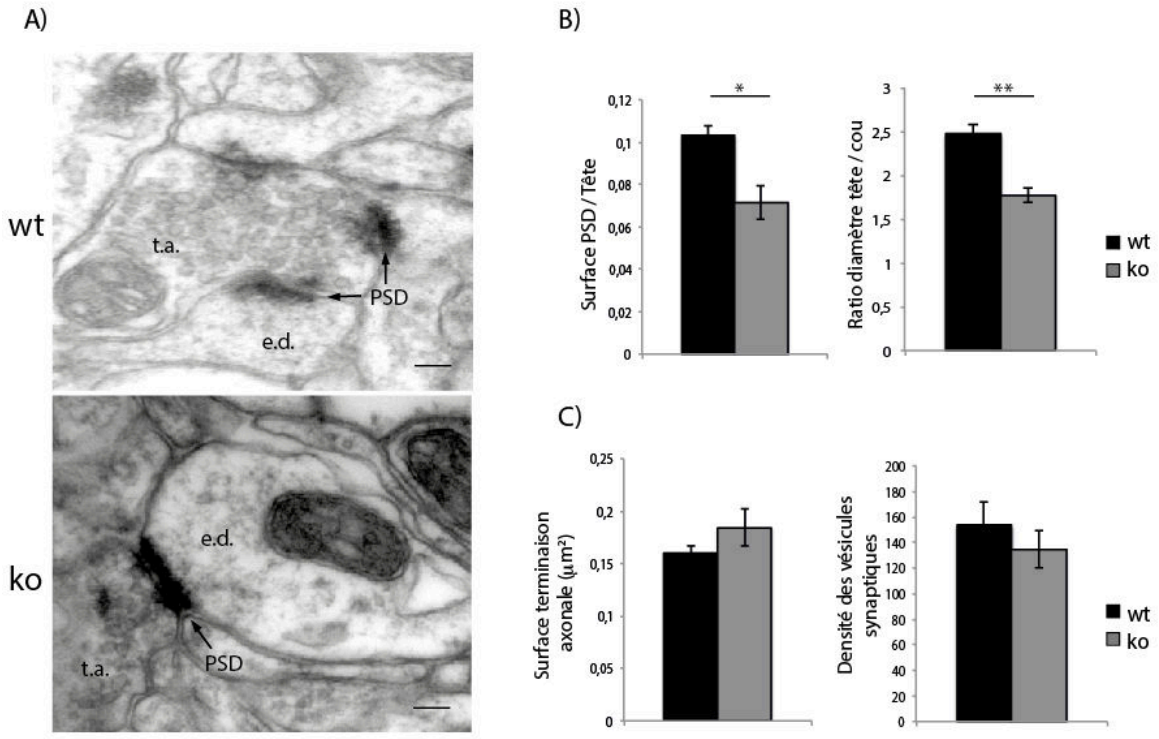



**Figure 39. Altération de la morphologie des synapses Alix ko**

A) Synapses d'hippocampes de wt (haut) et Alix ko (bas) observées en microscopie électronique à transmission. Les terminaisons axonales (t.a.) sont caractérisées par la présence de vésicules synaptiques. Les épines dendritiques (e.d.) sont caractérisées par la présence de la densité post-synaptique (PSD) dense aux électrons juxtaposée à la zone active de la terminaison axonale.

B) Quantifications des différents paramètres caractéristiques des épines dendritiques matures : Surface de la densité post-synaptique et de la tête de l'épine, diamètre de la tête et du cou de l'épine. Le graphique de gauche représente le ratio entre la surface de la PSD et celle de la tête, celui de droite représente le ratio entre le diamètre de la tête et du cou. Une réduction de ces deux ratios est observée chez les Alix ko (n=3 ; *p<0,05 ; **p<0,01)

L'analyse fine des synapses montre une réduction du ratio du diamètre de la tête sur le diamètre du cou des épines dendritiques des Alix ko. Cette réduction du ratio est corrélée avec une réduction de l'aire d'occupation de la PSD dans la tête des épines Alix ko. Ces deux caractéristiques sont un reflet de défauts de maturation des épines dendritiques suggérant fortement un défaut dans l'efficacité synaptique des animaux Alix ko. L'étude de la partie pré-synaptique n'a révélé aucune altération significative chez les Alix ko malgré une tendance à la réduction du nombre de vésicules pré-synaptiques, suggérant aussi un défaut d'efficacité synaptique (Figure 39).
Ces résultats nous ont donc poussé à étudier la transmission synaptique et la plasticité des animaux Alix ko.

### 3.2.2. Transmission synaptique et plasticité

#### 3.2.2.1. Enregistrements électrophysiologiques *in vivo*

En collaboration avec Fabien Lanté et Marta Roland (Equipe dirigée par Alain Buisson, GIN), nous avons étudié la transmission synaptique et la plasticité dans l'hippocampe de souris Alix ko.
La plasticité synaptique des animaux Alix ko a été évaluée par la capacité des synapses à induire et maintenir une potentialisation à long terme déclenchée par une série de stimulation haute fréquence (SHF). Les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) enregistrés correspondent à la réponse des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe suite à une stimulation des axones des collatérales de schaffler (CA3)( Figure 40A). L'amplitude des PPSE enregistrée après l'induction de la LTP est exprimée en pourcentage des 20 dernières réponses enregistrées avant la SHF. Nous pouvons voir que l'induction de la LTP est réalisée chez les animaux ko avec un taux comparable aux wt, cependant les ko ne sont pas capables de maintenir la LTP puisque l'amplitude des PPSE enregistrés a tendance à retourner au niveau basal pré-SHF au lieu de se maintenir dans le temps comme dans les wt (Figure 40B). Ces résultats démontrent un défaut de plasticité synaptique chez la souris Alix ko.
La transmission synaptique basale a également été étudiée par l'enregistrement de la réponse post-synaptique à un stimulus donné, dont l'amplitude est directement proportionnelle à l'intensité du stimulus. L'augmentation de amplitude des PPSE mesurée après des stimuli de 35 à 60 µA n'est pas altérée chez les souris Alix ko par rapport aux individus wt (Figure 40D).

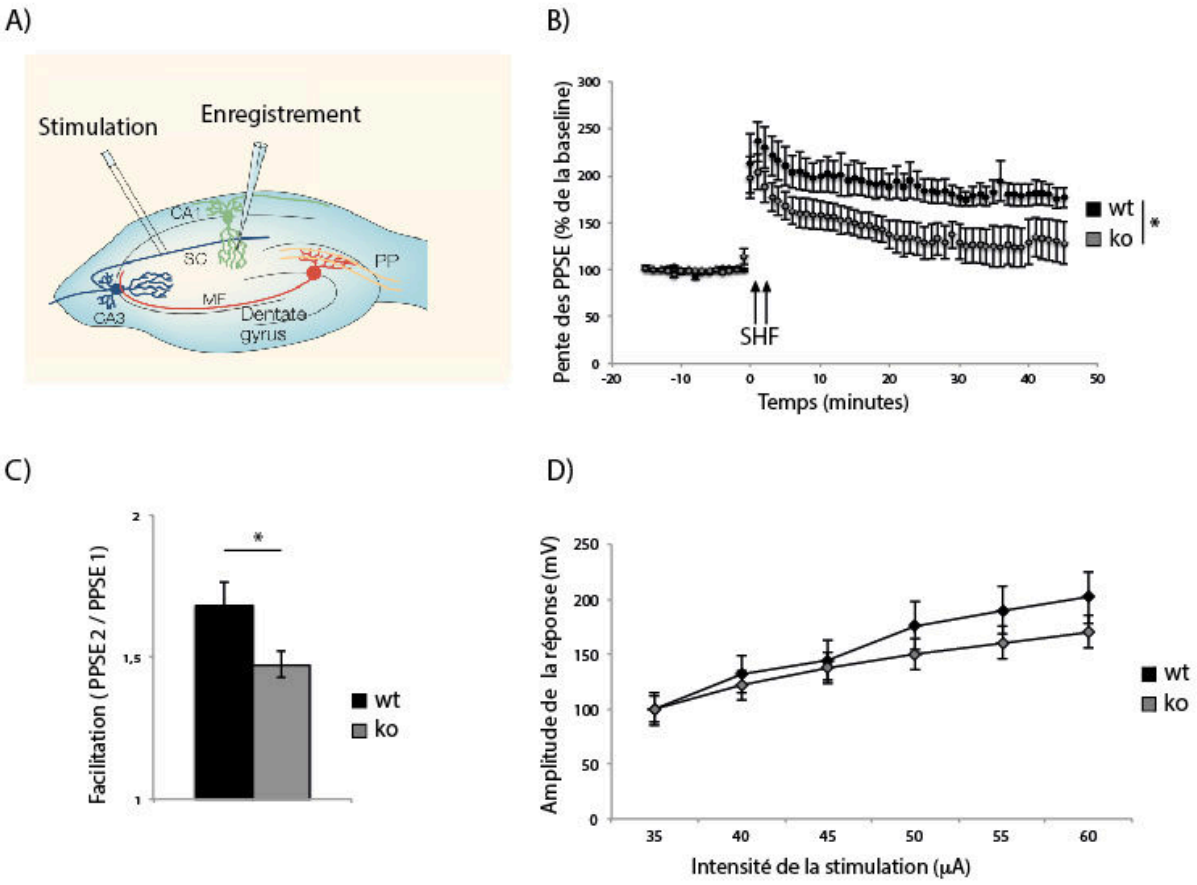



**Figure 40. Altération de la plasticité synaptique chez les souris Alix ko.**
A) Schéma illustrant la position des électrodes de stimulation et d'enregistrement au niveau de l'hippocampe de souris
B) Tracés de l'enregistrement extracellulaire de l'amplitude des PPSE déclenchés par une stimulation à 40 mA avant et après la stimulation haute fréquence (STF). L'amplitude des PPSE post-STF est exprimée en pourcentage de la moyenne des PPSE pré-SHF (n=4 ; *p<0,05).
C) Le « paired-pulse » ratio est obtenu par l'enregistrement extracellulaire des PPSE obtenus en réponse à deux stimulations identiques séparées de 25 ms. Le graphique représente le ratio de la seconde réponse sur la première (n=3 ; *p<0,05).
D) La courbe Imput / Output est obtenue par l'enregistrement extracellulaire des PPSE obtenus en réponse à une série de stimulations d'intensité croissantes (de 35 à 60 µA) à 15 secondes d'intervalle (n=4).

#### 3.2.2.2. Recrutement d'Alix sous stimulation

Alix semble donc uniquement nécessaire pour la plasticité synaptique, sans moduler la transmission neuronale basale. Une hypothèse sur la fonction d'Alix serait qu'elle pourrait recruter les CHMPs au niveau de la synapse en condition de stimulation afin de permettre les modifications morphologiques nécessaires à la plasticité synaptique. Sur un modèle de neurones en culture, nous avons observé le recrutement d'Alix et de

CHMP2B au niveau des synapses après stimulation chimique en présence biccuculine (antagoniste des récepteurs GABA inhibiteurs) et de 4-aminopyridine (bloqueur des canaux potassiques). Cette stimulation permet une dépolarisation continue des neurones mimant les premières phases de la LTP (Leveille et al., 2008). La purification des synaptosomes de neurones analysés par Western blot a permis de montrer une augmentation significative d'Alix dans les synases après 15 min de stimulation (Figure 41A). Les travaux de Florent Lemaitre et Kwangil Chi, deux étudiants en master ayant travaillé sur ce projet, ont permis de discriminer la localisation d'Alix-GFP dans les synapses avant et après stimulation en microscopie à fluorescence culture primaires de neurones. Alors qu'Alix deux fois plus enrichie des épines dendritiques que la mcherry en condition basale la stimulation n'induit aucune augmentation de la quantité d'Alix dans ces épines (Figure 41B et C). Ces résultats semblent indiquer qu'Alix se comporte plutôt comme une protéine résidente de l'épine dendritique indifféremment de l'activité synaptique. En revanche, cette stimulation provoque un recrutement massif et transitoire d'Alix dans le bouton axonal pré-synaptique (Figure 41D).

Ces résultats semblent donc indiquer qu'Alix est une protéine présente au niveau des synapses qui peut être mobilisée au niveau de la partie pré-synaptique sous contrôle de l'activité neuronale.

Nous avons testé l'hypothèse qu'Alix puisse être recrutée de manière dépendante à l'entrée de calcium provoquée par la stimulation neuronale. Des expériences dans les MEFs Alix ko nous ont permis de montrer que le recrutement d'Alix à la membrane plasmique était dépendant du calcium. L'utilisation de digitonine permet la formation de pore membranaire élevant la concentration de calcium intracellulaire au niveau du pore. Nous avons pu montrer qu'en présence de digitonine, Alix est recrutée au niveau de la membrane plasmique et que ce recrutement est inhibé par la présence d'EGTA (chélateur calcique). De plus, nous avons observé que ce recrutement d'Alix était associé au recrutement de CHMP2B et CHMP4B, également sous la dépendance du calcium (Figure 42B). Enfin, ce recrutement de CHMP2B et CHMP4B est fortement altéré dans les MEFs Alix ko, mettant en évidence le rôle primordial d'Alix dans l'assemblage de ce complexe membranaire sous dépendance du calcium (Figure 42A et C).

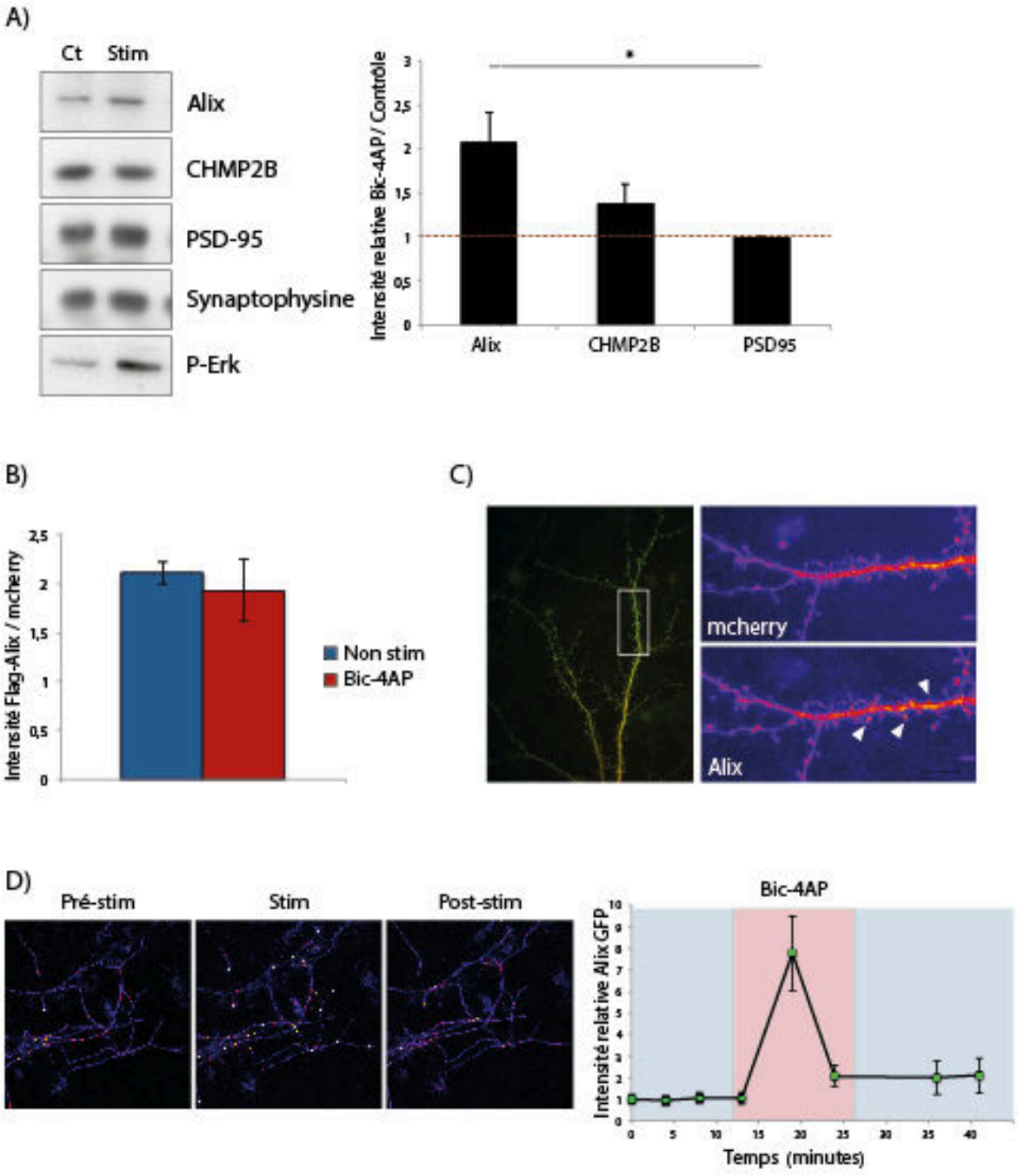



**Figure 41. Alix est recruté au bouton axonal sous activité neuronale**

A) Western Blot des synaptosomes et de la fraction PSD purifiés de neurones corticaux stimulés en Bic-4AP. PSD95 et synaptophysine sont des protéines synaptiques respectivement associées et exclues de la fraction PSD. La présence de la forme phosphorylée de Erk témoigne de la stimulation neuronale. Le graphique représente la quantification de l'enrichissement d'Alix et de CHMP2B dans la fraction PSD après stimulation. Le graphique représente le ratio de la quantité d'Alix, de CHMP2B et de PSD95 associé à la fraction PSD des neurones stimulés et non stimulés. PSD95, non affecté par la stimulation est utilisé comme un contrôle interne (n=4 ; *p<0,05).

B) Quantification de l'enrichissement d'Alix dans l'épine dendritique de neurones stimulés et non stimulés. L'intensité de Flag-Alix rapportée à l'intensité de la mcherry dans les épines.

C) Photos de la présence d'Alix dans les épines dendritiques de neurones non stimulés. Les flèches montrent les épines enrichies en Alix comparés à la mcherry.

D) Recrutement d'Alix aux boutons axonaux de neurones stimulés. Le graphique représente l'intensité d'Alix mesurée dans les boutons axonaux rapporté à l'intensité d'Alix présente dans l'axone.

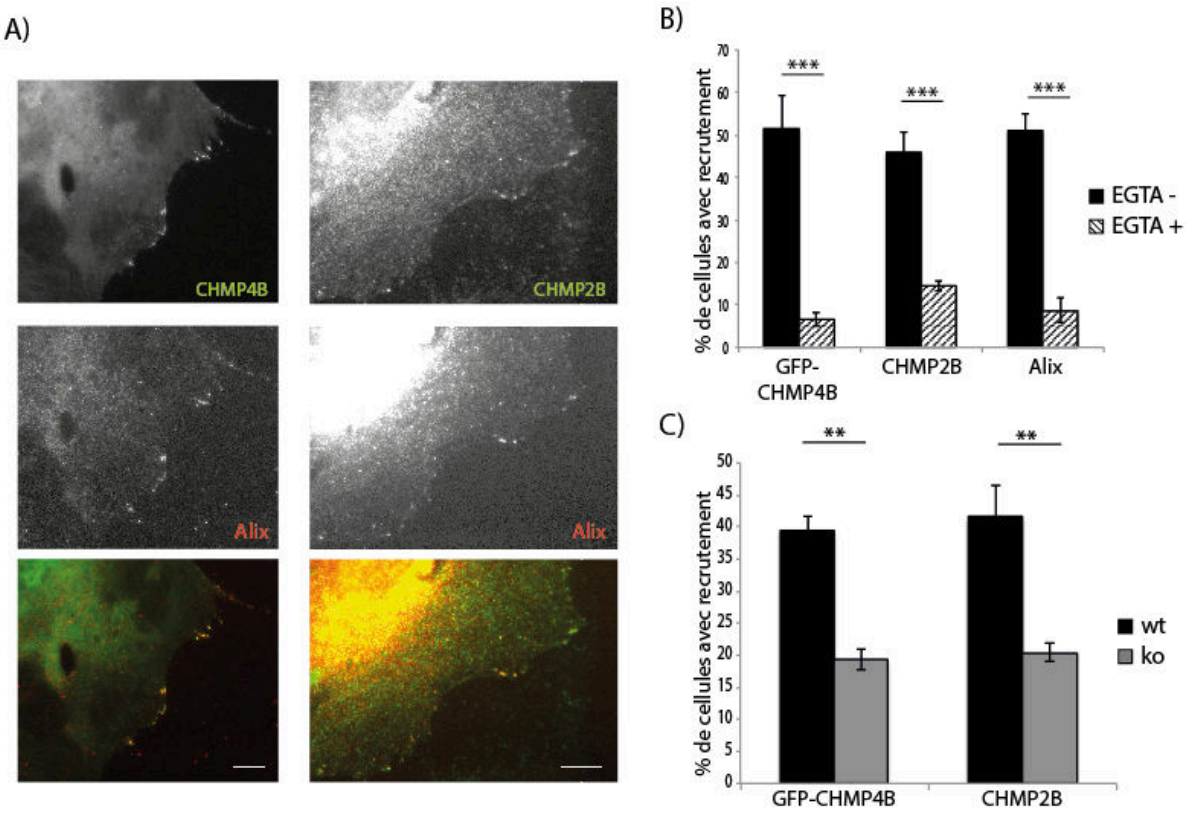



**Figure 42. Alix peut recruter ses partenaires à la membrane plasmique sous la dépendance du calcium**
A) Images représentatives du recrutement de CHMP4B, CHMP2B et Alix à la membrane plasmique des MEF après traitement à la digitonine.
B) Quantification du recrutement d'Alix, de CHMP2B et de CHMP4B par traitement à la digitonine en présence ou absence d'EDTA montrant que la chélation du calcium extracellulaire abolit le recrutement des 3 protéines à la membrane plasmique (n=3 ; ***p<0,001)
C) Quantification du recrutement de CHMP2B et CHMP4B en absence d'Alix (n=3 ;**p<0,001).

### 3.2.2.3. Altération de l'endocytose pré-synaptique

Ces résultats sur le recrutement d'Alix laissent imaginer une fonction d'Alix dans la régulation de l'activité neuronale au bouton axonal. Les travaux d'électrophysiologie menés en collaboration avec Fabien Lanté et Marta Roland ont permis de mettre en évidence une légère altération de fonctionnalité pré-synaptique par une expérience de « Paired-Pulse Ratio ». Cette expérience consiste à induire deux stimulations d'intensité identique à haute fréquence (25 ms d'intervalle). La proximité temporelle de ces deux stimulations provoque un relargage consécutif de glutamate augmentant l'amplitude de la réponse post-synaptique au deuxième stimulus et reflète la disponibilité des vésicules

synaptiques prêtes à fusionner. Les souris Alix ko présentent une altération dans la capacité à augmenter la réponse post-synaptique au deuxième stimulus (Figure 40C).

Un des mécanismes majeur dans le maintien du pool de vésicule synaptique est l'endocytose compensatoire déclenchée par la stimulation neuronale. Jusqu'à récemment, il était décrit que cette endocytose reposait sur la voie dépendante de la clathrine. Nous savons aujourd'hui que cette voie n'est pas suffisante pour assurer un recyclage efficace des vésicules synaptiques, particulièrement en condition de forte activité neuronale où des voies indépendantes de la clathrine, plus rapides, doivent prendre le relai (Cheung et al., 2010; Kononenko et al., 2014).

En adéquation avec les résultats précédent et les travaux de Vincent Mercier sur le rôle d'Alix dans l'endocytose indépendante de la clathrine (article 1), nous avons cherché à savoir si l'absence d'Alix impactait l'endocytose de masse (Bulk endocytosis) provoquée par une forte stimulation. Ces expériences ont été réalisées *in vitro* sur des neurones granulaires de cervelet stimulés par 50mM de potassium. Les neurones ont été stimulés en présence de HRP (Horseradish Peroxidase) libre pour marquer les vésicules formées au cours de la stimulation, et observés en microscopie électronique à transmission (Figure 43A). Cette stimulation provoque une augmentation significative de structures vésiculaires marquées par la HRP (Figure 43B). Les vésicules synaptiques formées par la voie clathrine dépendante ont un diamètre régulier n'excédant par 100 nm, permettant de les distinguer des « bulk endosomes » à l'architecture variable et au diamètre supérieur à 100 nm. Nous pouvons observer une réduction majeure du nombre de bulk endosomes formés au cours de la stimulation dans les neurones Alix ko comparés aux wt (Figure 43C). Ce défaut de formation des bulk endosomes est compensé par une augmentation du nombre de vésicules formées par la voie dépendante de la clathrine montrant ainsi une spécificité du rôle d'Alix dans les voies indépendantes de la clathrine (Figure 43C).

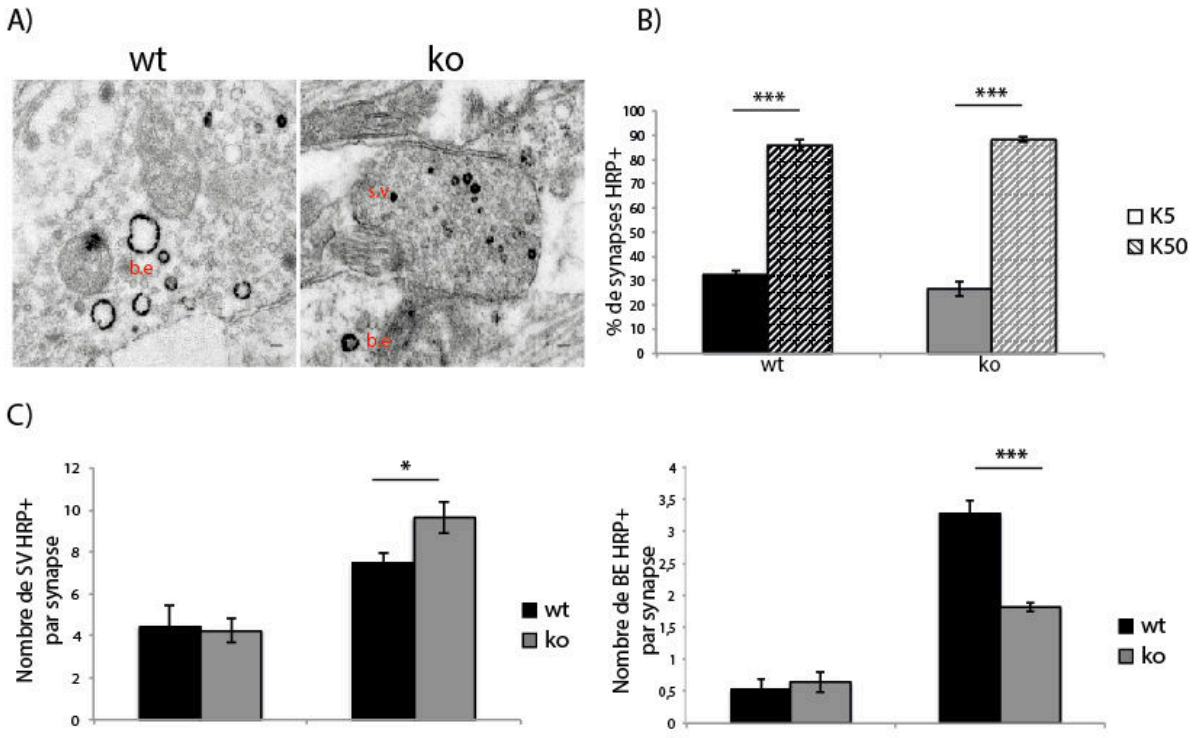



**Figure 43. L'absence d'Alix perturbe l'endocytose présynaptique déclenchée par la stimulation neuronale**

A) Images de synapses de neurones granulaires de cervelets stimulés en K50 en présence de HRP libre observées au microscope électronique à transmission. La HRP marque les vésicules synaptiques (v.s) et les bulk endosomes (b.e) formés au cours de la stimulation.

B) Graphique représentant le nombre de synapses présentant des compartiments HRP+ en condition stimulée (K50) et non stimulée (K5). La stimulation est aussi efficace dans les synapses wt et Alix ko (n=4 ;***p<0,001).

C) Graphique représentant le nombre de vésicules synaptiques et de bulk endosomes formés dans les neurones stimulés et non stimulés. La réduction du nombre de bulk endosome formé dans les Alix ko est compensée par une augmentation du nombre de vésicules synaptiques (n=4 ;*p<0,05 ;***p<0,001).

L'ensemble de ces résultats démontre une fonction d'Alix dans la régulation de la morphologie et du fonctionnement de la synapse. Elle semble être requise pour le contrôle la morphologie des épines dendritiques en association avec CHMP4B et CHMP2B du complexe ESCRT-III. De plus, son absence entraine une altération de la plasticité synaptique, possiblement provoquée par une perte de l'endocytose pré-synaptique. Dans ce cas la, l'importance de l'interaction avec les endophilines impliquée dans cette voie d'endocytose à la synapses, reste à élucider.

L'importance d'Alix dans la fonctionnalité synaptique est davantage soulignée par l'apparition d'une neurodégénérescence chez les individus Alix ko vieillissant.

# DISCUSSION

Les travaux présentés dans ce manuscrit permettent une avancée dans la compréhension de la fonction physiologique d'Alix. Jusqu'alors, Alix a été impliquée dans de diverses fonctions allant du contrôle de l'apoptose à l'adhésion cellulaire en passant par le bourgeonnement des virus enveloppés, la cytocinèse, l'endocytose et la réparation membranaire en association avec ses nombreux partenaires. Dans la littérature, Alix a été caractérisée comme une protéine aux multiples facettes assurant une fonction différente selon les partenaires recrutés. Cette absence de cohésion entre les différentes fonctions cellulaires nous empêche de mettre en évidence un mécanisme potentiel général par lequel Alix assure toutes ces fonctions.

Nos résultats *in vivo* et *in vitro* sur la souris Alix ko montrent qu'Alix est impliquée dans l'endocytose indépendante de la clathrine, dans le maintien des cellules de la glie radiaire et des neuroblastes au cours de la neurogenèse, dans la différenciation neuronale post-natale et dans la morphologie et la fonction des synapses. Encore quatre nouvelles fonctions qui mettent cependant en évidence quelques similitudes mécanistiques. Chacun de ces processus repose sur des remodelages des membranes cellulaires. Cependant, ces remodelages membranaires sont de topologies inversées et une dichotomie est toujours présente sur le sens du remodelage de la membrane dans lequel Alix assure sa fonction : Par l'intérieur avec les Tsg101 et CHMP4B ou par l'extérieur avec les endophilines et CIN85 ?

Cette discussion s'attachera à confronter nos résultats avec ceux de la littérature et savoir si l'hypothèse selon laquelle Alix est un régulateur du remodelage des membranes s'applique à toutes ses fonctions.

## 1. Endocytose clathrine indépendante : Avec ou sans ESCRT ?

Les travaux de Vincent Mercier ont caractérisé, pour la première fois, la fonction d'Alix dans l'endocytose indépendante de la clathrine (Article 1). Ces travaux ont montré que l'absence d'Alix réduit fortement l'endocytose de cargos empruntant les deux voies d'endocytose comme l'intégrineβ1 et la chaine B de la toxine du choléra (CTxB) sans n'avoir aucun impact sur l'endocytose de protéines strictement dépendantes de la clathrine telle que le récepteur à la transferrine. Ces travaux ont également montré que l'interaction d'Alix avec ses partenaires CIN85 et les endophilines A est nécessaire pour

assurer l'endocytose de la CTxB. Ces résultats ne sont pas sans rappeler les travaux Schmidt et coll. sur le rôle d'Alix dans l'endocytose du récepteur à l'EGF (EGFR) (Schmidt et al., 2004). Cependant, ces travaux montrent une fonction inhibitrice d'Alix dans l'endocytose de l'EGFR. Plus précisément, les auteurs prouvent que la surexpression d'Alix dans des cellules HeLa inhibe l'interaction du complexe CIN85-Endophiline-EGFR avec Cbl, réduisant ainsi l'internalisation du récepteur. Un an plus tard, ils montrent que la phosphorylation d'Alix réduit son interaction avec CIN85 et lève ainsi l'inhibition sur la formation du complexe CIN85-Endophiline-EGFR-Cbl (Schmidt et al., 2005)(Figure 35). Cependant, ces articles ne montrent pas les conséquences de l'absence d'Alix sur la formation de ce complexe. Il est tout à fait envisageable qu'Alix soit nécessaire à la mise en place de ce complexe au niveau de la membrane plasmique et que sa phosphorylation par Src permette le recyclage d'Alix en le renvoyant vers le cytosol permettant ainsi l'internalisation du récepteur. Cette interprétation est en adéquation avec les travaux du laboratoire montrant qu'une forme tronquée d'Alix ne possédant plus le site de fixation de Src mais toujours capable d'interagir avec les endophilines et CIN85, forme des structures tubulo-vésiculaires associées à la membrane plasmique (Chatellard-Causse et al., 2002).

L'inhibition de l'endocytose indépendante de la clathrine induite par l'absence d'Alix provoque différentes conséquences physiologiques, telles qu'une augmentation de l'étalement et la réduction de la migration cellulaire qui semble être également dépendante de l'interaction d'Alix avec les endophilines. De manière intéressante, les protéines ESCRT ont aussi été impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire par la régulation des adhésions focales (Lobert and Stenmark, 2012). De plus, les complexes ESCRT-I et ESCRT-III ont spécifiquement été impliqués dans le trafic endosomal de Src et semblent être requis pour l'acheminement de Src au niveau de la membrane plasmique régulant ainsi les kinases des adhésions focales (FAK) (Tu et al., 2010). Ces résultats suggèrent un rôle des ESCRT au niveau de la membrane plasmique, ces complexes pourraient être responsables de l'état de phosphorylation d'Alix à la membrane et ainsi moduler ses fonctions dans l'endocytose. D'ailleurs, les travaux de Vincent Mercier montrent que l'endocytose de la CTxB est partiellement abolie en présence du mutant d'interaction entre Alix et CHMP4B complexe ESCRT-III.

Ces travaux réconcilient donc partiellement la dichotomie existante entre les fonctions d'Alix dans l'endocytose et son association avec les complexes ESCRT.

## 2. L'endocytose clathrine indépendante à l'origine du développement cérébral ?

Les travaux sur le rôle d'Alix dans les fibroblastes embryonnaires ont naturellement orienté nos interprétations sur le phénotype développemental du système nerveux de la souris Alix ko (article 2). Pour rappel, ces souris sont viables et ont une durée de vie comparable aux animaux contrôles. Les souris se développent apparemment normalement mise à part une sévère réduction du volume testiculaire et cérébral. La réduction du volume ventriculaire cérébral apparaît au cours du développement embryonnaire et s'accentue au cours du développement post-natal suggérant que deux évènements distincts aboutissent à la microcéphalie observée chez les animaux ko.

### 2.1 Développement embryonnaire

Au cours de la neurogenèse précoce, l'absence d'Alix provoque une mort apoptotique massive au niveau du télencéphale aboutissant à la perte d'une partie des cellules de la glie radiaire (RGC) entre le jour embryonnaire E11,5 et E12,5.
Ces cellules étant à l'origine de toutes les cellules du système nerveux central, leur perte a pour conséquence une réduction des progéniteurs intermédiaires et des neurones qui en découlent. Plus précisément, ces cellules sont responsables de l'expansion latérale du cortex en donnant directement naissance à 1 neurone dans le cas de la neurogenèse direct et en multipliant le nombre de neurone la formation de progéniteurs intermédiaires dans le cas de la neurogenèse indirecte.
Concernant la neurogenèse directe, la division asymétrique d'une RGC donne une RGC et un neuroblaste qui va migrer le long des processus formés par la RGC. Chez les embryons Alix ko à E11,5, nous avons observé le déclenchement de l'apoptose dans les cellules de la glie radiaire mais également dans une population de cellules alignées le long de la glie radiaire faisant penser aux neuroblastes en migration. A E12,5 les cellules en apoptose se localisent d'avantage dans la couche corticale et expriment le marqueur Tuj1 de différenciation neuronale. Ces observations suggèrent que les neuroblastes issus de la neurogenèse directe sont aussi sensibles à l'absence d'Alix. Nous savons que les neuroblastes entretiennent une étroite relation avec la RGC sur laquelle il migre via

l'activation de voies de signalisations réciproques. Le neuroblaste assure le maintien de la RGC sur laquelle il migre et vis versa. On pourrait alors imaginer que l'apoptose observée dans les neuroblastes soit une conséquence de la mort « sa » RGC et réciproquement, même si nous n'avons pas pu prouver ce phénomène sur des tissus fixés. L'utilisation de cultures d'explants de cortex embryonnaires permettant une observation dynamique des cellules entrant en apoptose nous permettrait de répondre à cette interrogation.

Cette hypothèse est d'autant plus intéressante puisqu'il existe une étroite relation entre un neuroblaste et la RGC sur laquelle il migre. Il est communément admis que le récepteur Notch est déterminant dans l'établissement et le maintien des RGC (Gaiano et al., 2000). Il a été montré que ce maintien des cellules de la glie radiaire dépendait étroitement de l'activation de Notch, notamment via Delta-like-I, un de ses ligands exprimé par les neuroblastes et les progéniteurs intermédiaires (Campos et al., 2001; Nelson et al., 2013a)(Figure 6). Plus précisément, l'endocytose de Delta-like-1 dans les neuroblastes et les progéniteurs intermédiaires est nécessaire à l'activation de Notch et au maintien des RGC (Yoon et al., 2008). De manière intéressante, des travaux chez la drosophile ont permis de montrer que l'endocytose de Delta passait par une voie clathrine indépendante (Windler and Bilder, 2010). Nous pourrions alors facilement imaginer que l'absence d'Alix bloque l'internalisation clathrine-indépendante de Delta-like-1 sur les neuroblastes, inhibant ainsi l'activation de Notch dans les cellules de la glie radiaire. Par ailleurs, il a été montré que l'inhibition de l'activité de Notch dans le système nerveux central aboutissait à la mort des RGC et des neurones nouvellement formés, en adéquation avec nos résultats (Mason et al., 2006).

De plus, une étude menée sur le *C. elegans* démontre que l'inhibition d'Alx-1, l'homologue d'Alix chez le nématode, provoque un blocage de la dégradation de Notch dans les cellules précurseurs de la vulve. Bien que l'absence d'Alix n'ait pas d'incidence directe dans ce contexte particulier, elle résulte tout de même du blocage de Notch dans les endosomes. Cet article démontre l'implication d'Alx-1 dans le contrôle du trafic endosomal de Notch (Shaye and Greenwald, 2005). Par ailleurs, l'homologue de CHMP4 chez la drosophile (Shrub) a été impliqué dans l'activation d'une voie Notch indépendante de Delta. En effet, Notch peut également être activé au sein des endosomes tardifs/lysosomes par le clivage de sa partie extracellulaire (intra-endosomale) assuré par les protéases lysosomales. Shrub pourrait favoriser

l'internalisation de Notch dans les ILV afin de le délivrer dans les lysosomes ou les clivages protéolytiques permettraient son activation (Hori et al., 2011).

Enfin, il a été montré que le trafic endosomal de Notch était déterminant dans les processus de division asymétrique nécessaire à l'apparition des neuroblastes dans le système nerveux central. Une étude chez le poisson-zèbre a permis de montrer que la détermination du devenir des cellules filles après une division asymétrique reposait sur la localisation d'endosomes particuliers : les Sara (Smad anchor for receptor activation) endosomes. Ces endosomes sont issus de la voie endosomale et vont se répartir de manière asymétrique dans les deux futures cellules filles. La détermination du devenir de la cellule fille dépendra des cargos portés par les Sara endosomes parmi lesquels Notch et Delta sont retrouvés (Kressmann et al., 2015). Dans ce contexte, Alix pourrait donc réguler la présence de ces cargos Notch et Delta dans les Sara endosomes et ainsi déterminer le devenir des cellules filles après la division.
L'utilisation de morpholino ciblant l'ARN d'Alix dans le modèle du poisson zèbre, où l'influence des sara endosomes sur le mode de division a bien été décrite, nous permettrait de connaître l'implication d'Alix dans ce processus.

La fonction connue d'Alix dans la cytocinèse nous a également poussé à étudier ce mécanisme à proprement parler. Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, aucune altération de la cytocinèse n'a pu être observée *in vitro* sur cellules isolées (C. Chatellard, A. Petiot). *In vivo*, l'analyse par FACS des progéniteurs isolés à partir de cortex embryonnaires démontre l'absence de cellules plurinuclées et une prolifération comparable entre les cortex Alix ko et wt suggérant que la cytocinèse n'est pas altérée de manière majeure en absence d'Alix. Nous avons également cherché à savoir si le phénotype testiculaire pouvait également être causé par une défaut de cytocinèse en absence d'Alix. La formation des spermatozoïdes (spz) individualisés passe par une étape de syncytium où tous les spz sont reliés entre eux des ponts intercellulaire qui sont rompus par un phénomène concomitant de cytocinèse. La morphologie des testicules observée en coupe transversale n'indique aucune altération de ce type dans la formation des spz qui semblent fonctionnels malgré une hypofertilité observée chez les males Alix ko. Ces résultats semblent donc suggérer une absence d'implication d'Alix dans la cytocinèse in *vivo* et *in vitro* et vont à l'encontre des résultats publiés jusqu'alors

(Carlton and Martin-Serrano, 2007; Eikenes et al., 2015). Il n'est cependant pas impossible les cellules apoptotiques observées résultent d'une division abortive nous empêchant ainsi d'observer un quelconque défaut de cytocinèse.

Il existe, bien sur, une toute autre interprétation de ce phénotype de microcéphalie chez la souris alix ko. Compte-tenu de la fonction déterminante d'Alix dans le contrôle de l'apoptose, il est possible que l'apparition massive de l'apoptose ne soit pas une simple conséquence d'un défaut d'endocytose ou de cytocinèse mais bel et bien une dérégulation de cette voie causée par l'absence d'Alix. Les travaux sur la caractérisation de la fonction d'Alix dans l'apoptose, mettent en évidence la subtilité avec laquelle Alix contrôle l'activité des caspases. Alix, de concert avec Alg-2 et les protéines ESCRTs, est à la fois impliquée dans l'apoptose intrinsèque et extrinsèque déclenchées respectivement par une augmentation de calcium intracellulaire et l'endocytose du TNFR-1. La fonction d'Alix semble être centrale dans l'activation des voies apoptotiques puisqu'elle assure un contrôle de l'activation des caspases dites « initiatrices » 8 et 9 (Mahul-Mellier et al., 2008; Strappazzon et al., 2010). De ce fait, Alix permet d'établir un équilibre entre induction et inhibition de l'apoptose déclenchée par des facteurs intra ou extracellulaires. Dans un contexte aussi particulier que celui du cortex en développement, l'absence d'une protéine aussi centrale pourrait conduire à une perte totale de contrôle des voies apoptotiques. Afin de comprendre si l'activation de la caspase 8 ou 9 étaient à l'origine de l'activation observée de la caspase 3, nous avons analysé l'état d'activation de la caspase 8 dans les cortex embryonnaires Alix ko. Cependant, nous n'avons observé la présence de la forme activée de cette caspase à partir d'extrait de cortex analysés en Western Blot. La possibilité que la caspase 9 soit suractivée en absence d'Alix reste une piste à explorer.

## 2.2 Développement post-natal

L'absence d'Alix n'aboutit pas à une destruction totale de toutes les RGC. Les cellules non affectées par l'absence d'Alix développent d'ailleurs des colonnes corticales identiques à celles des animaux contrôles, si bien que l'expansion radiale du cortex et la mise en place des couches ne sont pas affectées chez les souris Alix ko. Cependant, chez les adultes l'épaisseur du cortex est caractérisée par une réduction de 20% causée par

une altération du développement de l'arborisation dendritique *in vivo* et *in vitro*. Les neurones en culture présentent un retard dans l'apparition des neurites, dans la différenciation de l'axone et une légère réduction de la longueur des prolongements corrélés avec une altération de la structure du cône de croissance.

Nous savons aujourd'hui que les molécules d'adhésion, telles que la protéine L1/Ng-CAM, jouent une fonction fondamentale dans la pousse neuritique et la différenciation axonale. Concernant L1, il a été montré que son endocytose était requise pour la pousse neuritique et la différenciation axonale (Kamiguchi and Lemmon, 2000; Wisco et al., 2003). La différenciation axonale est assurée par un phénomène de transcytose par lequel L1 est endocytée au niveau des dendrites et trafique jusqu'à l'axone dans les endosomes précoces sous le contrôle des protéines EHD1/EHD4 (Epsin15 homology domain 1/4) (Yap et al., 2010).

Des travaux menés chez le *C. elegans* ont démontré que Alx-1 interagit avec RME-1, l'homologue de EHD1 chez le nématode (Shi et al., 2007). Cette étude montre que Alx-1 interagit directement avec RME-1 et que cette interaction est indispensable pour le traffic endosomal et le recyclage de protéines intestinales. L'utilisation d'un mutant d'Alx-1 délété de sa partie N-terminale aboutit à l'accumulation des protéines intestinales dans les endosomes de recyclage. Ce résultat est confirmé dans des cellules de mammifères où l'expression d'Alix tronquée abolit le recyclage des protéines spécifiquement recyclées par la voie RME-1/EHD1. Bien que ce processus semble plutôt impliquer Alx/Alix dans le recyclage de protéines de surface, ces résultats pourraient aussi s'expliquer par un défaut de l'endocytose de ces récepteurs aboutissant à leur accumulation dans les endosomes précoces et de recyclage. Par ailleurs, le rôle de EHD1 dans le système nerveux ne semble pas relié au recyclage mais uniquement à l'endocytose de L1 (Lasiecka et al., 2010). Ainsi, Alix serait un parfait candidat pour réguler l'internalisation de L1. Nos résultats montrent un défaut d'endocytose de la CTxB au niveau du cône de croissance. Il est donc possible que l'endocytose de L1 soit également affectée par l'absence d'Alix et explique ce retard dans l'apparition de l'axone.

De manière intéressante, des études ont montré l'implication de la CTxB et surtout de son récepteur GM1 dans la pousse neuritique. La « clustering » des intégrines-β1 assurée par GM1 au sein de microdomaines membranaires est indispensable à la pousse neuritique (Ichikawa et al., 2009). De plus, l'ajout de CTxB sur des neuroblastomes est

suffisant pour induire l'apparition de neurites. Ces auteurs ont montré que l'ajout de CTxB favorise la formation de radeaux lipidiques enrichis en intégrine-β1 et qu'elle provoque une entrée de calcium au niveau de ces clusters via des canaux calciques (Wu et al., 2007). Certains canaux ont été décrits comme mécano-senseurs, capables de s'ouvrir en fonction de la tension membranaire (Haswell et al., 2011). Alix est connue pour être recrutée rapidement à la membrane plasmique après une entrée de calcium (Bissig and Gruenberg, 2013). L'arrivée d'Alix au niveau des radeaux lipidiques enrichis en GM1 permettrait donc l'internalisation de ce cluster et au passage des intégrines-β1 résultant en une régulation fine de l'adhésion cellulaire, favorisant ainsi la pousse neuritique.

Le raccourcissement et la réduction du nombre de neurites pourraient également s'expliquer par la capacité d'Alix à réguler les phénomènes de pruning axonal et dendritique. Ces phénomènes de pruning, surtout caractérisés au niveau de la jonction neuromusculaire et dans le système visuel *in vivo*, ont également été décrits *in vitro*. Il a été montré que les ephrines pouvaient augmenter le pruning axonal des neurones d'hippocampes *in vitro*, résultant en une réduction de la taille et du nombre de branchements axonaux (Gao et al., 1999). Une étude récente sur le rôle des ESCRT dans le pruning a démontré que les composants des complexes ESCRT et certaines protéines accessoires étaient nécessaires au pruning des neurites des neurones sensoriels chez la larve de drosophile. L'inhibition de l'expression des différents composants des complexes ESCRT montre que l'absence des homologues de CHMP4, Tsg-101 ou HDPTP provoque une abolition du pruning naturellement observé dans les neurones sensoriels. Leurs observations permettent également d'établir clairement la localisation des homologue de CHMP4 sous forme d'agrégats au niveaux des dendrites proximales subissant le pruning (Loncle et al., 2015). Ils imaginent alors un modèle pertinent dans lequel les CHMP4 et ses protéines associées pourraient former un filament à l'intérieur des neurites permettant le rapprochement des membranes et ainsi une scission membranaire, comme dans la cytocinèse, le bourgeonnement viral et la formation des MVE. Ce modèle, dans la drosophile, exclu Alix du processus de pruning car l'inhibition de son expression ne réduit pas le pruning axonal des neurones sensoriels. Pour autant, on peut imaginer que l'absence d'Alix provoque une perte de contrôle du complexe ESCRT aboutissant à un pruning excessif plutôt qu'une réduction de celui-ci. Cette

hypothèse, que nous avions formulée il y a deux ans nous a poussé à entreprendre une collaboration avec Robert Hindges (KCL, UK) afin d'étudier le pruning associé au développement des axones des neurones ganglionnaires de la rétine sur des souriceaux de 8 jours. Nous n'avons pas pu mettre en évidence un retard dans le pruning des axones Alix ko à ce stade tardif où le pruning a déjà eu lieu. L'utilisation de souriceaux de 5 ou 6 jours pourrait éventuellement nous permettre de comprendre si l'absence d'Alix peut être responsable d'un excès de pruning plutôt qu'un retard.

Une perturbation de l'endocytose clathrine-indépendante en absence d'Alix semble être une hypothèse raisonnable pour expliquer les nombreuses facettes du phénotype de la souris Alix ko. Cependant, nos résultats nous poussent également à entrevoir les autres possibilités notamment sur le contrôle de l'apoptose dont les mécanismes restent encore mystérieux. Une fois de plus, il est important de noter que nous ne pouvons exclure l'implication des complexes ESCRT dans les différents processus pouvant être à l'origine du phénotype. Nous cherchons actuellement à comprendre par quel mécanisme l'absence d'Alix provoque un tel phénotype. En collaboration avec Jeannette Nardelly (Equipe Pierre Gressens, Paris), nous avons commencé des expériences de restauration du phénotype par l'électrolocation d'Alix chez l'embryon ko en amont de l'apparition de l'apoptose. La maitrise de cette technique nous permettrait également d'utiliser différents mutants d'Alix ne pouvant plus interagir avec ses différents partenaires et ainsi comprendre la voie impliquant Alix dans la régulation du développement du système nerveux.

## 3. Alix aux synapses : Endophiline ou ESCRT, pourquoi choisir ?

La souris Alix ko présente, en plus du phénotype développemental, une altération de la plasticité synaptique  caractérisée par un défaut de maintien de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe. La caractérisation fine des synapses nous a permis de voir que l'absence d'Alix perturbait aussi bien la fonctionnalité et la morphologie de la partie pré- que la partie post-synaptique.

### 3.1. En post avec les ESCRT

Les travaux de Agnès Belly et Romain Chassefeyre au laboratoire ont permis d'établir une nouvelle fonction de CHMP2B et du complexe ESCRT-III au sein des épines dendritiques. Ils ont montré que l'inhibition de CHMP2B ou la surexpression de formes mutées de la protéine provoquait une altération du développement des épines dendritiques (Belly et al., 2010) et de la morphologie des épines matures (Article 3). L'hypothèse formulée par ces articles est que le complexe formé de CHMP2B, CHMP4B et Alix serait capable de contraindre la forme de l'épine dendritique en « champignon » par la formation de filaments au niveau du cou de l'épine. Cette hypothèse est appuyée par des travaux chez la drosophile où il a été montré que l'expression d'un mutant de Shrub (homologue de CHMP4) altérait la morphologie neuronale et la survie des larves de drosophile. Ces défaut peuvent être partiellement corrigé par la l'expression ectopique de la protéine CHMP4B murine (Sweeney et al., 2006). De plus les travaux montrant que CHMP2B est capable de former des tubes hélicoïdaux et ainsi de déformer la membrane plasmique par l'intérieur soutiennent également cette hypothèse (Bodon et al., 2011; Lata et al., 2008). De plus, la localisation de CHMP2B à proximité de la membrane post-synaptique aux alentours de la PSD et au niveau du cou de l'épine laisse supposer une fonction de cette protéine dans le remodelage de la membrane des épines dendritiques. Enfin, CHMP2B est la protéine centrale d'un complexe de haut poids moléculaire associé à la PSD contenant CHMP4B et Alix. La présence de ces 3 protéines au sein d'un même complexe n'est pas sans rappeler la cytocinèse, le bourgeonnement viral et la réparation membranaire, 3 processus associés à la déformation de la membrane plasmique (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Jimenez et al., 2014). Pour chacune de ces fonctions, Alix se comporte comme un régulateur du recrutement et de la stabilité des protéines du complexe ESCRT-III. De ce fait, la réduction de la présence de CHMP2B associée à la PSD dans les synapses Alix ko suggère de nouveau une fonction régulatrice/stabilisatrice d'Alix sur le complexe ESCRT. Enfin l'élargissement du cou des épines dendritiques Alix ko supporte fortement l'hypothèse selon laquelle CHMP2B et potentiellement CHMP4 forment un complexe régulant le diamètre du cou de l'épine, sous le contrôle d'Alix. De manière intéressante, la possibilité de réguler le diamètre du cou par des protéines a récemment été mise en évidence par les septines dont la localisation dans l'épine est nécessaire à l'établissement d'une barrière de diffusion (Ewers et al., 2014).

Enfin, la diminution de l'expression de CHMP2B et l'absence d'Alix induisent de manière similaire une altération de la plasticité synaptique.

Tous ces travaux nous prouvent que la présence d'Alix et des ESCRT au niveau des épines dendritiques assure une régulation morphologique et fonctionnelle des ces épines. Les CHMPs pourraient jouer un rôle de nouveau « cytosquelette » cellulaire controlé par Alix. Il est important de souligner la capacité d'Alix à moduler également le cytosquelette d'actine. Cette régulation pourrait également être à l'origine de ces défauts morphologiques.
Des travaux supplémentaires seraient nécessaires à la démonstration d'une telle hypothèse, notamment l'étude de la fonction de CHMP4B qui reste cruciale à la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels Alix et CHMP2B œuvrent ensemble.

## 3.2. L'endophiline, face aux épines

La caractérisation du phénotype synaptique de la souris Alix ko nous a également emmené vers un défaut au niveau du bouton axonal. Contrairement aux épines dendritiques, la morphologie des terminaisons axonales matures ne semble pas affectée par l'absence d'Alix *in vivo*. En revanche, la fonctionnalité présynaptique semble altérée puisque le « paired-pulse ratio », reflétant le pool de vésicules synaptiques prêtes à être relarguées, est diminué chez les Alix ko. De plus, nous avons pu mettre évidence un recrutement transitoire d'Alix, et de l'endophiline A2, au bouton axonal en condition de stimulation (Kwangil Chi). Le recrutement de ces deux protéines, déclenché par une stimulation, pourrait indiquer une fonction spécifique pour Alix et l'endophiline A2 en réponse à l'activité neuronale. La stimulation neuronale, telle que nous l'entendons, déclenche la fusion des vésicules synaptiques permettant la libération du glutamate dans la fente synaptique. L'exocytose des vésicules est immédiatement suivi d'un phénomène d'endocytose compensatoire permettant la reformation du pool de vésicules synaptiques (Haucke et al., 2011). Cette endocytose compensatoire peut se faire via la voie dépendante ou indépendante de la clathrine. Depuis plusieurs années, les endophilines A et la dynamine ont fortement été impliquées dans la voie dépendante de la clathrine (Ferguson et al., 2007; Milosevic et al., 2011). Ces travaux montrent que

l'absence des endophilines A ou de la dynamine provoquent des altérations de la transmission synaptique corrélées avec l'apparition d'invaginations membranaires géantes recouvertes de clathrine au niveau des synapses d'hippocampe. Plus récemment, l'utilisation du même modèle a permis de montrer l'implication de ces deux protéines dans deux voies indépendantes de la clathrine : l'endocytose de masse (Bulk endocytosis) et l'endocytose ultra rapide (UFE pour « ultra-fast endocytosis ») (Kononenko et al., 2014; Watanabe et al., 2014). Concernant les endophilines A, une étude menée chez le *C. elegans* a démontré pour la première fois que l'endophiline est recrutée au bouton axonal où elle induit la déformation de la membrane permettant ainsi de former des vésicules d'endocytose (Bai et al., 2010).

Ainsi le rôle des endophiline A dans l'endocytose clathrine-indépendante est clairement établi au niveau du système nerveux dans les synapses mais également sur des fibroblastes en culture (Boucrot et al., 2014). Cependant, son implication dans la voie clathrine-dépendante complique les interprétations associées à sa perte de fonction, notamment au niveau des synapses. L'utilisation d'une protéine sélectivement impliquée dans la voie clathrine-indépendante, telle que Alix, permettrait enfin de vraiment comprendre la fonction et les mécanismes de cette nouvelle voie d'endocytose.

Nos résultats suggèrent que l'inhibition spécifique de cette endocytose clathrine-indépendante au niveau de la synapse est délétère pour la transmission et la plasticité synaptique, et peut être responsable de la neurodégénérescence observée chez les souris Alix ko.

## Conclusion générale

Cette étude sur le rôle physiologique de la protéine Alix nous a permis de mettre en évidence de nouvelles fonctions de cette protéine qui n'avaient jamais été décrite dans la littérature. Nos travaux démontrent que la protéine Alix contrôle finement le fonctionnement du système nerveux central en gouvernant plusieurs étapes cruciales allant de la neurogenèse à la plasticité synaptique en passant par le développement de l'arborisation dendritique. Autant de nouvelles fonctions qui peuvent s'expliquer de par ses interactions avec ses partenaires décrit dans la littérature. Les résultats sur l'implication d'Alix dans l'endocytose indépendante de la clathrine en étroite

association avec les endophilines nous laisse entrevoir des hypothèses quant aux mécanismes impliquant Alix dans le développement du système nerveux. D'un autre coté, la découverte du complexe synaptique formé par les ESCRT et leur implication dans la plasticité synaptique permet également de mettre en lumière, une nouvelle fois, l'importance du couple Alix-ESCRT dans une fonction impliquant la modulation de la membrane plasmique.

Loin d'avoir mis en lumière un mécanisme unique, la caractérisation de la souris Alix ko offre de nouvelles perspectives pour expliquer les multiples fonctions de cette protéine. Cette souris représente également un outil capital pour la compréhension des mécanismes moléculaires responsables du développement et du fonctionnement du système nerveux central.

# REFERENCES

# A


Abrami, L., L. Brandi, M. Moayeri, M.J. Brown, B.A. Krantz, S.H. Leppla, and F.G. van der Goot. 2013. Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell reports*. 5:986-996.

Aiga, M., J.N. Levinson, and S.X. Bamji. 2011. N-cadherin and neuroligins cooperate to regulate synapse formation in hippocampal cultures. *J Biol Chem*. 286:851-858.

Andrews, N.W., P.E. Almeida, and M. Corrotte. 2014. Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends Cell Biol*.

Arstikaitis, P., C. Gauthier-Campbell, K. Huang, A. El-Husseini, and T.H. Murphy. 2011. Proteins that promote filopodia stability, but not number, lead to more axonal-dendritic contacts. *PLoS ONE*. 6:e16998.


# B


Bai, J., Z. Hu, J.S. Dittman, E.C. Pym, and J.M. Kaplan. 2010. Endophilin functions as a membrane-bending molecule and is delivered to endocytic zones by exocytosis. *Cell*. 143:430-441.

Baietti, M.F., Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, Y. Ivarsson, F. Depoortere, C. Coomans, E. Vermeiren, P. Zimmermann, and G. David. 2012. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*. 14:677-685.

Baldys, A., and J.R. Raymond. 2009. Critical role of ESCRT machinery in EGFR recycling. *Biochemistry*. 48:9321-9323.

Barelli, H., and B. Antonny. 2009. Cell biology: Detached membrane bending. *Nature*. 458:159-160.

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

Bayer, K.U., P. De Koninck, A.S. Leonard, J.W. Hell, and H. Schulman. 2001. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature*. 411:801-805.

Bechara, A., H. Nawabi, F. Moret, A. Yaron, E. Weaver, M. Bozon, K. Abouzid, J.L. Guan, M. Tessier-Lavigne, V. Lemmon, and V. Castellani. 2008. FAK-MAPK-dependent adhesion disassembly downstream of L1 contributes to semaphorin3A-induced collapse. *Embo J*. 27:1549-1562.

Belly, A., G. Bodon, B. Blot, A. Bouron, R. Sadoul, and Y. Goldberg. 2010. CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J Cell Sci*. 123:2943-2954.

Ben-Zvi, A., O. Manor, M. Schachner, A. Yaron, M. Tessier-Lavigne, and O. Behar. 2008. The Semaphorin receptor PlexinA3 mediates neuronal apoptosis during dorsal root ganglia development. *J Neurosci*. 28:12427-12432.

Benmerah, A., C. Lamaze, B. Begue, S.L. Schmid, A. Dautry-Varsat, and N. Cerf-Bensussan. 1998. AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol*. 140:1055-1062.

Benn, S.C., and C.J. Woolf. 2004. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci*. 5:686-700.

Betizeau, M., V. Cortay, D. Patti, S. Pfister, E. Gautier, A. Bellemin-Menard, M. Afanassieff, C. Huissoud, R.J. Douglas, H. Kennedy, and C. Dehay. 2013. Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. *Neuron*. 80:442-457.

Bissig, C., and J. Gruenberg. 2013. Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5:a016816.

Bissig, C., M. Lenoir, M.C. Velluz, I. Kufareva, R. Abagyan, M. Overduin, and J. Gruenberg. 2013. Viral infection controlled by a calcium-dependent lipid-binding module in ALIX. *Dev Cell*. 25:364-373.
Bliss, T.V., and T. Lomo. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 232:331-356.
Blom, H.J., G.M. Shaw, M. den Heijer, and R.H. Finnell. 2006. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*. 7:724-731.
Bloodgood, B.L., and B.L. Sabatini. 2005. Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines. *Science*. 310:866-869.
Blum, D., F.J. Hemming, M.C. Galas, S. Torch, L. Cuvelier, S.N. Schiffmann, and R. Sadoul. 2004. Increased Alix (apoptosis-linked gene-2 interacting protein X) immunoreactivity in the degenerating striatum of rats chronically treated by 3-nitropropionic acid. *Neurosci Lett*. 368:309-313.
Bodon, G., R. Chassefeyre, K. Pernet-Gallay, N. Martinelli, G. Effantin, D.L. Hulsik, A. Belly, Y. Goldberg, C. Chatellard-Causse, B. Blot, G. Schoehn, W. Weissenhorn, and R. Sadoul. 2011. Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. *J Biol Chem*. 286:40276-40286.
Bolte, S., and F.P. Cordelieres. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 224:213-232.
Bonanomi, D., E.F. Fornasiero, G. Valdez, S. Halegoua, F. Benfenati, A. Menegon, and F. Valtorta. 2008. Identification of a developmentally regulated pathway of membrane retrieval in neuronal growth cones. *J Cell Sci*. 121:3757-3769.
Bosch, M., J. Castro, T. Saneyoshi, H. Matsuno, M. Sur, and Y. Hayashi. 2014. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*. 82:444-459.
Boucrot, E., A.P. Ferreira, L. Almeida-Souza, S. Debard, Y. Vallis, G. Howard, L. Bertot, N. Sauvonnet, and H.T. McMahon. 2014. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*.
Bourne, J.N., and K.M. Harris. 2008. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*. 31:47-67.
Burden-Gulley, S.M., M. Pendergast, and V. Lemmon. 1997. The role of cell adhesion molecule L1 in axonal extension, growth cone motility, and signal transduction. *Cell Tissue Res*. 290:415-422.

# C

Cabezas, A., K.G. Bache, A. Brech, and H. Stenmark. 2005. Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J Cell Sci*. 118:2625-2635.
Campos, L.S., A.J. Duarte, T. Branco, and D. Henrique. 2001. mDll1 and mDll3 expression in the developing mouse brain: role in the establishment of the early cortex. *J Neurosci Res*. 64:590-598.
Carlton, J.G., M. Agromayor, and J. Martin-Serrano. 2008. Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:10541-10546.
Carlton, J.G., and J. Martin-Serrano. 2007. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*. 316:1908-1912.
Castellani, V., J. Falk, and G. Rougon. 2004. Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol Cell Neurosci*. 26:89-100.
Caviness, V.S., Jr., T. Takahashi, and R.S. Nowakowski. 1995. Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci*. 18:379-383.

Chatellard-Causse, C., B. Blot, N. Cristina, S. Torch, M. Missotten, and R. Sadoul. 2002. Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem*. 277:29108-29115.

Chazeau, A., M. Garcia, K. Czondor, D. Perrais, B. Tessier, G. Giannone, and O. Thoumine. 2015. Mechanical coupling between transsynaptic N-cadherin adhesions and actin flow stabilizes dendritic spines. *Mol Biol Cell*. 26:859-873.

Che, S., H.M. El-Hodiri, C.F. Wu, M. Nelman-Gonzalez, M.M. Weil, L.D. Etkin, R.B. Clark, and J. Kuang. 1999. Identification and cloning of xp95, a putative signal transduction protein in Xenopus oocytes. *J Biol Chem*. 274:5522-5531.

Chen, B., S.C. Borinstein, J. Gillis, V.W. Sykes, and O. Bogler. 2000. The glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in astrocytes. *J Biol Chem*. 275:19275-19281.

Chen, L.Y., C.S. Rex, M.S. Casale, C.M. Gall, and G. Lynch. 2007. Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. *J Neurosci*. 27:5363-5372.

Chen, N., S. Furuya, H. Doi, Y. Hashimoto, Y. Kudo, and H. Higashi. 2003. Ganglioside/calmodulin kinase II signal inducing cdc42-mediated neuronal actin reorganization. *Neuroscience*. 120:163-176.

Chenn, A., and C.A. Walsh. 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*. 297:365-369.

Cheung, G., and M.A. Cousin. 2012. Adaptor protein complexes 1 and 3 are essential for generation of synaptic vesicles from activity-dependent bulk endosomes. *J Neurosci*. 32:6014-6023.

Cheung, G., O.J. Jupp, and M.A. Cousin. 2010. Activity-dependent bulk endocytosis and clathrin-dependent endocytosis replenish specific synaptic vesicle pools in central nerve terminals. *J Neurosci*. 30:8151-8161.

Chevallier, J., Z. Chamoun, G. Jiang, G. Prestwich, N. Sakai, S. Matile, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2008. Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J Biol Chem*. 283:27871-27880.

Choi, J., J. Ko, B. Racz, A. Burette, J.R. Lee, S. Kim, M. Na, H.W. Lee, K. Kim, R.J. Weinberg, and E. Kim. 2005. Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J Neurosci*. 25:869-879.

Chua, J.J., S. Kindler, J. Boyken, and R. Jahn. 2010. The architecture of an excitatory synapse. *J Cell Sci*. 123:819-823.

Clayton, E.L., V. Anggono, K.J. Smillie, N. Chau, P.J. Robinson, and M.A. Cousin. 2009. The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurosci*. 29:7706-7717.

Clayton, E.L., G.J. Evans, and M.A. Cousin. 2008. Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation. *J Neurosci*. 28:6627-6632.

Collingridge, G.L., S.J. Kehl, and H. McLennan. 1983. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*. 334:33-46.

Colombo, M., C. Moita, G. van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L.F. Moita, C. Thery, and G. Raposo. 2013. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*. 126:5553-5565.

Conde, C., and A. Caceres. 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*. 10:319-332.

Craig, A.M., and Y. Kang. 2007. Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol*. 17:43-52.

De Roo, M., P. Klauser, P. Mendez, L. Poglia, and D. Muller. 2008. Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cereb Cortex*. 18:151-161.

# D


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

Dehmelt, L., F.M. Smart, R.S. Ozer, and S. Halpain. 2003. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J Neurosci*. 23:9479-9490.

Dejournett, R.E., R. Kobayashi, S. Pan, C. Wu, L.D. Etkin, R.B. Clark, O. Bogler, and J. Kuang. 2007. Phosphorylation of the proline-rich domain of Xp95 modulates Xp95 interaction with partner proteins. *Biochem J*. 401:521-531.

Dent, E.W., S.L. Gupton, and F.B. Gertler. 2011. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3.

Depaepe, V., N. Suarez-Gonzalez, A. Dufour, L. Passante, J.A. Gorski, K.R. Jones, C. Ledent, and P. Vanderhaeghen. 2005. Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature*. 435:1244-1250.

Derkach, V., A. Barria, and T.R. Soderling. 1999. Ca2+/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:3269-3274.

Di Paolo, G., S. Sankaranarayanan, M.R. Wenk, L. Daniell, E. Perucco, B.J. Caldarone, R. Flavell, M.R. Picciotto, T.A. Ryan, O. Cremona, and P. De Camilli. 2002. Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron*. 33:789-804.

Diril, M.K., M. Wienisch, N. Jung, J. Klingauf, and V. Haucke. 2006. Stonin 2 is an AP-2-dependent endocytic sorting adaptor for synaptotagmin internalization and recycling. *Dev Cell*. 10:233-244.

Doherty, G.J., and H.T. McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 78:857-902.

Doyotte, A., A. Mironov, E. McKenzie, and P. Woodman. 2008. The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:6308-6313.

Dudek, S.M., and M.F. Bear. 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:4363-4367.


# E


Eikenes, A.H., L. Malerod, A.L. Christensen, C.B. Steen, J. Mathieu, I.P. Nezis, K. Liestol, J.R. Huynh, H. Stenmark, and K. Haglund. 2015. ALIX and ESCRT-III coordinately control cytokinetic abscission during germline stem cell division in vivo. *PLoS genetics*. 11:e1004904.

Elia, N., R. Sougrat, T.A. Spurlin, J.H. Hurley, and J. Lippincott-Schwartz. 2011. Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:4846-4851.

Ewers, H., and A. Helenius. 2011. Lipid-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3:a004721.

Ewers, H., T. Tada, J.D. Petersen, B. Racz, M. Sheng, and D. Choquet. 2014. A Septin-Dependent Diffusion Barrier at Dendritic Spine Necks. *PLoS ONE*. 9:e113916.

# F


Ferguson, S.M., G. Brasnjo, M. Hayashi, M. Wolfel, C. Collesi, S. Giovedi, A. Raimondi, L.W. Gong, P. Ariel, S. Paradise, E. O'Toole, R. Flavell, O. Cremona, G. Miesenbock, T.A. Ryan, and P. De Camilli. 2007. A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science*. 316:570-574.

Fisher, R.D., H.Y. Chung, Q. Zhai, H. Robinson, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2007. Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell*. 128:841-852.

Frey, U., M. Krug, K.G. Reymann, and H. Matthies. 1988. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res*. 452:57-65.

Frotscher, M. 1998. Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol*. 8:570-575.

Fujii, K., U.M. Munshi, S.D. Ablan, D.G. Demirov, F. Soheilian, K. Nagashima, A.G. Stephen, R.J. Fisher, and E.O. Freed. 2009. Functional role of Alix in HIV-1 replication. *Virology*. 391:284-292.

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

Futter, C.E., A. Pearse, L.J. Hewlett, and C.R. Hopkins. 1996. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*. 132:1011-1023.


# G


Gad, H., N. Ringstad, P. Low, O. Kjaerulff, J. Gustafsson, M. Wenk, G. Di Paolo, Y. Nemoto, J. Crun, M.H. Ellisman, P. De Camilli, O. Shupliakov, and L. Brodin. 2000. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron*. 27:301-312.

Gaiano, N., J.S. Nye, and G. Fishell. 2000. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*. 26:395-404.

Gallo, G., and P.C. Letourneau. 1998. Localized sources of neurotrophins initiate axon collateral sprouting. *J Neurosci*. 18:5403-5414.

Gandhi, H., R. Worch, K. Kurgonaite, M. Hintersteiner, P. Schwille, C. Bokel, and T. Weidemann. 2014. Dynamics and interaction of interleukin-4 receptor subunits in living cells. *Biophys J*. 107:2515-2527.

Gao, P.P., Y. Yue, D.P. Cerretti, C. Dreyfus, and R. Zhou. 1999. Ephrin-dependent growth and pruning of hippocampal axons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:4073-4077.

Garcia-Moreno, F., L. Lopez-Mascaraque, and J.A. De Carlos. 2007. Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J Comp Neurol*. 500:419-432.

Garrus, J.E., U.K. von Schwedler, O.W. Pornillos, S.G. Morham, K.H. Zavitz, H.E. Wang, D.A. Wettstein, K.M. Stray, M. Cote, R.L. Rich, D.G. Myszka, and W.I. Sundquist. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*. 107:55-65.

Garvalov, B.K., K.C. Flynn, D. Neukirchen, L. Meyn, N. Teusch, X. Wu, C. Brakebusch, J.R. Bamburg, and F. Bradke. 2007. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci*. 27:13117-13129.

Giachino, C., E. Lantelme, L. Lanzetti, S. Saccone, G. Bella Valle, and N. Migone. 1997. A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics*. 41:427-434.

Gomez, T.M., and P.C. Letourneau. 2014. Actin dynamics in growth cone motility and navigation. *J Neurochem*. 129:221-234.

Granseth, B., B. Odermatt, S.J. Royle, and L. Lagnado. 2006. Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron*. 51:773-786.
Greig, L.C., M.B. Woodworth, M.J. Galazo, H. Padmanabhan, and J.D. Macklis. 2013. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*. 14:755-769.
Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:721-730.
Gruenberg, J., and H. Stenmark. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:317-323.
Guichet, A., T. Wucherpfennig, V. Dudu, S. Etter, M. Wilsch-Brauniger, A. Hellwig, M. Gonzalez-Gaitan, W.B. Huttner, and A.A. Schmidt. 2002. Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the Drosophila neuromuscular junction. *Embo J*. 21:1661-1672.
Guizetti, J., L. Schermelleh, J. Mantler, S. Maar, I. Poser, H. Leonhardt, T. Muller-Reichert, and D.W. Gerlich. 2011. Cortical Constriction During Abscission Involves Helices of ESCRT-III-Dependent Filaments. *Science*.
Guo, J., and E.S. Anton. 2014. Decision making during interneuron migration in the developing cerebral cortex. *Trends Cell Biol*. 24:342-351.
Gupton, S.L., and F.B. Gertler. 2010. Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuritogenesis. *Dev Cell*. 18:725-736.

# H

Halt, A.R., R.F. Dallapiazza, Y. Zhou, I.S. Stein, H. Qian, S. Juntti, S. Wojcik, N. Brose, A.J. Silva, and J.W. Hell. 2012. CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. *Embo J*. 31:1203-1216.
Hanson, P.I., R. Roth, Y. Lin, and J.E. Heuser. 2008. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol*. 180:389-402.
Harris, K.M., F.E. Jensen, and B. Tsao. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*. 12:2685-2705.
Haswell, E.S., R. Phillips, and D.C. Rees. 2011. Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it? *Structure*. 19:1356-1369.
Haucke, V., E. Neher, and S.J. Sigrist. 2011. Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci*. 12:127-138.
Hayashi, M.K., C. Tang, C. Verpelli, R. Narayanan, M.H. Stearns, R.M. Xu, H. Li, C. Sala, and Y. Hayashi. 2009. The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. *Cell*. 137:159-171.
Hayashi, Y., S.H. Shi, J.A. Esteban, A. Piccini, J.C. Poncer, and R. Malinow. 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science*. 287:2262-2267.
Hemming, F.J., S. Fraboulet, B. Blot, and R. Sadoul. 2004. Early increase of apoptosis-linked gene-2 interacting protein X in areas of kainate-induced neurodegeneration. *Neuroscience*. 123:887-895.
Hengst, U., A. Deglincerti, H.J. Kim, N.L. Jeon, and S.R. Jaffrey. 2009. Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein. *Nat Cell Biol*. 11:1024-1030.
Henne, W.M., H. Stenmark, and S.D. Emr. 2013. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5.
Hindges, R., T. McLaughlin, N. Genoud, M. Henkemeyer, and D. O'Leary. 2002. EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron*. 35:475-487.

Hori, K., A. Sen, T. Kirchhausen, and S. Artavanis-Tsakonas. 2011. Synergy between the ESCRT-III complex and Deltex defines a ligand-independent Notch signal. *J Cell Biol*. 195:1005-1015.
Howes, M.T., M. Kirkham, J. Riches, K. Cortese, P.J. Walser, F. Simpson, M.M. Hill, A. Jones, R. Lundmark, M.R. Lindsay, D.J. Hernandez-Deviez, G. Hadzic, A. McCluskey, R. Bashir, L. Liu, P. Pilch, H. McMahon, P.J. Robinson, J.F. Hancock, S. Mayor, and R.G. Parton. 2010. Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol*. 190:675-691.
Hyman, B.T., and J. Yuan. 2012. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nat Rev Neurosci*. 13:395-406.

# I

Ichikawa, N., K. Iwabuchi, H. Kurihara, K. Ishii, T. Kobayashi, T. Sasaki, N. Hattori, Y. Mizuno, K. Hozumi, Y. Yamada, and E. Arikawa-Hirasawa. 2009. Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *J Cell Sci*. 122:289-299.
Impey, S., S.R. McCorkle, H. Cha-Molstad, J.M. Dwyer, G.S. Yochum, J.M. Boss, S. McWeeney, J.J. Dunn, G. Mandel, and R.H. Goodman. 2004. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*. 119:1041-1054.
Ivins, J.K., P.D. Yurchenco, and A.D. Lander. 2000. Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. *J Neurosci*. 20:6551-6560.

# J

Jahn, R., and D. Fasshauer. 2012. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*. 490:201-207.
Jimenez, A.J., P. Maiuri, J. Lafaurie-Janvore, S. Divoux, M. Piel, and F. Perez. 2014. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*. 343:1247136.
Jouvenet, N., M. Zhadina, P.D. Bieniasz, and S.M. Simon. 2011. Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat Cell Biol*. 13:394-401.
Juan, T., and M. Furthauer. 2015. [The ESCRT complex: from endosomal transport to the development of multicellular organisms]. *Biologie aujourd'hui*. 209:111-124.

# K

Kabayama, H., T. Nakamura, M. Takeuchi, H. Iwasaki, M. Taniguchi, N. Tokushige, and K. Mikoshiba. 2009. Ca2+ induces macropinocytosis via F-actin depolymerization during growth cone collapse. *Mol Cell Neurosci*. 40:27-38.
Kadowaki, M., S. Nakamura, O. Machon, S. Krauss, G.L. Radice, and M. Takeichi. 2007. N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Dev Biol*. 304:22-33.
Kamiguchi, H., and V. Lemmon. 2000. Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *J Neurosci*. 20:3676-3686.
Kasai, H., M. Matsuzaki, J. Noguchi, N. Yasumatsu, and H. Nakahara. 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*. 26:360-368.
Katoh, K., H. Shibata, H. Suzuki, A. Nara, K. Ishidoh, E. Kominami, T. Yoshimori, and M. Maki. 2003. The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *J Biol Chem*. 278:39104-39113.

Kawauchi, T., K. Sekine, M. Shikanai, K. Chihama, K. Tomita, K. Kubo, K. Nakajima, Y. Nabeshima, and M. Hoshino. 2010. Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron*. 67:588-602.
Kessaris, N., M. Fogarty, P. Iannarelli, M. Grist, M. Wegner, and W.D. Richardson. 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci*. 9:173-179.
Kim, J., S. Sitaraman, A. Hierro, B.M. Beach, G. Odorizzi, and J.H. Hurley. 2005. Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Dev Cell*. 8:937-947.
Kim, M.H., J. Choi, J. Yang, W. Chung, J.H. Kim, S.K. Paik, K. Kim, S. Han, H. Won, Y.S. Bae, S.H. Cho, J. Seo, Y.C. Bae, S.Y. Choi, and E. Kim. 2009. Enhanced NMDA receptor-mediated synaptic transmission, enhanced long-term potentiation, and impaired learning and memory in mice lacking IRSp53. *J Neurosci*. 29:1586-1595.
Kim, Y.T., and C.F. Wu. 1987. Reversible blockage of neurite development and growth cone formation in neuronal cultures of a temperature-sensitive mutant of Drosophila. *J Neurosci*. 7:3245-3255.
Kirkham, M., and R.G. Parton. 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta*. 1746:349-363.
Kleijmeer, M.J., S. Morkowski, J.M. Griffith, A.Y. Rudensky, and H.J. Geuze. 1997. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol*. 139:639-649.
Kolodkin, A.L., and M. Tessier-Lavigne. 2011. Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3.
Kononenko, N.L., M.K. Diril, D. Puchkov, M. Kintscher, S.J. Koo, G. Pfuhl, Y. Winter, M. Wienisch, J. Klingauf, J. Breustedt, D. Schmitz, T. Maritzen, and V. Haucke. 2013. Compromised fidelity of endocytic synaptic vesicle protein sorting in the absence of stonin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:E526-535.
Kononenko, N.L., and V. Haucke. 2015. Molecular mechanisms of presynaptic membrane retrieval and synaptic vesicle reformation. *Neuron*. 85:484-496.
Kononenko, N.L., D. Puchkov, G.A. Classen, A.M. Walter, A. Pechstein, L. Sawade, N. Kaempf, T. Trimbuch, D. Lorenz, C. Rosenmund, T. Maritzen, and V. Haucke. 2014. Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron*. 82:981-988.
Koo, S.J., S. Markovic, D. Puchkov, C.C. Mahrenholz, F. Beceren-Braun, T. Maritzen, J. Dernedde, R. Volkmer, H. Oschkinat, and V. Haucke. 2011. SNARE motif-mediated sorting of synaptobrevin by the endocytic adaptors clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) and AP180 at synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:13540-13545.
Kopec, C.D., B. Li, W. Wei, J. Boehm, and R. Malinow. 2006. Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci*. 26:2000-2009.
Kowanetz, K., I. Szymkiewicz, K. Haglund, M. Kowanetz, K. Husnjak, J.D. Taylor, P. Soubeyran, U. Engstrom, J.E. Ladbury, and I. Dikic. 2003. Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem*. 278:39735-39746.
Kreiner, M., Z. Li, J. Beattie, S.M. Kelly, H.J. Mardon, and C.F. van der Walle. 2008. Self-assembling multimeric integrin alpha5beta1 ligands for cell attachment and spreading. *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 21:553-560.
Kressmann, S., C. Campos, I. Castanon, M. Furthauer, and M. Gonzalez-Gaitan. 2015. Directional Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division in the spinal cord. *Nat Cell Biol*. 17:333-339.
Kuida, K., T.F. Haydar, C.Y. Kuan, Y. Gu, C. Taya, H. Karasuyama, M.S. Su, P. Rakic, and R.A. Flavell. 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*. 94:325-337.
Kwiatkowski, A.V., D.A. Rubinson, E.W. Dent, J. Edward van Veen, J.D. Leslie, J. Zhang, L.M. Mebane, U. Philippar, E.M. Pinheiro, A.A. Burds, R.T. Bronson, S. Mori, R. Fassler, and F.B.

Gertler. 2007. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex. *Neuron*. 56:441-455.

# L

Lakshminarayan, R., C. Wunder, U. Becken, M.T. Howes, C. Benzing, S. Arumugam, S. Sales, N. Ariotti, V. Chambon, C. Lamaze, D. Loew, A. Shevchenko, K. Gaus, R.G. Parton, and L. Johannes. 2014. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol*. 16:595-606.

Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah, and A. Dautry-Varsat. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell*. 7:661-671.

Lasiecka, Z.M., C.C. Yap, S. Caplan, and B. Winckler. 2010. Neuronal early endosomes require EHD1 for L1/NgCAM trafficking. *J Neurosci*. 30:16485-16497.

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

Lavdas, A.A., M. Grigoriou, V. Pachnis, and J.G. Parnavelas. 1999. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 19:7881-7888.

Le Blanc, I., P.P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petiot, N. Mayran, N. Demaurex, J. Faure, R. Sadoul, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol*. 7:653-664.

Leal, G., D. Comprido, and C.B. Duarte. 2014. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. 76 Pt C:639-656.

Letourneau, P.C., T.A. Shattuck, and A.H. Ressler. 1986. Branching of sensory and sympathetic neurites in vitro is inhibited by treatment with taxol. *J Neurosci*. 6:1912-1917.

Leveille, F., F. El Gaamouch, E. Gouix, M. Lecocq, D. Lobner, O. Nicole, and A. Buisson. 2008. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *Faseb J*. 22:4258-4271.

Li, W., J. Lee, H.G. Vikis, S.H. Lee, G. Liu, J. Aurandt, T.L. Shen, E.R. Fearon, J.L. Guan, M. Han, Y. Rao, K. Hong, and K.L. Guan. 2004. Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nat Neurosci*. 7:1213-1221.

Liou, W., H.J. Geuze, and J.W. Slot. 1996. Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol*. 106:41-58.

Llobet, A., J.L. Gallop, J.J. Burden, G. Camdere, P. Chandra, Y. Vallis, C.R. Hopkins, L. Lagnado, and H.T. McMahon. 2011. Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse. *J Neurosci*. 31:8512-8519.

Lobert, V.H., and H. Stenmark. 2012. The ESCRT machinery mediates polarization of fibroblasts through regulation of myosin light chain. *J Cell Sci*. 125:29-36.

Loncle, N., M. Agromayor, J. Martin-Serrano, and D.W. Williams. 2015. An ESCRT module is required for neuron pruning. *Scientific reports*. 5:8461.

Lucas, F.R., R.G. Goold, P.R. Gordon-Weeks, and P.C. Salinas. 1998. Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J Cell Sci*. 111 ( Pt 10):1351-1361.

Luhtala, N., and G. Odorizzi. 2004. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol*. 166:717-729.

Luyet, P.P., T. Falguieres, V. Pons, A.K. Pattnaik, and J. Gruenberg. 2008. The ESCRT-I subunit TSG101 controls endosome-to-cytosol release of viral RNA. *Traffic*. 9:2279-2290.

Lynch, D.K., S.C. Winata, R.J. Lyons, W.E. Hughes, G.M. Lehrbach, V. Wasinger, G. Corthals, S. Cordwell, and R.J. Daly. 2003. A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 278:21805-21813.

Lynch, G., J. Larson, S. Kelso, G. Barrionuevo, and F. Schottler. 1983. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*. 305:719-721.

# M

Mahul-Mellier, A.L., F.J. Hemming, B. Blot, S. Fraboulet, and R. Sadoul. 2006. Alix, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death in vivo. *J Neurosci*. 26:542-549.

Mahul-Mellier, A.L., F. Strappazzon, A. Petiot, C. Chatellard-Causse, S. Torch, B. Blot, K. Freeman, L. Kuhn, J. Garin, J.M. Verna, S. Fraboulet, R. Sadoul, and F.J. Hemming. 2008. Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death. *J Biol Chem*. 283:34954-34965.

Margadant, C., H.N. Monsuur, J.C. Norman, and A. Sonnenberg. 2011. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol*. 23:607-614.

Marin, O., A. Yaron, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, and J.L. Rubenstein. 2001. Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science*. 293:872-875.

Martinez-Arca, S., P. Alberts, A. Zahraoui, D. Louvard, and T. Galli. 2000. Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J Cell Biol*. 149:889-900.

Mason, H.A., S.M. Rakowiecki, T. Gridley, and G. Fishell. 2006. Loss of notch activity in the developing central nervous system leads to increased cell death. *Dev Neurosci*. 28:49-57.

Matsuo, H., J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Faure, N.S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R.G. Parton, F. Vilbois, and J. Gruenberg. 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science*. 303:531-534.

Mayor, S., R.G. Parton, and J.G. Donaldson. 2014. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 6.

McCullough, J., R.D. Fisher, F.G. Whitby, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2008. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:7687-7691.

Milosevic, I., S. Giovedi, X. Lou, A. Raimondi, C. Collesi, H. Shen, S. Paradise, E. O'Toole, S. Ferguson, O. Cremona, and P. De Camilli. 2011. Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron*. 72:587-601.

Missotten, M., A. Nichols, K. Rieger, and R. Sadoul. 1999. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ*. 6:124-129.

Miyoshi, G., and G. Fishell. 2011. GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb Cortex*. 21:845-852.

Miyoshi, G., J. Hjerling-Leffler, T. Karayannis, V.H. Sousa, S.J. Butt, J. Battiste, J.E. Johnson, R.P. Machold, and G. Fishell. 2010. Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci*. 30:1582-1594.

Mobius, W., E. van Donselaar, Y. Ohno-Iwashita, Y. Shimada, H.F. Heijnen, J.W. Slot, and H.J. Geuze. 2003. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic*. 4:222-231.

Morita, E., V. Sandrin, H.Y. Chung, S.G. Morham, S.P. Gygi, C.K. Rodesch, and W.I. Sundquist. 2007. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *Embo J*. 26:4215-4227.

Morris, R.G., E. Anderson, G.S. Lynch, and M. Baudry. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 319:774-776.

Mundigl, O., G.C. Ochoa, C. David, V.I. Slepnev, A. Kabanov, and P. De Camilli. 1998. Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*. 18:93-103.
Munji, R.N., Y. Choe, G. Li, J.A. Siegenthaler, and S.J. Pleasure. 2011. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J Neurosci*. 31:1676-1687.
Murakoshi, H., H. Wang, and R. Yasuda. 2011. Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*. 472:100-104.

# N

Nadarajah, B., J.E. Brunstrom, J. Grutzendler, R.O. Wong, and A.L. Pearlman. 2001. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci*. 4:143-150.
Nelson, B.R., R.D. Hodge, F. Bedogni, and R.F. Hevner. 2013a. Dynamic interactions between intermediate neurogenic progenitors and radial glia in embryonic mouse neocortex: potential role in Dll1-Notch signaling. *J Neurosci*. 33:9122-9139.
Nelson, J.C., A.K. Stavoe, and D.A. Colon-Ramos. 2013b. The actin cytoskeleton in presynaptic assembly. *Cell Adh Migr*. 7:379-387.
Nishio, M., S. Fukumoto, K. Furukawa, A. Ichimura, H. Miyazaki, S. Kusunoki, T. Urano, and K. Furukawa. 2004. Overexpressed GM1 suppresses nerve growth factor (NGF) signals by modulating the intracellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells. *J Biol Chem*. 279:33368-33378.
Noctor, S.C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic, and A.R. Kriegstein. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*. 7:136-144.

# O

Oakley, R.A., and K.W. Tosney. 1993. Contact-mediated mechanisms of motor axon segmentation. *J Neurosci*. 13:3773-3792.
Odorizzi, G. 2006. The multiple personalities of Alix. *J Cell Sci*. 119:3025-3032.

# P

Pan, S., R. Wang, X. Zhou, J. Corvera, M. Kloc, R. Sifers, G.E. Gallick, S.H. Lin, and J. Kuang. 2008. Extracellular Alix regulates integrin-mediated cell adhesions and extracellular matrix assembly. *Embo J*. 27:2077-2090.
Pan, S., R. Wang, X. Zhou, G. He, J. Koomen, R. Kobayashi, L. Sun, J. Corvera, G.E. Gallick, and J. Kuang. 2006. Involvement of the conserved adaptor protein Alix in actin cytoskeleton assembly. *J Biol Chem*. 281:34640-34650.
Paridaen, J.T., and W.B. Huttner. 2014. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep*. 15:351-364.
Park, M., E.C. Penick, J.G. Edwards, J.A. Kauer, and M.D. Ehlers. 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science*. 305:1972-1975.
Patten, B.A., J.M. Peyrin, G. Weinmaster, and G. Corfas. 2003. Sequential signaling through Notch1 and erbB receptors mediates radial glia differentiation. *J Neurosci*. 23:6132-6140.
Pawlisz, A.S., C. Mutch, A. Wynshaw-Boris, A. Chenn, C.A. Walsh, and Y. Feng. 2008. Lis1-Nde1-dependent neuronal fate control determines cerebral cortical size and lamination. *Hum Mol Genet*. 17:2441-2455.

Peter, B.J., H.M. Kent, I.G. Mills, Y. Vallis, P.J. Butler, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*. 303:495-499.
Petrelli, A., G.F. Gilestro, S. Lanzardo, P.M. Comoglio, N. Migone, and S. Giordano. 2002. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature*. 416:187-190.
Piper, M., S. Salih, C. Weinl, C.E. Holt, and W.A. Harris. 2005. Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. *Nat Neurosci*. 8:179-186.
Pires, R., B. Hartlieb, L. Signor, G. Schoehn, S. Lata, M. Roessle, C. Moriscot, S. Popov, A. Hinz, M. Jamin, V. Boyer, R. Sadoul, E. Forest, D.I. Svergun, H.G. Gottlinger, and W. Weissenhorn. 2009. A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure*. 17:843-856.
Polleux, F., and W. Snider. 2010. Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a001925.
Portera-Cailliau, C., D.T. Pan, and R. Yuste. 2003. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci*. 23:7129-7142.

# R

Raiborg, C., and H. Stenmark. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. 458:445-452.
Rakic, P. 1995. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci*. 18:383-388.
Raymond, C.K., I. Howald-Stevenson, C.A. Vater, and T.H. Stevens. 1992. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell*. 3:1389-1402.
Reed, N.A., D. Cai, T.L. Blasius, G.T. Jih, E. Meyhofer, J. Gaertig, and K.J. Verhey. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol*. 16:2166-2172.
Rehberg, K., S. Kliche, D.A. Madencioglu, M. Thiere, B. Muller, B.M. Meineke, C. Freund, E. Budinger, and O. Stork. 2014. The serine/threonine kinase Ndr2 controls integrin trafficking and integrin-dependent neurite growth. *J Neurosci*. 34:5342-5354.
Ren, X., and J.H. Hurley. 2011. Proline-rich regions and motifs in trafficking: from ESCRT interaction to viral exploitation. *Traffic*. 12:1282-1290.
Renard, H., M. Simunovic, J. Lemiere, E. Boucrot, M.D. Garcia-Castillo, S. Arumugam, V. Chambon, C. Lamaze, C. Wunder, A.K. Kenworthy, A.A. Schmidt, H.T. McMahon, C. Sykes, P. Bassereau, and L. Johannes. 2014. Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature*.
Repetto, D., P. Camera, R. Melani, N. Morello, I. Russo, E. Calcagno, R. Tomasoni, F. Bianchi, G. Berto, M. Giustetto, N. Berardi, T. Pizzorusso, M. Matteoli, P. Di Stefano, M. Missler, E. Turco, F. Di Cunto, and P. Defilippi. 2014. p140Cap regulates memory and synaptic plasticity through Src-mediated and citron-N-mediated actin reorganization. *J Neurosci*. 34:1542-1553.
Ringstad, N., Y. Nemoto, and P. De Camilli. 1997. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:8569-8574.
Rodighiero, C., Y. Fujinaga, T.R. Hirst, and W.I. Lencer. 2001. A cholera toxin B-subunit variant that binds ganglioside G(M1) but fails to induce toxicity. *J Biol Chem*. 276:36939-36945.
Rowitch, D.H., and A.R. Kriegstein. 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*. 468:214-222.
Rusten, T.E., T. Vaccari, and H. Stenmark. 2012. Shaping development with ESCRTs. *Nat Cell Biol*. 14:38-45.

# S


Sadoul, R. 2006. Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse. *Bio. Cell*. 98:69-77.

Sahara, S., and D.D. O'Leary. 2009. Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron*. 63:48-62.

Sakakibara, A., and Y. Hatanaka. 2015. Neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Frontiers in neuroscience*. 9:116.

Sardi, S.P., J. Murtie, S. Koirala, B.A. Patten, and G. Corfas. 2006. Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell*. 127:185-197.

Scheffer, L.L., S.C. Sreetama, N. Sharma, S. Medikayala, K.J. Brown, A. Defour, and J.K. Jaiswal. 2014. Mechanism of Ca(2+)-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nature communications*. 5:5646.

Schmidt, M.H., B. Chen, L.M. Randazzo, and O. Bogler. 2003. SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *J Cell Sci*. 116:2845-2855.

Schmidt, M.H., I. Dikic, and O. Bogler. 2005. Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities. *J Biol Chem*. 280:3414-3425.

Schmidt, M.H., D. Hoeller, J. Yu, F.B. Furnari, W.K. Cavenee, I. Dikic, and O. Bogler. 2004. Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Mol Cell Biol*. 24:8981-8993.

Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, D. Adam, R. Mentlein, D. Kabelitz, and S. Schutze. 2004. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity*. 21:415-428.

Schuske, K.R., J.E. Richmond, D.S. Matthies, W.S. Davis, S. Runz, D.A. Rube, A.M. van der Bliek, and E.M. Jorgensen. 2003. Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron*. 40:749-762.

Shaye, D.D., and I. Greenwald. 2005. LIN-12/Notch trafficking and regulation of DSL ligand activity during vulval induction in Caenorhabditis elegans. *Development*. 132:5081-5092.

Shekarabi, M., S.W. Moore, N.X. Tritsch, S.J. Morris, J.F. Bouchard, and T.E. Kennedy. 2005. Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci*. 25:3132-3141.

Shelly, M., L. Cancedda, S. Heilshorn, G. Sumbre, and M.M. Poo. 2007. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell*. 129:565-577.

Sheng, M., and C.C. Hoogenraad. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem*. 76:823-847.

Shi, A., S. Pant, Z. Balklava, C.C. Chen, V. Figueroa, and B.D. Grant. 2007. A novel requirement for C. elegans Alix/ALX-1 in RME-1-mediated membrane transport. *Curr Biol*. 17:1913-1924.

Shibata, H., K. Yamada, T. Mizuno, C. Yorikawa, H. Takahashi, H. Satoh, Y. Kitaura, and M. Maki. 2004. The penta-EF-hand protein ALG-2 interacts with a region containing PxY repeats in Alix/AIP1, which is required for the subcellular punctate distribution of the amino-terminal truncation form of Alix/AIP1. *J Biochem (Tokyo)*. 135:117-128.

Shitamukai, A., D. Konno, and F. Matsuzaki. 2011. Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J Neurosci*. 31:3683-3695.

Sigismund, S., V. Algisi, G. Nappo, A. Conte, R. Pascolutti, A. Cuomo, T. Bonaldi, E. Argenzio, L.G. Verhoef, E. Maspero, F. Bianchi, F. Capuani, A. Ciliberto, S. Polo, and P.P. Di Fiore. 2013. Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate. *Embo J*. 32:2140-2157.
Sigismund, S., E. Argenzio, D. Tosoni, E. Cavallaro, S. Polo, and P.P. Di Fiore. 2008. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell*. 15:209-219.
Silva, A.J., C.F. Stevens, S. Tonegawa, and Y. Wang. 1992. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 257:201-206.
Soubeyran, P., K. Kowanetz, I. Szymkiewicz, W.Y. Langdon, and I. Dikic. 2002. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*. 416:183-187.
Springael, J.Y., E. Nikko, B. Andre, and A.M. Marini. 2002. Yeast Npi3/Bro1 is involved in ubiquitin-dependent control of permease trafficking. *FEBS Lett*. 517:103-109.
Stan, A., K.N. Pielarski, T. Brigadski, N. Wittenmayer, O. Fedorchenko, A. Gohla, V. Lessmann, T. Dresbach, and K. Gottmann. 2010. Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:11116-11121.
Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H.G. Gottlinger. 2003a. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*. 114:689-699.
Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H.G. Gottlinger. 2003b. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*. 114:689-699.
Strappazzon, F., S. Torch, C. Chatellard-Causse, A. Petiot, C. Thibert, B. Blot, J.M. Verna, and R. Sadoul. 2010. Alix is involved in caspase 9 activation during calcium-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 397:64-69.
Sun, Y., and S.X. Bamji. 2011. beta-Pix modulates actin-mediated recruitment of synaptic vesicles to synapses. *J Neurosci*. 31:17123-17133.
Svitkina, T.M., E.A. Bulanova, O.Y. Chaga, D.M. Vignjevic, S. Kojima, J.M. Vasiliev, and G.G. Borisy. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*. 160:409-421.
Sweeney, N.T., J.E. Brenman, Y.N. Jan, and F.B. Gao. 2006. The coiled-coil protein Shrub controls neuronal morphogenesis in drosophila. *Curr Biol*. 16:1006-1011.

# T

Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E.A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S.A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J.S. Hub, B.L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland, and R. Jahn. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*. 127:831-846.
Takumi, Y., V. Ramirez-Leon, P. Laake, E. Rinvik, and O.P. Ottersen. 1999. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci*. 2:618-624.
Thien, C.B., and W.Y. Langdon. 2001. Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:294-307.
Thomas, G.M., and R.L. Huganir. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 5:173-183.
Tiberi, L., P. Vanderhaeghen, and J. van den Ameele. 2012. Cortical neurogenesis and morphogens: diversity of cues, sources and functions. *Curr Opin Cell Biol*. 24:269-276.
Tissir, F., and A.M. Goffinet. 2003. Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci*. 4:496-505.
Togashi, H., K. Abe, A. Mizoguchi, K. Takaoka, O. Chisaka, and M. Takeichi. 2002. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*. 35:77-89.
Tomas, A., C.E. Futter, and E.R. Eden. 2014. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol*. 24:26-34.

Tomaselli, K.J., P. Doherty, C.J. Emmett, C.H. Damsky, F.S. Walsh, and L.F. Reichardt. 1993. Expression of beta 1 integrins in sensory neurons of the dorsal root ganglion and their functions in neurite outgrowth on two laminin isoforms. *J Neurosci*. 13:4880-4888.
Toriyama, M., N. Mizuno, T. Fukami, T. Iguchi, M. Toriyama, K. Tago, and H. Itoh. 2012. Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. *J Biol Chem*. 287:12691-12702.
Torre, E., M.A. McNiven, and R. Urrutia. 1994. Dynamin 1 antisense oligonucleotide treatment prevents neurite formation in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 269:32411-32417.
Trioulier, Y., S. Torch, B. Blot, N. Cristina, C. Chatellard-Causse, J.M. Verna, and R. Sadoul. 2004. Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *J Biol Chem*. 279:2046-2052.
Tu, C., C.F. Ortega-Cava, P. Winograd, M.J. Stanton, A.L. Reddi, I. Dodge, R. Arya, M. Dimri, R.J. Clubb, M. Naramura, K.U. Wagner, V. Band, and H. Band. 2010. Endosomal-sorting complexes required for transport (ESCRT) pathway-dependent endosomal traffic regulates the localization of active Src at focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:16107-16112.

# V

Vanderhaeghen, P., and H.J. Cheng. 2010. Guidance molecules in axon pruning and cell death. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a001859.
Varoqueaux, F., G. Aramuni, R.L. Rawson, R. Mohrmann, M. Missler, K. Gottmann, W. Zhang, T.C. Sudhof, and N. Brose. 2006. Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*. 51:741-754.
Verstreken, P., O. Kjaerulff, T.E. Lloyd, R. Atkinson, Y. Zhou, I.A. Meinertzhagen, and H.J. Bellen. 2002. Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell*. 109:101-112.
Villarroel-Campos, D., L. Gastaldi, C. Conde, A. Caceres, and C. Gonzalez-Billault. 2014. Rab-mediated trafficking role in neurite formation. *J Neurochem*. 129:240-248.
Vitriol, E.A., and J.Q. Zheng. 2012. Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron*. 73:1068-1081.
Voglmaier, S.M., K. Kam, H. Yang, D.L. Fortin, Z. Hua, R.A. Nicoll, and R.H. Edwards. 2006. Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron*. 51:71-84.
Vogt, G., A. Chapgier, K. Yang, N. Chuzhanova, J. Feinberg, C. Fieschi, S. Boisson-Dupuis, A. Alcais, O. Filipe-Santos, J. Bustamante, L. de Beaucoudrey, I. Al-Mohsen, S. Al-Hajjar, A. Al-Ghonaium, P. Adimi, M. Mirsaeidi, S. Khalilzadeh, S. Rosenzweig, O. de la Calle Martin, T.R. Bauer, J.M. Puck, H.D. Ochs, D. Furthner, C. Engelhorn, B. Belohradsky, D. Mansouri, S.M. Holland, R.D. Schreiber, L. Abel, D.N. Cooper, C. Soudais, and J.L. Casanova. 2005. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat Genet*. 37:692-700.
von Schwedler, U.K., M. Stuchell, B. Muller, D.M. Ward, H.Y. Chung, E. Morita, H.E. Wang, T. Davis, G.P. He, D.M. Cimbora, A. Scott, H.G. Krausslich, J. Kaplan, S.G. Morham, and W.I. Sundquist. 2003. The protein network of HIV budding. *Cell*. 114:701-713.

# W

Wallingford, J.B., L.A. Niswander, G.M. Shaw, and R.H. Finnell. 2013. The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. *Science*. 339:1222002.

Watanabe, S., B.R. Rost, M. Camacho-Perez, M.W. Davis, B. Sohl-Kielczynski, C. Rosenmund, and E.M. Jorgensen. 2013. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*. 504:242-247.

Watanabe, S., T. Trimbuch, M. Camacho-Perez, B.R. Rost, B. Brokowski, B. Sohl-Kielczynski, A. Felies, M.W. Davis, C. Rosenmund, and E.M. Jorgensen. 2014. Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature*. 515:228-233.

Wilhelm, B.G., S. Mandad, S. Truckenbrodt, K. Krohnert, C. Schafer, B. Rammner, S.J. Koo, G.A. Classen, M. Krauss, V. Haucke, H. Urlaub, and S.O. Rizzoli. 2014. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science*. 344:1023-1028.

Windler, S.L., and D. Bilder. 2010. Endocytic internalization routes required for delta/notch signaling. *Curr Biol*. 20:538-543.

Wisco, D., E.D. Anderson, M.C. Chang, C. Norden, T. Boiko, H. Folsch, and B. Winckler. 2003. Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *J Cell Biol*. 162:1317-1328.

Wolf, A.A., Y. Fujinaga, and W.I. Lencer. 2002. Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *J Biol Chem*. 277:16249-16256.

Wonders, C.P., and S.A. Anderson. 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*. 7:687-696.

Wu, G., Z.H. Lu, A.G. Obukhov, M.C. Nowycky, and R.W. Ledeen. 2007. Induction of calcium influx through TRPC5 channels by cross-linking of GM1 ganglioside associated with alpha5beta1 integrin initiates neurite outgrowth. *J Neurosci*. 27:7447-7458.

Wu, Y., E.T. O'Toole, M. Girard, B. Ritter, M. Messa, X. Liu, P.S. McPherson, S.M. Ferguson, and P. De Camilli. 2014. A dynamin 1-, dynamin 3- and clathrin-independent pathway of synaptic vesicle recycling mediated by bulk endocytosis. *eLife*. 3:e01621.

Wu Y., P.S., Luo W., Lin S.H., Kuang J. 2002. Hp95 promotes anoikis and inhibits tumorigenicity of HeLa cells. *Oncogene*. 21:6801-6808.

# X

Xie, Y., J.P. Vessey, A. Konecna, R. Dahm, P. Macchi, and M.A. Kiebler. 2007. The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Curr Biol*. 17:1746-1751.

# Y

Yap, C.C., Z.M. Lasiecka, S. Caplan, and B. Winckler. 2010. Alterations of EHD1/EHD4 protein levels interfere with L1/NgCAM endocytosis in neurons and disrupt axonal targeting. *J Neurosci*. 30:6646-6657.

Yap, C.C., D. Wisco, P. Kujala, Z.M. Lasiecka, J.T. Cannon, M.C. Chang, H. Hirling, J. Klumperman, and B. Winckler. 2008. The somatodendritic endosomal regulator NEEP21 facilitates axonal targeting of L1/NgCAM. *J Cell Biol*. 180:827-842.

Yoon, K., S. Nery, M.L. Rutlin, F. Radtke, G. Fishell, and N. Gaiano. 2004. Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors. *J Neurosci*. 24:9497-9506.

Yoon, K.J., B.K. Koo, S.K. Im, H.W. Jeong, J. Ghim, M.C. Kwon, J.S. Moon, T. Miyata, and Y.Y. Kong. 2008. Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells. *Neuron*. 58:519-531.

# Z

Zhang, W., and D.L. Benson. 2001. Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J Neurosci*. 21:5169-5181.

Zhou, F.Q., J. Zhou, S. Dedhar, Y.H. Wu, and W.D. Snider. 2004. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron*. 42:897-912.

Zhou, X., S. Pan, L. Sun, J. Corvera, Y.C. Lee, S.H. Lin, and J. Kuang. 2009. The CHMP4b- and Src-docking sites in the Bro1 domain are autoinhibited in the native state of Alix. *Biochem J*. 418:277-284.

# ANNEXES

Annexe 1 : Protocoles expérimentaux référents à la partie 3

Annexe 2 : Article 3 – « Regulation of Postsynaptic Function by the Dementia-Related ESCRT-III Subunit CHMP2B »

Cette partie décrit sommairement les protocoles expérimentaux utilisés pour les résultats complémentaires. L'analyse du volume ventriculaire par IRM est décrite dans l'article 2. La purification des synaptosomes *in vivo* et la préparation des cerveaux pour l'analyse morphologique des synapses en microscopie électronique sont décrites dans l'annexe 2.

**Formation des protrusions membranaires par CHMP2B**

Les MEFs wt et Alix ko ont été transfectées avec Flag-CHMP2B. 36h après la transfections, les cellules sont fixées en PBS-PFA 4% et perméabilisées en PBS-GPI 3%-Triton 0,3% pendant 20 min. La détection de CHMP2B est réalisée par l'incubation d'anticorps polyclonaux anti-Flag (dilution 1/1000) pendant 1h suivit d'une incubation avec un anticorps anti-IgG-A488 (REF, dilution 1/1000). Les cellules ont ensuite été observées au microscope à épifluorescence.

**Analyse du recrutement des ESCRT à la membrane plasmique**

Les MEFs wt et Alix ko ont été transfectées avec GFP-CHMP2B ou GFP-CHMP4B. 12h après transfection, les cellules sont traitées avec 5 μM de digitonine pendant 1 minute à 37°C puis incubées à 37°C en DMEM pendant 2 min avant d'être fixées en PBS-PFA 4%. La chélation du calcium extracellulaire est réalisée l'ajout d'EGTA (2 mM) pendant et suivant le traitement à la digitonine. Pour la détection des protéines endogènes Alix et CHMP2B, les cellules ont été perméabilisées en PBS-Triton 0,3%-GPI 3% pendant 20 minutes puis incubées avec des anticorps polyclonaux anti-Alix (Covalab, ditution 1/500) ou anti-CHMP2B (Abcam, dilution 1/1000) pendant 1 heure, suivit d'une incubation avec un anticorps anti-IgG-A594 (dilution 1/1000). Les cellules ont ensuite été observées au microscope confocal.

**Recrutement d'Alix sous stimulation neuronale**

Les neurones corticaux et hippocampiques de rats ont été préparés, cultivés et transfectés avec les plasmides codant pour la mcherry et Flag-Alix ou GFP-Alix de manière similaires à ce qui est décrit dans l'article 3. 24h après transfection, les neurones de 15 DIV sont stimulés pendant 15 minutes en présence de Bicuculine (50 μM) et de 4-aminopyridine (2,5mM) (Bic-4AP).

- Pour l'analyse du recrutement d'Alix aux boutons axonaux pré-synaptiques, le milieu de culture des neurones est remplacé par un milieu extracellulaire sans rouge phénol (150mM NaCl, 5mM KCl, 1,3mM $CaCl_2$, 10mM Hepes, 33mM Glucose, pH 7,4) et les neurones exprimant à la fois Alix-GFP ou mcherry, sont placés dans une chambre thermorégulée au microscope confocal. Après l'acquisition de 5 images témoignant de la fluorescence basale des neurones, les neurones sont stimulés par la perfusion du milieu extracellulaire supplémenté en Bic-4AP pendant 15 minutes. Les neurones sont ensuite lavés dans le milieu extracellulaire de base

pendant 15 minutes. L'acquisition d'une image toutes les 2 minutes est réalisée pendant et après la stimulation.

- Pour l'analyse du recrutement d'Alix dans les épines dendritiques et dans les synaptosomes, la moitié du milieu de culture des neurones est remplacé par le milieu de stimulation (Bic-4AP 2x dilués dans du Neurobasal contenant 2% de B27 et 2mM de L-glutamine). Les neurones sont ensuite incubés à 37°C, 5% $CO_2$ pendant 15 minutes. Les neurones sont ensuite directement lysés pour la purification des synaptosomes ou fixés en PBS-PFA 4%-sucrose 4% et immunomarqués avec des anticorps anti-Flag ( 1/1000) pour l'analyse du recrutement d'Alix dans les épines dendritiques.

**Purification des synaptosomes de neurones corticaux en culture**

Les neurones sont placés 5 min sur la glace en tampon sucrose (Sucrose 0,32M, Hepes 10mM pH7,4, Inhibiteurs de protéases, NaF 15mM, b-glycérophosphate 15mM), collectés puis lysés mécaniquement avec une aiguille 0,25G (15 allers-retours). Les noyaux et gros débris sont éliminés par centrifugation à 1000g pendant 10 miniutes. Cette première étape est répétée une fois puis le lysat est centrifugé 20 min à 12 000g. Le culot de membrane récupéré, principalement enrichi en synaptosomes, est lavé deux fois en tampon Hepes (Hepes 4mM pH 7,4 Inhibiteurs de protéases, NaF 15mM, b-glycérophosphate 15mM) puis solubilisé en Triton (Hepes 20mM pH 7,2, NaCl 100mM, Triton-x-100 0,5%, Inhibiteurs de protéases, NaF 15mM, b-glycérophosphate 15mM) pendant 20 minutes à 4°C. Les synaptosomes solubilisés sont ensuite dosés et analysés par Western Blot.

**Enregistrements électrophysiologiques**

Tous les enregistrements electrophysiologiques ont été réalisés sur tranches d'hippocampes de souris mâles âgées de 1 à 2 mois. Les tranches de 350 μm sont réalisées au vibratome dans le milieu d'enregistrement ACSF (artificial cerebrospinal fluide) contenant 124 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM $MgSO_4$, 1,25 mM $KH_2PO_4$, 26 mM $NaHCO_3$, 10 mM glucose, 4 mM sucrose, 2,5 mM $CaCl_2$.

Les électrodes de stimulation sont placées sur les collatérales de Schaffer faisant synapse avec les dendrites des neurones pyramidaux de la région CA1, où sont placés les électrodes d'enregistrement extracellulaire (voir Figure 40A).

La courbe Imput /Output représente l'augmentation de l'amplitude de la réponse post-synaptique à une série de stimulation d'intensité croissante. Pour chaque intensité, 3 stimulations sont données à 15 secondes d'intervalle et l'enregistrement de l'amplitude des 3

potentiels post-synaptiques excitateurs est moyennée. L'amplitude des PPSE est enregistrée pour des stimulations à 35, 40, 45, 50, 55 et 60 μA.

Le Paired-pulse Ratio (PPR) est l'expression de l'augmentation de la réponse post-synaptique à deux stimulations successives de même intensité. Les neurones sont stimulés deux fois à 50 ms d'intervalle à une intensité moyenne de 40 μA. Pour chacune des deux stimulations, l'amplitude des PPSE est enregistrée. Le ratio entre l'amplitude de la deuxième réponse et l'amplitude de la première est calculée.

La Potentialisation à long terme (LTP) corresponds à l'augmentation persistante de l'amplitude des PPSE pour une stimulation donnée. Les neurones sont stimulés pendant 15 minutes à 1 minute d'intervalle à 40 mA. L'amplitude des PPSE enregistrée correspond à la réponse post-synaptique basale avant l'induction de la LTP. La LTP est induite par 2 séries stimulations à haute fréquence (100 stimulations par secondes) espacées de 20 secondes. Directement après l'induction de la LTP, les neurones sont de nouveau stimulés à 1 minute d'intervalle à 40 mA pendant 45 minutes, au cours desquelles l'amplitude de PPSE est enregistrée.

**Bulk endocytose sur les neurones granulaires de cervelet**

Les neurones granulaires de cervelets sont prélevés à partir de cervelets de souriceaux âgés de 6 jours. Brièvement, les cervelets sont isolés et coupés en 3 dans du HBSS. Après une dissociation chimique en présence de trypsine et de DNASE (1500U/mL), les neurones sont dissociés en DMEM contenant 10% de sérum de cheval, 10 mM Hepes, 2 mM L-glutamine. Les neurones dissociés sont filtrés et ensemencés à $5.10^5$ cellules par $cm^2$ sur des lamelles pré-coatées à la poly-D-Lysine (50 mg/ml). Les neurones sont mis en présence d'AraC 24h après l'ensemencent pour inhiber la croissance des cellules gliales jusqu'à la stimulation des neurones à 8DIV. Pour le marquage des vésicules et bulk endosomes, Les cellules ont ensuite été repolarisées pendant 10 min dans une solution d'incubation (170 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 0,4 mM K2HPO4, 20 mM TES (N-tris (hydroxymethyl)-methyl1-2-amino-ethane-sulfonic acid), 5 mM NaHCO3, 5 mM glucose, 1,2 mM Na2SO4, 1,2 mM MgCl2, 1,3 mM CaCl2, pH7,4) puis stimulées pendant 2 minutes dans une solution hyperpotassique (avec 50 nM K+ remplacant la meme quantité de NaCl) contenant de l'HRP à10 mg/ml, comme decrit par Cheung et al 2010. Les temoins ont été incubés sans dépolarisation. Après 2 lavages dans du PBS chaud les cultures ont été fixées 30 min avec de la glutaraldehyde 2% dans du PBSet lavés trois fois avec du Tris 100 mM. Les peroxydases endocytées ont été révélées par le diaminobenzidine 0,1% et H2O2 0,2% dans du Tris 100 mM et les cultures postfixées et incluses classiquement pour la microscopie électronique.

Cellular/Molecular

# Regulation of Postsynaptic Function by the Dementia-Related ESCRT-III Subunit CHMP2B

Romain Chassefeyre,[1,2]* José Martínez-Hernández,[1,2]* Federica Bertaso,[3,4,5] Nathalie Bouquier,[3,4,5] Béatrice Blot,[1,2] Marine Laporte,[1,2] Sandrine Fraboulet,[1,2] Yohann Couté,[6,7] Anny Devoy,[8] Adrian M. Isaacs,[8] Karin Pernet-Gallay,[1,2] Rémy Sadoul,[1,2] Laurent Fagni,[3,4,5] and Yves Goldberg[1,2,9]

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 836, F-38042 Grenoble, France, [2]Université Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), F-38042 Grenoble, France, [3]CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34094 Montpellier, France, [4]Universités de Montpellier 1 & 2, UMR-5203, F-34094 Montpellier, France, [5]INSERM, Unité 661, F-34094 Montpellier, France, [6]INSERM, Unité 1038, F-38054 Grenoble, France, [7]Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV), Laboratoire de Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France, [8]Department of Neurodegenerative Disease, University College London Institute of Neurology, London WC1N 3BG, United Kingdom, and [9]CEA, iRTSV, Groupe Physiopathologie du Cytosquelette (GPC), F-38054 Grenoble, France

**The charged multivesicular body proteins (Chmp1–7) are an evolutionarily conserved family of cytosolic proteins that transiently assembles into helical polymers that change the curvature of cellular membrane domains. Mutations in human CHMP2B cause frontotemporal dementia, suggesting that this protein may normally control some neuron-specific process. Here, we examined the function, localization, and interactions of neuronal Chmp2b. The protein was highly expressed in mouse brain and could be readily detected in neuronal dendrites and spines. Depletion of endogenous Chmp2b reduced dendritic branching of cultured hippocampal neurons, decreased excitatory synapse density *in vitro* and *in vivo*, and abolished activity-induced spine enlargement and synaptic potentiation. To understand the synaptic effects of Chmp2b, we determined its ultrastructural distribution by quantitative immuno-electron microscopy and its biochemical interactions by coimmunoprecipitation and mass spectrometry. In the hippocampus *in situ*, a subset of neuronal Chmp2b was shown to concentrate beneath the perisynaptic membrane of dendritic spines. In synaptoneurosome lysates, Chmp2b was stably bound to a large complex containing other members of the Chmp family, as well as postsynaptic scaffolds. The supramolecular Chmp assembly detected here corresponds to a stable form of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III), a ubiquitous cytoplasmic protein complex known to play a central role in remodeling of lipid membranes. We conclude that Chmp2b-containing ESCRT-III complexes are also present at dendritic spines, where they regulate synaptic plasticity. We propose that synaptic ESCRT-III filaments may function as a novel element of the submembrane cytoskeleton of spines.**

*Key words:* **ESCRT filaments; frontotemporal dementia; postsynaptic scaffold; spinoskeleton; structural plasticity**

## Introduction

The endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) is a ubiquitous protein complex that is crucial to cellular membrane remodeling during inward vesiculation of multivesicular endosomes, mitotic cell abscission, and viral budding (for review, see Henne et al., 2013; McCullough et al., 2013). The core subunits of ESCRT-III are a family of evolutionarily conserved proteins, called charged multivesicular body proteins (Chmp1-7). Dominant mutations in subunit CHMP2B cause frontotemporal dementia (FTD; Skibinski et al., 2005; Isaacs et al., 2011), raising the question whether some neuron-specific process is controlled by this protein. Chmp2b and other ESCRT-III subunits exist in the cytosol in a monomeric, autoinhibited state. After release of intramolecular inhibition, individual subunits polymerize into circular or helical filaments (20–200 nm wide, subject to subunit species) that adhere to lipid membranes and change their curvature (Shim et al., 2007; Hanson et al., 2008; Lata et al., 2008; Bajorek et al., 2009; Henne et al., 2012; Buchkovich et al., 2013).

Received Feb. 10, 2014; revised Dec. 23, 2014; accepted Jan. 6, 2015.

Author contributions: R.S., L.F., and Y.G. designed research; R.C., J.M.-H., F.B., N.B., B.B., M.L., S.F., Y.C., A.D., A.M.I., K.P.-G., and Y.G. performed research; Y.C. and A.M.I. contributed unpublished reagents/analytic tools; R.C., J.M.-H., F.B., N.B., Y.C., K.P.-G., R.S., L.F., and Y.G. analyzed data; R.C., J.M.-H., A.M.I., R.S., L.F., and Y.G. wrote the paper.

This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR), MALZ program, France. R.C. and M.L. were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France. J.M.-H. and N.B. were supported by ANR. A.M.I. was supported by the United Kingdom Medical Research Council. We thank Y. Saoudi for help with microscopy and N. Jaafari, A. Petiot, and W. Weissenhorn for critically reading this manuscript.

*R.C. and J.M.-H. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

This article is freely available online through the *J Neurosci* Author Open Choice option.

Correspondence should be addressed to either Yves Goldberg or Rémy Sadoul,, Institut des Neurosciences, UJF Site Santé, Chemin Ferrini, 38042 Grenoble cedex 9, France. E-mail: yves.goldberg@ujf-grenoble.fr or remy.sadoul@ujf-grenoble.fr.

R. Chassefeyre's present address: The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0586-14.2015

Copyright © 2015 Chassefeyre et al.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

**Table 1. Plasmids used in this study**

| Plasmid name | Cloning technique | Cloning sites | Feature | Tags | Source |
|---|---|---|---|---|---|
| pIRES2-EGFP | Starting vector | | | | Clontech |
| pIRES2-EGFP-CHMP2B WT | In-Fusion (Clontech) | XhoI, XhoI | RNAi res. | C-terminal FLAG | This study |
| pBI-CMV3 | Starting vector | | | | Clontech |
| pBI-CMV3-CHMP2B WT | In-Fusion (Clontech) | BamHI, HindIII | RNAi res. | | This study |
| pBI-CMV3-CHMP2B R19/22/26A | In-Fusion (Clontech) | BamHI, HindIII | RNAi res. | | This study |
| pBI-CMV3-CHMP2B L4D/F5D | In-Fusion (Clontech) | BamHI, HindIII | RNAi res. | | This study |
| pBI-CMV3-CHMP2B L207D/L210D | In-Fusion (Clontech) | BamHI, HindIII | RNAi res. | | This study |
| pSuper-mCherry | Starting vector | | | | Belly et al., 2010 |
| pSuper-mCherry shRNA vs CHMP2B | Standard ligation | HindIII, BglII | | | Belly et al., 2010 |
| pSuper-mCherry shRNA vs GFP | Standard ligation | HindIII, BglII | | | This study |
| pCDNA3.1-CHMP2B WT | Topo (Invitrogen) | | | C-terminal HA | This study |
| pCDNA3.1-CHMP2B R19/22/26A | Topo (Invitrogen) | | | C-terminal HA | This study |
| pCDNA3.1-CHMP4B | Topo (Invitrogen) | | | C-terminal FLAG | Bodon et al., 2011 |

The cloning technique used to construct each plasmid and, if applicable, the associated kit supplier are indicated. RNAi res. Indicates the encoded mRNA is resistant to RNAi by the Chmp2b shRNA.

We have previously shown that Chmp2b preferentially polymerizes under the plasma membrane and, when overexpressed, organizes into helices that deform patches of the cell surface into long protrusions (Bodon et al., 2011). Holomeric ESCRT-III consists of heteropolymeric Chmp filaments assembled at sites of endosomal or plasma membrane deformation, after recruitment by the upstream-acting complexes ESCRT-I and -II and/or by the Chmp4b-binding protein Alix. ESCRT-III assemblies at membranes are thought to be transient, being dissociated after interaction with the depolymerizing ATPase Vps4. This depolymerization step is coupled to scission of membrane necks modeled by ESCRT-III filaments (Henne et al., 2013).

FTD-associated CHMP2B mutants are deregulated and form aberrant polymeric structures in transfected cells (Skibinski et al., 2005). Strong expression of such a CHMP2B mutant in cultured cortical neurons is rapidly lethal (Lee et al., 2007), and transgenic mice expressing the same mutant throughout their brain display progressive neurodegenerative changes (Ghazi-Noori et al., 2012). These effects have been linked to defects in autophagic and endosomal degradation pathways (Filimonenko et al., 2007; Lee et al., 2007; Urwin et al., 2010). However, these phenotypes arise from a toxic gain rather than loss of function in the mutant allele. Indeed, degeneration was not seen in knock-out mice severely (though not completely) deficient for Chmp2b (Ghazi-Noori et al., 2012). Furthermore, Chmp2b depletion did not affect survival of cultured neurons (Lee et al., 2007; Belly et al., 2010) but significantly impaired the morphological maturation of dendritic spines (Belly et al., 2010). This, together with the fact that synaptogenesis correlates with Chmp2b gene transcription in some neuronal populations (Xu et al., 2012), led us to hypothesize that normal Chmp2b and ESCRT-III may function at synapses.

Here, we show that Chmp2b is required for maintaining the complexity of dendritic trees as well as the stability, efficacy, and plasticity of excitatory synapses. We also show that the protein preferentially localizes beneath the plasma membrane of dendritic spines and is bound to stable ESCRT-III complexes associated with the postsynaptic cytoskeleton, suggesting that ESCRT-III polymers cooperate with postsynaptic scaffolds and actin filaments to shape dendritic spines.

## Materials and Methods

*Plasmids.* See Table 1 for details of all constructs. The pSuper-mCherry vector was described by Belly et al. (2010) and expresses the inserted shRNA together with mCherry. The Chmp2b-specific shRNA (Lee et al., 2007; Belly et al., 2010) and the GFP-specific shRNA [previously shown by Alvarez et al. (2006) to have no effect on neuronal morphology or electrical properties] have been described and were inserted into pSuper-mCherry. cDNAs encoding wild-type (WT) or mutant versions of the RNAi-resistant Chmp2b (Belly et al., 2010) were cloned in the pBI-CMV3 vector (Clontech), yielding pBI-CMV3-Chmp2b$^{WT}$, pBI-CMV3-Chmp2b$^{R19/22/26A}$, and pBI-CMV3-Chmp2b$^{L4D/F5D}$. In these vectors, Chmp2b is coexpressed with fluorescent protein ZsGreen from a bidirectional promoter. cDNA encoding wild-type, RNAi-resistant Chmp2b (carrying a single C-terminal Flag tag; Bodon et al., 2011) was inserted upstream of the IRES sequence of the pIRES2-EGFP vector (Clontech), yielding pIRES2-EGFP-Chmp2b (used in Fig. 6*B*). In this vector, Chmp2b is coexpressed with EGFP from a bicistronic transcript. All constructs were verified by sequencing (Beckman Coulter).

*Antibodies.* See Table 2 for details of antibodies and dilutions.

*Animals.* Animals were handled and killed in conformity with European law and internal regulations of INSERM. Pregnant Oncins France souche A (OFA; a substrain of Sprague Dawley) rats (Charles River) were used for primary neuron cultures, and 2-month-old OFA rats of both sexes were used for biochemical analysis of brain tissue. The rats were deeply anesthetized by isoflurane inhalation before decapitation, quickly followed by cesarean section or brain dissection. Three-month-old male C57BL/6 mice and 1.3-month-old female Chmp2b KO mice (here called KD mice since knock-out is incomplete; Ghazi-Noori et al., 2012) or female WT littermates (on C57BL/6 background) were used for immunohistochemistry and electron microscopy (EM) studies. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 0.1 ml of sodium pentobarbital (5.6% w/v; CEVA Santé Animale) and intracardially perfused with phosphate-buffered 0.9% NaCl (PBS), followed by 0.1 M phosphate-buffered 4% formaldehyde, pH 7.4, supplemented with 0.05% glutaraldehyde (Sigma). The brains were carefully removed and postfixed for 4 h in the same fixative, and 60-$\mu$m-thick coronal brain sections were cut with a Vibratome (VT 1000 S; Leica).

*Cell culture and transfection.* Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as described previously (Belly et al., 2010). Briefly, hippocampi were dissected from E18 rat embryos, treated with trypsin, and disrupted by seven to eight cycles of aspiration and ejection through a micropipette tip. Dissociated hippocampal cells were seeded at a density of $1.5 \times 10^4/cm^2$ in 35 mm dishes on coverslips precoated for 4 h with 50 $\mu$g/ml poly-D-lysine (Sigma), in neuronal culture medium (Neurobasal medium containing B27 supplement, penicillin/streptomycin, and 0.5 mM L-glutamine; Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (Invitrogen). Fourteen-mililimeter-wide round coverslips were used for immunostaining, and 30-mm-wide coverslips were used for live imaging. Neurons were maintained in water-saturated 95% air/5% $CO_2$ at 37°C. The seeding medium was replaced after 20 h with serum-free neuronal culture medium.

Neurons were transfected using a calcium phosphate method optimized for highly mature neuronal cultures (Goetze et al., 2004; Jiang and Chen, 2006). For cotransfection experiments, for each dish, 1 $\mu$g of pSuper-mCherry-based plasmid was mixed with 2 $\mu$g of pBI-CMV3-based or pIRES2-EGFP-based plasmid. Five microliters of 250 mM $CaCl_2$ were added to 45 $\mu$l of water containing 3 $\mu$g of DNA, mixed, and

**Table 2. Antibodies used in this study**

| Antibody | Species | Company (reference) | Dilutions | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | IF | WB | IHC/EM |
| Anti-Chmp2b | Rabbit polyclonal | Abcam (ab33174) | 500 | 10,000 | 1000 |
| Anti-Chmp2b | Mouse monoclonal | Covalab | 100 | 2000 | |
| Anti-Chmp4b | Rabbit polyclonal | Abcam (ab105767) | 500 | 2000 | |
| Anti-Chmp4b | Mouse monoclonal | Covalab | 100 | 1000 | |
| Anti-Alix | Rabbit polyclonal | Covalab (ab0204) | | 6000 | |
| Anti-PSD95 | Mouse monoclonal | NeuroMab (73-028) | 200 | 4000 | |
| Anti-GluN1 | Mouse monoclonal | Synaptic Systems (114011) | 200 | 4000 | |
| Anti-Synaptophysin | Mouse monoclonal | Merck Millipore (MAB5258) | | 10,000 | |
| Anti-HA | Mouse monoclonal | Cell Signaling (2367) | 200 | 5000 | |
| Anti-HA | Rabbit polyclonal | Sigma-Aldrich (H6908) | | 5000 | |
| Anti-Flag | Mouse monoclonal | Sigma-Aldrich (F3165) | 1000 | 10,000 | |
| Anti-Flag | Rabbit polyclonal | Sigma-Aldrich (F7425) | 1000 | 5000 | |
| Anti-Actin | Mouse monoclonal | Millipore (MAB1501R) | | 20,000 | |
| Anti-Tubulin | Mouse monoclonal | Gift from A. Andrieux's laboratory | | 20,000 | |
| Anti-Pan MAGUK | Mouse monoclonal | NeuroMab (75-029) | | 4000 | |
| Anti-GluN2B | Mouse monoclonal | NeuroMab (75-097) | | 4000 | |
| Anti-Glu2 | Mouse monoclonal | Millipore (MABN71) | | 5000 | |
| Anti-ShankIII | Rabbit polyclonal | Santa Cruz Biotechnology (30193) | | 1000 | |
| Anti-Homer | Mouse monoclonal | Santa Cruz Biotechnology (17842) | | 2000 | |
| Anti-Mouse HRP | Goat polyclonal | Jackson ImmunoResearch (115-035-166) | | 20,000 | |
| Anti-Rabbit HRP | Goat polyclonal | Jackson ImmunoResearch (115-035-044) | | 20,000 | |
| Anti-Mouse Alexa Fluor 488 | Goat polyclonal | Invitrogen (A-11029) | 1500 | | |
| Anti-Mouse Alexa Fluor 594 | Goat polyclonal | Invitrogen (A-11032) | 1500 | | |
| Anti-Mouse Cy5 | Goat polyclonal | Jackson ImmunoResearch (115-175-146) | 1000 | | |
| Anti-Rabbit Alexa Fluor 488 | Goat polyclonal | Invitrogen (A-11034) | 1500 | | |
| Anti-Rabbit Alexa Fluor 594 | Goat polyclonal | Invitrogen (A-11037) | 1500 | | |
| Anti-Rabbit Cy5 | Goat polyclonal | Jackson ImmunoResearch (111-175-144) | 1000 | | |

The antibody dilutions we used are indicated for each application. IF, Immunofluorescence; WB, Western immunoblotting; IHC, immunohistochemistry.

immediately added dropwise to 50 $\mu$l of 2× *N*, *N*-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (BES)-buffered saline solution, pH 7.1. The mixture was gently stirred by tapping the tube and bubbling air once, left to incubate for 10 min, and added to coverslips in 1 ml of transfection medium [Eagle's MEM (Invitrogen) including 2.2% $NaHCO_3$ and supplemented with B27, 0.05 mM glutamine, and 20 mM glucose]. After 1 h in the incubator, the coverslips were transferred to dishes containing 2 ml of transfection medium (without B27) preincubated for 30 min in 10% $CO_2$. The dishes were quickly returned to 5% $CO_2$ and left for 5–10 min before returning the coverslips to their original (conditioned) neuronal culture medium. For immunofluorescence of exogenously expressed proteins, neurons were fixed 16–20 h after transfection. For RNAi experiments, fixation or live imaging took place 72 h after transfection.

HEK-293T and HeLa cells were grown in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine (Sigma). Cells were transfected after 24 h of culture using jetPEI (Polyplus) for HeLa cells and calcium phosphate for HEK cells. Cells were fixed or lysed 36 h after transfection.

*Immunohistochemistry.* Brain sections were incubated in 10% goat preimmune serum (GPi) diluted in 50 mM Tris buffer, pH 7.4, containing 0.9% NaCl [Tris-buffered saline (TBS)], with 0.2% Triton X-100, for 1 h. Sections were then incubated overnight at 4°C in a primary antibody at a final protein concentration of 1–2 $\mu$g/ml, which had been diluted in TBS containing 1% GPi. After several washes in TBS, the sections were further incubated for 2 h in biotinylated goat anti-rabbit IgG (Sigma Immuno Chemicals) diluted 1:100 in TBS containing 1% GPi. They were then transferred into avidin–biotin–peroxidase complex (ABC kit; Vector Laboratories) diluted 1:100 for 2 h at room temperature. Bound peroxidase enzyme activity was revealed using DAB (0.05% in TB, pH 7.4) as the chromogen and 0.01% $H_2O_2$ as the substrate. Finally, sections were air-dried and coverslipped.

*Immunofluorescent staining.* Cultured neurons were fixed for 20 min at room temperature in phosphate-buffered 4% paraformaldehyde supplemented with 4% sucrose. After three washes in PBS containing 0.1% glycine, cells were permeabilized in PBS containing 0.25% Triton X-100 for 10 min at 4°C and rinsed with PBS. Coverslips were blocked for 1 h in PBS containing 5% GPi and incubated for 1–2 h at room temperature in a humidified chamber with primary antibodies diluted in a blocking solution. After washing in PBS, cells were incubated for 1 h with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, or Cyanine 5 (Cy5), diluted in the blocking solution. Coverslips were rinsed and mounted in Mowiol.

*Golgi staining.* The dendritic spines of hippocampal neurons *in situ* were visualized by the Golgi impregnation technique. For this, we used the FD Rapid GolgiStain kit (FDNeuroTechnologies). Hippocampal tissue blocks (2.5–3 mm) were immersed in equal volumes of solutions A and B for 7 d and impregnated with solution C for 48 h at 4°C. Then, the brains were cut with a vibratome into 150-$\mu$m-thick sections embedded in agarose, washed twice in double-distilled water, and incubated for 10 min in a mixture of one part of solution D, one part of solution E, and two parts of double-distilled water. Sections were washed twice, dehydrated with increasing ethanol, and mounted with epoxy resin (Fluka) between two coverslips. The slides were analyzed by investigators without knowledge of genotype. In each of three animals per genotype, nine secondary or tertiary pyramidal neuron dendrites were randomly selected in the CA1 stratum radiatum. Selection criteria were (1) dendrites displayed complete Golgi impregnation, (2) the cell type was clearly identifiable, and (3) the minimum length of the dendrites was 50 $\mu$m from the soma. Stacks of bright-field images with 0.3 $\mu$m spacing were acquired with a Zeiss Axioskop 50 microscope with 63× oil objective (NA 1.4; Plan-Aprochromat) coupled to a CCD camera (CoolSnap ES; Roper Scientific) operated by Metaview software (Molecular Devices). Images were analyzed with ImageJ. The number of spines of each basic type per unit dendritic length was measured.

*Fluorescence microscopy.* Light microscopy images were acquired with a Zeiss LSM 710 inverted confocal microscope, using a 63× Plan-Apochromat oil-immersion objective (NA 1.4; Zeiss) or (for Sholl analysis) a 40× oil objective (NA 1.3; Zeiss). The instrument was controlled by Zen software and includes acousto-optical filters for attenuating laser power, scanning mirrors with adjustable speed, and resolution of emitted light by a diffraction grating and beam guides for setting spectral collection windows. Laser lines at 488, 561, and 633 nm were used for exciting fluorescence of EGFP, ZsGreen, or Alexa Fluor 488; mCherry or Texas Red; and Cyanine 5, respectively. For multicolor imaging, collection win-

dows were adjusted based on emission spectra to minimize cross-channel contamination. Pinhole size was usually set to generate 0.9-$\mu$m-thick optical slices ($\cong$1 Airy unit) at all wavelengths. For fixed samples, laser power was adjusted to 0.5–1.25 mW in all channels, and the signal was averaged over four scans and digitized on an 8 bit grayscale. In the experiments shown in Figure 2, *B* and *C*, *Z*-stacks were acquired with 0.09 × 0.09 × 0.2 $\mu m^3$ voxel size and processed by a blind deconvolution algorithm (AutoQuant; Media Cybernetics) to improve resolution and remove shot noise. The processed images were slightly contrasted with ImageJ for clarity.

To evaluate the probability of random overlap between Chmp2b and postsynaptic densitity-95 (PSD-95) clusters, a dendritic region was selected in a way to exclude as much as possible empty pixels. Pearson's correlation coefficient ($r$) between Chmp2b and PSD-95 intensity values was calculated for the actual image, and the probability of obtaining the observed coefficient was calculated based on 1000 randomized images similar to the one shown using the ImageJ plug-in JACOP (Bolte and Cordelières, 2006).

For Sholl analysis, images (1024 × 1024 pixels; 350 × 350 $\mu$m; four optical sections in $z$) were taken from neurons coexpressing ZsGreen and mCherry, within the same fluorescence range for all neurons (40 neurons per transfection condition, three independent cultures). Sholl analysis was performed on maximum intensity projections of mCherry fluorescence using the Sholl Analysis plugin of ImageJ.

For postsynaptic spine counting in cultured neurons, transfected neurons were stained by immunofluorescence with anti-PSD-95 antibody and Cy5-conjugated secondary antibody. Triply labeled neurons (mCherry-ZsGreen-Cy5) were imaged in all three channels as above. For each neuron, 10–20 optical sections were acquired (voxel size, 0.1 × 0.1 × 0.2 $\mu m^3$). Images were analyzed with ImageJ. Postsynaptic spines were manually identified in successive sections as spine-like dendritic protrusions (visualized by mCherry fluorescence) carrying PSD-95 clusters. Spines were counted along ~540 ± 220 $\mu$m (mean ± SD) dendritic length per neuron. Similar results were obtained with two independent cultures, allowing us to pool the data. Dual immunostaining of mCherry-transfected neurons with anti-PSD-95 and anti-synapsin antibodies verified that in neurons at this stage, virtually all PSD-95 clusters located on spines were colocalized with the presynaptic marker synapsin. Images of neurons used to study RNAi effects were acquired and analyzed by investigators blind to the transfected constructs.

*Electron microscopy.* Free-floating brain sections were incubated in 10% GPi diluted in TBS for 1 h at room temperature to block nonspecific staining. Sections were then incubated overnight at 4°C in TBS containing 1% GPi and a primary antibody at a final protein concentration of 1–2 $\mu$g/ml. The sections were then labeled either by immunogold or by immunoperoxidase. For immunoperoxidase labeling, we followed the immunohistochemistry procedure, as described above (starting from the secondary antibody step). For immunogold labeling, sections were incubated for 3 h with goat anti-rabbit IgG coupled to 1.4 nm gold beads (Nanoprobes) diluted 1:300 in TBS containing 1% GPi. After several washes in PBS, the sections were postfixed in 1% glutaraldehyde diluted in the same buffer for 10 min. They were washed in double-distilled water, followed by silver enhancement of the gold particles with a HQ Silver kit (Nanoprobes).

The peroxidase-reacted sections and the gold–silver-labeled sections were processed for EM. This included treatment with osmium tetroxide (1% in 0.1 M PB), block staining with uranyl acetate, dehydration through a graded series of ethanol solutions, and flat embedding on glass slides in Durcupan (Fluka) resin. Regions of interest were cut at 70 nm on an ultramicrotome (Reichert Ultracut E; Leica) and collected on one-slot copper grids. Staining was performed on drops of 1% aqueous uranyl acetate, followed by Reynolds's lead citrate. EM images were acquired in a JEOL-1200 electron microscope with a digital camera (Veleta, SIS; Olympus) and analyzed with ImageJ. Measurements of gold particle counts along the radial and tangential coordinates of the spine cytoplasm were acquired and normalized as described by Rácz and Weinberg (2008). Briefly, normalized radial position, $r_N$ (the fraction of the distance from the center to the plasma membrane), was computed according to the following equation:

$$r_N = 1 - \frac{r_1}{r_1 + r_2},$$

where $r_1$ is the radial distance from the membrane to the particle and $r_2$ is the radial distance of the particle from the geometric center of the spine. To correct the radial distribution for distance-dependent increase in bin area, particle densities along the radial coordinate were divided by normalized radial distance, thus giving increased weight to particle density close to the spine center. Three-dimensional reconstruction of spine heads from serial section digital images was done using Reconstruct software (John C. Fiala, Department of Biology, Boston University, MA). For comparisons between wild-type and Chmp2b-deficient mice, acquisition of microscopy images and morphometric quantification were performed without knowledge of genotype.

*Purification of synaptoneurosomes and PSD fractionation.* Subcellular fractionation was performed according to Carlin et al. (1980) with minor modifications. Samples were kept at 4°C during all procedures. In brief, one rat forebrain was homogenized in 13 ml of ice-cold isotonic lysis buffer (0.32 M sucrose, 4 mM HEPES, pH 7.4, protease inhibitors [EDTA-free Complete; Roche Molecular)] using a Teflon-glass homogenizer (15 strokes). The homogenate was centrifuged at 1400 × $g$ for 10 min to remove nuclei. The postnuclear supernatant (S1) was spun down at 4°C for 10 min at 13,800 × $g$, yielding crude synaptosomes (pellet P2) and crude cytosol (supernatant S2). The P2 fraction was homogenized in lysis buffer and layered onto discontinuous sucrose density gradients (made of 3 ml each of 0.85, 1.0, and 1.2 M sucrose layers). The gradients were centrifuged at 82,500 × $g$ (27,000 rpm in a Beckman SW41 rotor) for 120 min, and the purified synaptoneurosome fraction (SYN) was collected at the 1.0–1.2 M interface. The synaptoneurosomes were resuspended in 5 vol of lysis buffer and spun down for 20 min at 150,000 × $g$. The pelleted synaptoneurosomes were resuspended in Triton buffer [50 mM HEPES, pH 7.4, 0.5% Triton X-100, protease inhibitors (EDTA-free Complete; Roche Molecular), 2 mM EDTA], stirred 30 min in the cold room, and centrifuged at 32,000 × $g$ for 20 min to obtain the PSDI pellet. PSDI was resuspended in 50 mM HEPES, pH 7.4. One-half of the suspension was solubilized again by adding 1 vol of 1% Triton X-100 and centrifuged at 200,000 × $g$ for 20 min, yielding pellet PSDII. The other half was solubilized by adding 1 vol of 6% Sarkosyl and centrifuged at 200,000 × $g$ for 1 h, yielding PSDIII.

*Gel filtration of synaptoneurosome extract.* Size-exclusion chromatography (gel filtration) was used for separation of Chmp2b-containing molecular assemblies that had been solubilized by mild detergent extraction from gradient-purified synaptoneurosomes. Chromatography was performed at 4°C on a 120 ml HiPrep Sephacryl S-300 HR column coupled to an Akta FPLC system (GE Heathcare). The column was equilibrated, and separation was achieved in 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 10 mM NaF, 10 mM $\beta$-glycerophosphate and protease inhibitors (Roche) at a flow rate of 0.5 ml/min. Synaptoneurosomes freshly prepared from one brain were resuspended in 3 ml of deoxycholate (DOC) buffer [10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, protease inhibitors (Complete; Roche Molecular), and phosphatase inhibitors (P0044; Sigma-Aldrich)]. The suspension was stirred by rotation at 4°C for 30 min and centrifuged at 100,000 × $g$ for 20 min. The supernatant was filtered (pore size, 0.2 $\mu$m; Millipore), and 2.5 ml was loaded on the column. Fractions (2 ml) were collected, and the elution profile was analyzed by immunoblotting and by measurement of total protein concentration with BCA protein assay (Pierce). The profile was calibrated by measuring the elution volume of protein standards in the same conditions (MWGF1000; Sigma-Aldrich).

*Immunoprecipitation.* For immunoprecipitation of the brain Chmp2b complex, 2 mg (total protein) of gradient-purified synaptoneurosomes were resuspended in 1 ml of DOC buffer and incubated for 30 min at 4°C. After centrifugation at 100,000 × $g$ for 20 min, the supernatant was collected and diluted with 3 vol of immunoprecipitation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 1% Triton X-100). The synaptosomal lysate was incubated for 2.5 h at 4°C with 15 $\mu$g of antibody that had been covalently coupled to superparamagnetic protein A beads (Dynabeads, 10001D; Invitrogen) by cross-linking with dimethylpimelimidate (Sigma) according to Harlow and Lane (1988). After ex-

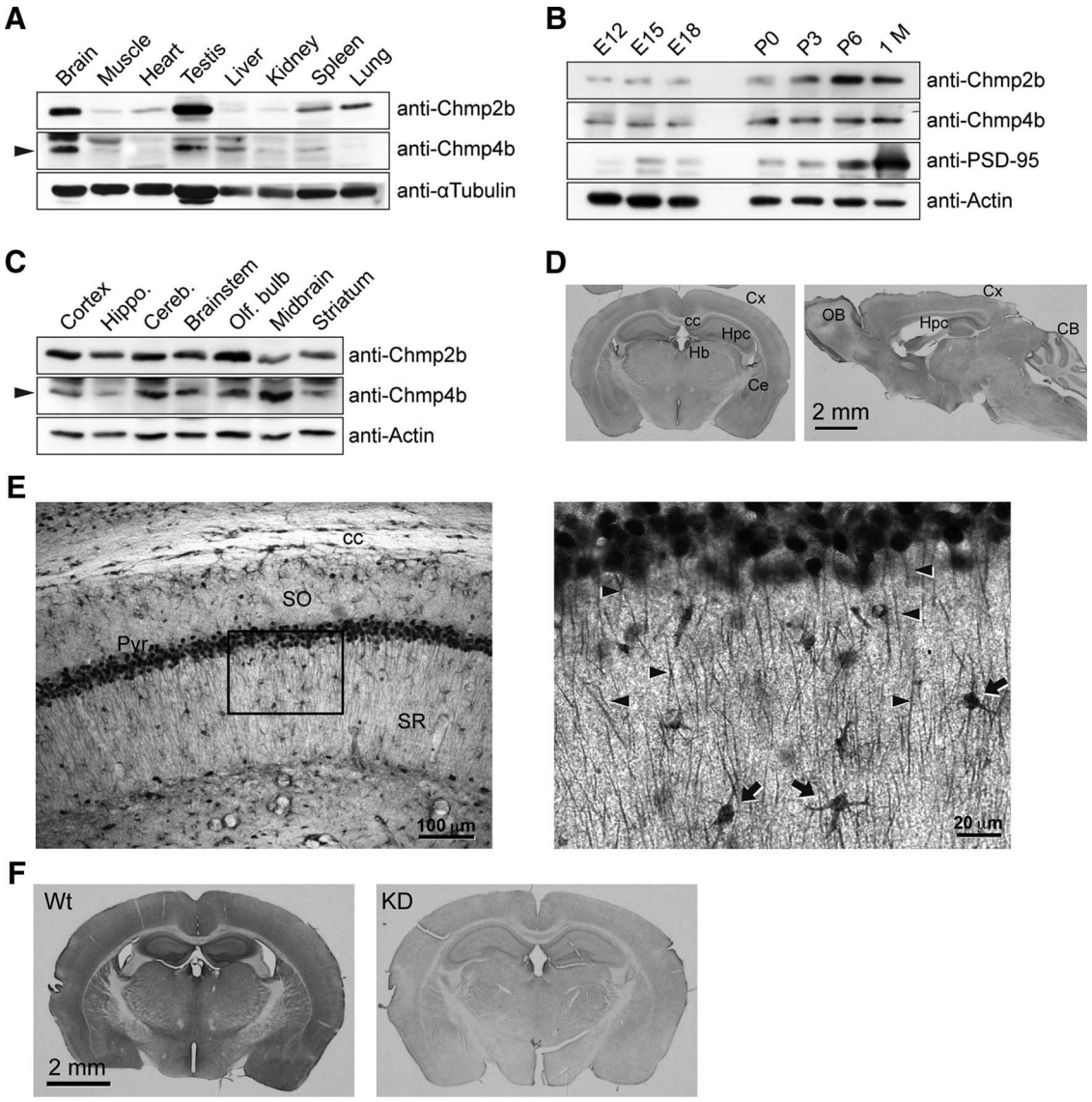



**Figure 1.** Chmp2b expression in the mouse brain. ***A***, An adult male mouse was dissected, and equal amounts of total protein from each tissue were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The arrowhead indicates the Chmp4b-specific band. α-Tubulin was used as the loading control. ***B***, Mouse brains at increasing developmental ages were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. PSD-95 was used as a marker of synaptogenesis. P, Postnatal age (days); 1 M, 1 month. ***C***, Equal protein amounts from the indicated regions of an adult mouse brain were analyzed by immunoblotting as above. ***D***, Frontal (left) or sagittal (right) sections from adult mouse brain were stained by immunoperoxidase with anti-Chmp2b antibody. Cx, Cortex; cc, corpus callosum; Hpc, hippocampus; Hb, habenula; Ce, central amygdala; OB, olfactory bulb; CB, cerebellum. ***E***, Left, Immunostained CA1 layer in a frontal section of the hippocampus. Note the strong staining of pyramidal cell bodies and the weaker but definite immunoreactivity of the neuropil. SO, Stratum oriens; Pyr, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum. Right, Higher magnification of the boxed region. Immunoreactivity is observed in apical dendrites (arrowheads) and interneurons (arrows). ***F***, Specificity of Chmp2b immunostaining. As a control, we used brain sections from Chmp2b KO mice (Ghazi-Noori et al., 2012), here called Chmp2b KD because of the presence of residual Chmp2b protein in these mice (Fig. 7*G*,*H*). Chmp2b immunoreactivity was revealed by immunoperoxidase in a frontal section of the brain of a 5-week-old wild-type (Wt) mouse (left) or in an equivalent section of a sibling KD mouse (right). Note that development of DAB staining was performed identically for the two sections, but for a longer time than in ***D***, which therefore appears lighter than ***F*** (Wt).

tensive washing in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.25% sodium deoxycholate, and 0.75% Triton X-100, together with increasing concentrations of NaCl (150–500 mM), bound proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer, resolved by SDS-PAGE, and blotted onto PVDF membranes (Millipore). For samples first resolved by gel filtration, fractions of interest were pooled and immunoprecipitated under the same conditions.

For immunoprecipitation of tagged proteins, transfected HEK-293T were washed with PBS and homogenized in isotonic lysis buffer, and the lysate was centrifuged at 1000 × *g* for 10 min. The postnuclear supernatant was centrifuged at 50,000 × *g* for 1 h, and the pelleted membranes were resuspended in DOC buffer. Immunoprecipitation was performed with anti-tag antibody immobilized on protein A Dynabeads as above.

*Immunoblotting.* Cells or tissue lysates were resuspended in Laemmli buffer and resolved by SDS-PAGE in 8–12% polyacrylamide gels. Proteins were electrotransferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked for 30 min in TBS containing 0.1% Tween 20 and 5% dry milk and incubated for 1 h with primary antibodies diluted in the blocking solution. After six washes in TBS–Tween, the membranes were further incubated for 30 min with secondary antibodies coupled to HRP, washed six more times as before, and incubated with luminescence-generating HRP substrate, and bound antibodies were revealed by luminography on film.

*Mass spectrometry analysis.* A DOC extract from gradient-purified synaptoneurosomes was fractionated by gel filtration, and the high-molecular-weight (HMW) fractions were pooled and immunoprecipitated with control or anti-Chmp2b antibody. Two other, independently prepared

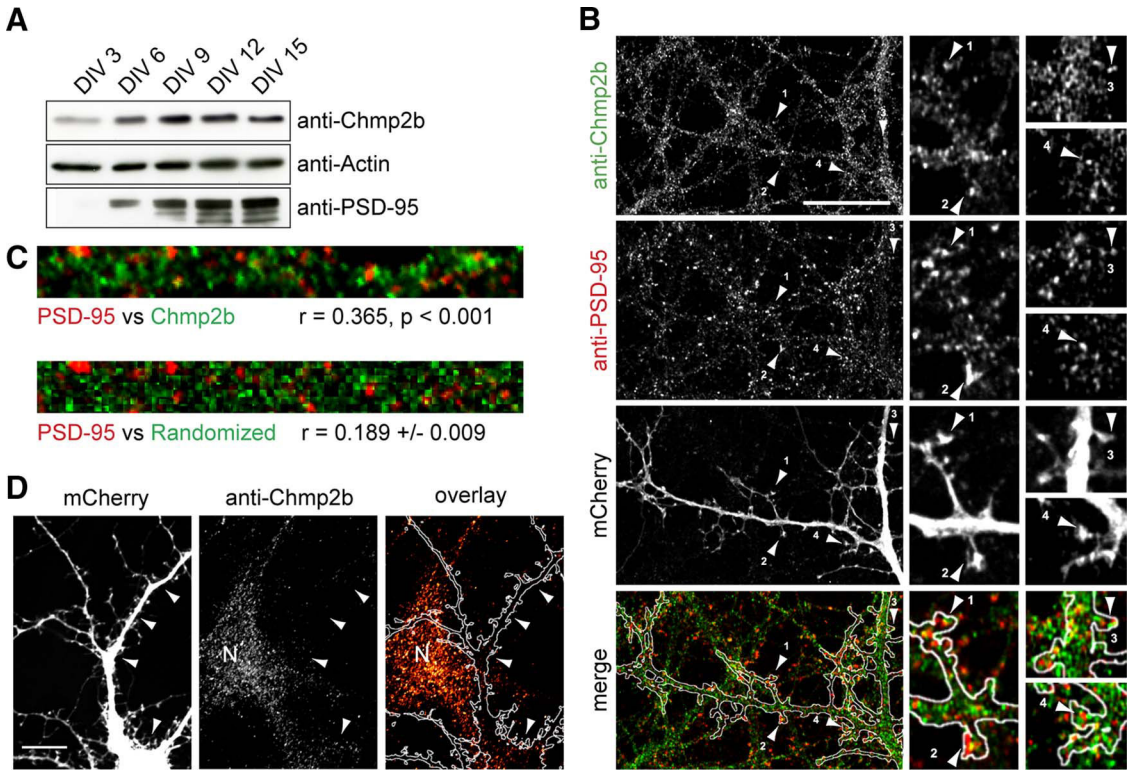



**Figure 2.** Chmp2b forms clusters in dendrites. ***A***, Cultured mouse cortical neurons were lysed at various stages of maturation, and equal amounts of lysate protein were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. PSD-95 was used as a marker for synaptogenesis. ***B***, Hippocampal neurons were transfected with empty pSuper-mCherry vector, fixed at 21 DIV, and stained by dual immunofluorescence with anti-Chmp2b and anti-PSD-95 antibodies. Left, Punctate staining of a dendritic segment in a transfected neuron (single confocal plane). Staining of nontransfected cells is also visible. Merge, Overlap (yellow) between Chmp2b and PSD-95 puncta, in dendritic shafts and spines, visualized with mCherry (white contour). The numbered arrowheads indicate spines with colocalized puncta. Right, Enlarged views of the same spines. Scale bar, 20 $\mu$m. ***C***, Top, Dendritic segment double stained by anti-Chmp2b and anti-PSD-95. Bottom, Same after randomization of Chmp2b staining pattern. The correlation coefficient ($r$) between actual Chmp2b and PSD-95 staining intensities is significantly higher than the mean $r$ value generated by randomized Chmp2b patterns ($p < 0.0001$, $z$ test). ***D***, Specificity of Chmp2b immunofluorescence. Hippocampal neurons were transfected with pSuper-mCherry expressing Chmp2b-specific shRNA, stained by immunofluorescence with anti-Chmp2b, and imaged by confocal microscopy. Left, Representative transfected neuron, visualized by mCherry. Middle, Chmp2b immunostaining of the same field. Arrowheads indicate the position of the transfected cell dendrites and soma. N, Neighboring, nontransfected neuron. Right, Immunostaining (red hot pseudocolor) is mostly absent from the transfected neuron (outlined in white), though clearly detectable in the nontransfected cell (N). Scale bar, 10 $\mu$m.

synaptoneurosome extracts were directly immunoprecipitated with the same antibodies. The three pairs of immunoprecipitates were digested, and the resulting peptides were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as described further below. In each of the three experiments, peptides derived from control and anti-Chmp2b immunoprecipitates were analyzed in consecutive LC-MS/MS runs performed on the same day.

For protein digestion, proteins in Laemmli buffer were stacked (2 mm) on SDS-PAGE gels (4–12% NuPAGE gels; Invitrogen) before being stained with Coomassie blue R-250 (Bio-Rad). The gel band was manually excised and cut in pieces before being washed by six successive incubations of 15 min in 25 mM $NH_4HCO_3$ and in 25 mM $NH_4HCO_3$ containing 50% (v/v) acetonitrile. Gel pieces were then dehydrated with 100% acetonitrile and incubated for 45 min at 53°C with 10 mM DTT in 25 mM $NH_4HCO_3$ and for 35 min in the dark with 55 mM iodoacetamide in 25 mM $NH_4HCO_3$. Alkylation was stopped by adding 10 mM DTT in 25 mM $NH_4HCO_3$ and mixing for 10 min. Gel pieces were then washed again by incubation in 25 mM $NH_4HCO_3$ before dehydration with 100% acetonitrile. A total of 0.15 $\mu$g of modified trypsin (sequencing grade; Promega) in 25 mM $NH_4HCO_3$ was added to the dehydrated gel pieces for an overnight incubation at 37°C. Peptides were then extracted from gel pieces in three 15 min sequential extraction steps in 30 $\mu$l of 50% acetonitrile; 30 $\mu$l of 5% formic acid; and, finally, 30 $\mu$l of 100% acetonitrile. The pooled supernatants were then dried under vacuum.

For nano-LC-MS/MS analyses, the dried extracted peptides were resuspended in 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and analyzed by on-line nano-LC-MS/MS [Ultimate 3000 (Dionex) and LTQ-Orbitrap Velos pro (Thermo Fisher Scientific)]. Peptides were sampled on a 300 $\mu$m × 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75 $\mu$m × 250 mm C18 column (PepMap; Dionex). The nano-LC method consisted of a 120 min gradient at a flow rate of 300 nl/min, ranging from 5 to 37% acetronitrile in 0.1% formic acid for 114 min before reaching 72% for the last 6 min. MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Spray voltage and heated capillary were, respectively, set at 1.4 kV and 200°C. Survey full-scan MS spectra ($m/z$ = 400–1600) were acquired in the Orbitrap with a resolution of 60,000 after accumulation of $10^6$ ions (maximum filling time, 500 ms). The 20 most intense ions from the preview survey scan delivered by the Orbitrap were fragmented by collision-induced dissociation (collision energy, 35%) in the LTQ after accumulation of $10^4$ ions (maximum filling time, 100 ms).

For bioinformatic analyses, data were processed automatically using Mascot Daemon software (version 2.3.2; Matrix Science). Concomitant searches against the Uniprot database (August 2012 version, Rattus taxonomy, 42,469 sequences), the classical contaminants database (67 sequences, homemade), and the corresponding reversed databases were performed using Mascot (version 2.4). ESI-TRAP was chosen as the instrument and trypsin/P as the enzyme, and two missed cleavage were allowed. Precursor and fragment mass error tolerances were set, respectively, at 10 ppm and 0.6 Da. Peptide modifications allowed during the search were carbamidomethyl (C, fixes) acetyl (N-ter, variable), oxidation (M, variable), and deamidation (NQ, variable). The IRMa software (version 1.30.4) was used to filter the results: conservation of rank 1 peptides, peptide identification False Discovery Rate < 1% (as calculated by using the reverse database strategy), and minimum of one specific peptide per identified protein group. The filtered results were uploaded into a relational mass spectrometry identification database (MSIdb), and

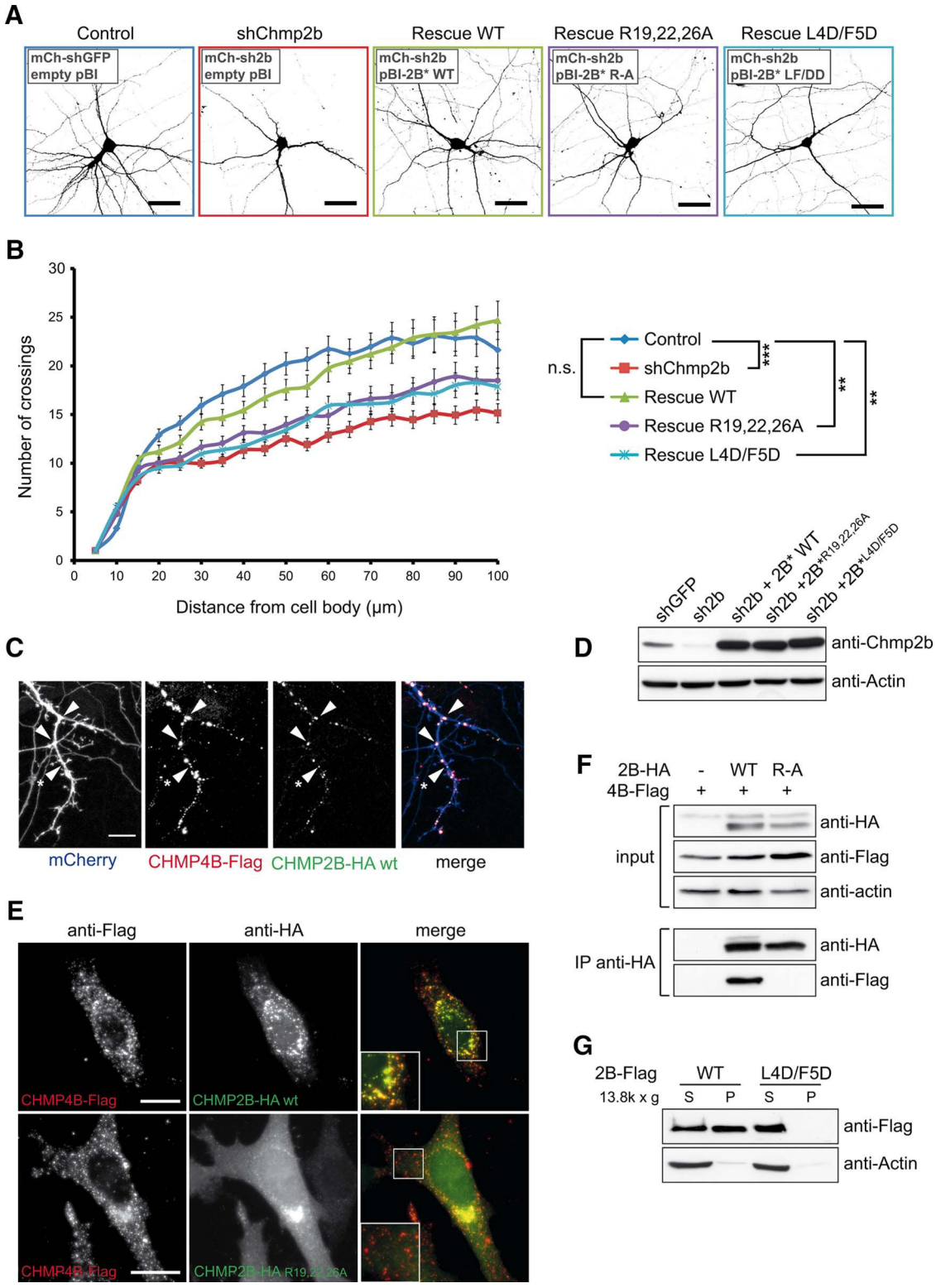



**Figure 3.** Chmp2b regulates dendritic morphology in an ESCRT-III-dependent manner. ***A***, Hippocampal neurons were cotransfected at 10 DIV with the indicated mixtures of pSuper-based and rescue (pBI-based) plasmids. pSuper vectors expressed mCherry together with the indicated shRNA [GFP shRNA (shGFP); Chmp2b shRNA (shChmp2b or sh2b)]. Rescue plasmids expressed ZsGreen, alone or together with the indicated version of RNAi-resistant Chmp2b (2B*). Images of doubly transfected neurons at 14 DIV were acquired by confocal microscopy. Depicted is the morphology of representative neurons in each condition, as visualized by mCherry fluorescence (negative contrast, maximum intensity projections). ***B***, Sholl analysis of dendritic arborization in neurons transfected as in ***A***. For each plasmid mix, the graph shows mean numbers of dendritic branches as a function of radial distance ($n = 40$ neurons per condition). Chmp2b knockdown strongly reduced the distance-dependent increase in branch number (***$p = 0.00014$ compared with control curve, Kolmogorov–Smirnov test with Bonferroni's correction). Expression of wild-type Chmp2b* restored the control phenotype ($p = 1$). Chmp4b-binding-defective (Chmp2b*$^{R19/22/26A}$) and membrane-binding-defective (Chmp2b*$^{L4D/F5D}$) mutants of Chmp2b were unable to fully restore the control phenotype (**$p = 0.004$ and $p = 0.006$, respectively). ***C***, Hippocampal neurons were triply cotransfected at 10 DIV with HA-tagged Chmp2b$^{WT}$, Flag-tagged Chmp4b, and mCherry plasmids (1 $\mu$g of each plasmid). The cells were fixed 24 h later and stained by dual immunofluorescence with anti-HA and anti-Flag antibodies. Confocal microscopy images (*z*-projections) of dendritic fluorescence are shown for a representative neuron. Chmp2b was recruited to Chmp4b puncta, some of which were found at dendritic branch points (arrowheads) or at the (*Figure legend continues.*)

a homemade tool (hEIDI; Milbradt et al., 2014) was used for the compilation, grouping, and comparison of the protein groups from the different samples. hEIDI provides modules to help exploring validated search results that have been compiled into a MSIdb. The user creates contexts, which represent sets of identifications, and runs peptides and proteins grouping algorithms to cluster peptides identifying a family of proteins in these contexts. The grouping algorithm will first identify identical peptides based on their mass and sequence. Groups of proteins matching the same set of peptides are then created as is done in the IRMa toolbox for a single identification. This is typically useful to consider results at the sample level instead of the replicate level. To compare several contexts, hEIDI aligns each protein group from each context to be compared. This alignment is based on protein and peptide set similarity metrics.

To be considered as specifically associated with the Chmp2b immunoprecipitate, the proteins identified by this analysis were filtered according to the following inclusion criteria: two or more unique peptides (specific spectral counts); two or more distinct protein fragments [spectral counts (SC)]; and ratio of SC in specific to control immunoprecipitate (SC 2B/SC control) ≥5.

*Electrophysiological recordings in cultured neurons.* Mature [18–21 d *in vitro* (DIV)] hippocampal neurons expressing the transfection marker ZsGreen were used for whole-cell patch-clamp recording at room temperature (20–24°C). The neurons were continuously perfused with an extracellular solution containing 140 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 3 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 0.5 μM tetrodotoxin, 50 μM bicuculline methiodide, and 1 μM strychnine, adjusted to pH 7.4 with NaOH and to 330 mOsm with Na-acetate. To induce LTP, glycine (200 μM in extracellular solution) was perfused for 3 min onto the neurons (Lu et al., 2001). For the experiments in which NMDA current amplitudes were measured, NMDA (100 μM) was added to this solution and perfused with a fast-exchange perfusion system. Recording pipettes were pulled from borosilicate glass and had a resistance of 3–5 ΩM when filled with a solution containing (in mM) 115 $CsMeSO_3$, 20 CsCl, 10 HEPES, 0.6 EGTA, 4 $Na_2$-ATP, 0.4 Na-GTP, 10 Na-phosphocreatine, and 2.5 $MgCl_2$, adjusted to pH 7.2 with CsOH and to 300 mOsm with Cs-acetate. Currents were recorded from a holding potential of −60 mV using an Axon 200B amplifier (Molecular Devices). Cell capacitance and series resistance compensation were applied electronically. Signals were filtered at 1 kHz, digitized at 5 kHz, and recorded using the pClamp software. Miniature EPSCs (mEPSCs) and NMDA-evoked currents were analyzed using ClampFit (Molecular Devices).

*Live imaging.* Image acquisition and analysis were performed blind to transfected plasmids. For live imaging during chemical LTP, neurons were transferred to a perfusion chamber (Pocon), washed, and kept in an extracellular solution (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, 33 mM glucose, 50 μM bicuculline, and 0.5 μM TTX, 1 μM strychnine, pH 7.4) at 37°C on a heated stage. Neurons that simultaneously expressed GFP and mCherry (within the same fluorescence range throughout experiments) and had a healthy appearance were identified by epifluorescence, and dendritic segments were selected so that 30–100 spines could be imaged per neuron while minimizing exposure to light. mCherry fluorescence was excited with 75–150 μW nominal laser power at 561 nm. The pinhole diameter was set to 1 Airy unit. *Z*-stacks of 20–30 optical sections (voxel size, 0.11 × 0.11 × 0.2 $\mu m^3$) per dendritic segment were acquired at 15 min intervals. Signal per pixel was averaged over two scans. After acquiring baseline images, an extracellular solution containing 200 μM glycine (warmed to 37°C by in-line heating) was delivered. Stimulation was stopped after 4 min by perfusing a warm glycine-free extracellular solution. Only modest bleaching was observed during the experiment. Cells showing signs of damage (pearling or blebbing) were discarded.

To measure changes in spine volume, image stacks were subjected to blind (adaptive) deconvolution with AutoQuant as above. The deconvolved images (scaled to 8 bit) were used as input for 3D reconstruction of dendritic morphology by the software package NeuronStudio (http://www.mssm.edu/cnic/tools.html), which allocates voxels to spines through a specific algorithm (Rodriguez et al., 2006, 2008). Individual spines labeled by the software and that were clearly identifiable at both initial and final time points were manually selected. The volume of the spines before and after stimulation was estimated by counting spine voxels. The fractional increase in spine volume was calculated for each spine as follows:

$$\frac{\Delta V}{V} = \frac{V_f - V_i}{V_i},$$

with $V_i$ the volume at 5 min before the start of the stimulation and $V_f$ the volume at 45 min after the end of the stimulation. The median values of $\Delta V/V$ were calculated for each neuron. Differences between cultures did not significantly contribute to the observed effects (two-way ANOVA, $p = 0.015$ for factor plasmid, $p = 0.93$ for factor culture, $p = 0.56$ for interaction). Therefore, the results from seven independent cultures were pooled.

*Statistical analysis.* The statistical significance of differences between sample means or sample distributions was calculated as described in the figure legends. The normality of samples was systematically checked by the Shapiro-Wilks test, and nonparametric tests were used where appropriate. Statistical tests were performed with R (R Core Team, 2013). Error bars indicate SEM in all figures.

## Results

### A pool of Chmp2b localizes in dendritic shafts and spines

To address the physiological function of Chmp2b in neurons, we first evaluated the relative level of Chmp2b protein in the brain compared with that in other organs. Mouse tissue extracts were analyzed by Western immunoblotting with an anti-Chmp2b antibody. The same blots were also probed with an antibody raised against the core ESCRT-III subunit Chmp4b. For both proteins, expression was strikingly higher in the brain than in the other organs, except for testes (Fig. 1*A*). Analysis of mouse brain at various stages of development indicated that Chmp2b expression increased during the first postnatal week (Fig. 1*B*). Both Chmp2b and Chmp4b were detected in extracts from various regions of the adult brain, with the highest Chmp2b levels found in olfactory bulb and cerebral cortex (Fig. 1*C*).

To define the topographical pattern of Chmp2b protein expression, we performed immunohistochemistry on mouse brain sections (Fig. 1*D*). Chmp2b immunoreactivity was particularly strong in habenula, olfactory bulb, deep layers of the neocortex, amygdala, and hippocampus. This pattern generally coincided with *in situ* hybridization data from the Allen Brain Atlas (http://mouse.brain-map.org/gene/show/44784). In higher-magnification views, immunostaining was evident in the somatodendritic compartment of numerous neurons (e.g., in the CA1 region of the hippocampus; Fig. 1*E*). Specificity of labeling was confirmed by showing reduced staining in the brain of Chmp2b-deficient (KD) mice (Fig. 1*F*).

←

(*Figure legend continued.*) base of spine-looking protrusions (asterisk). Scale bar, 10 μm. ***D***, N2A cells were transfected with the indicated combinations of RNAi-inducing plasmids and rescue plasmids. The cells were lysed and analyzed by immunoblotting with anti-Chmp2b antibody. ***E***, HeLa cells were cotransfected with HA-tagged $Chmp2b^{WT}$ or $Chmp2b^{R19/22/26A}$ together with Chmp4b-Flag. Cells were stained by dual immunofluorescence with anti-HA and anti-Flag antibodies and imaged by confocal microscopy. Insets, High magnification of the boxed regions. Scale bars, 20 μm. Colocalization of Chmp2b and Chmp4b was 80% for $Chmp2b^{WT}$ and 12% for $Chmp2b^{R19/22/26A}$ (quantified as the percentage of Chmp2b-HA-positive pixels overlapping Chmp4b-Flag puncta). ***F***, HEK-293T cells were transfected with Flag-tagged Chmp4b plasmid, alone or together with HA-tagged $Chmp2b^{WT}$ or $Chmp2b^{R19/22/26A}$. Anti-HA immunoprecipitates prepared from the transfected cells were analyzed by immunoblotting with anti-Flag or anti-HA antibodies. ***G***, HEK-293T cells were transfected with Flag-tagged $Chmp2b^{WT}$ or $Chmp2b^{L4D/F5D}$. The transfected cells were homogenized, the membrane (P) and cytosolic (S) fractions were separated by centrifugation, and equivalent amounts of each fraction were analyzed by immunoblotting with anti-Flag antibody.

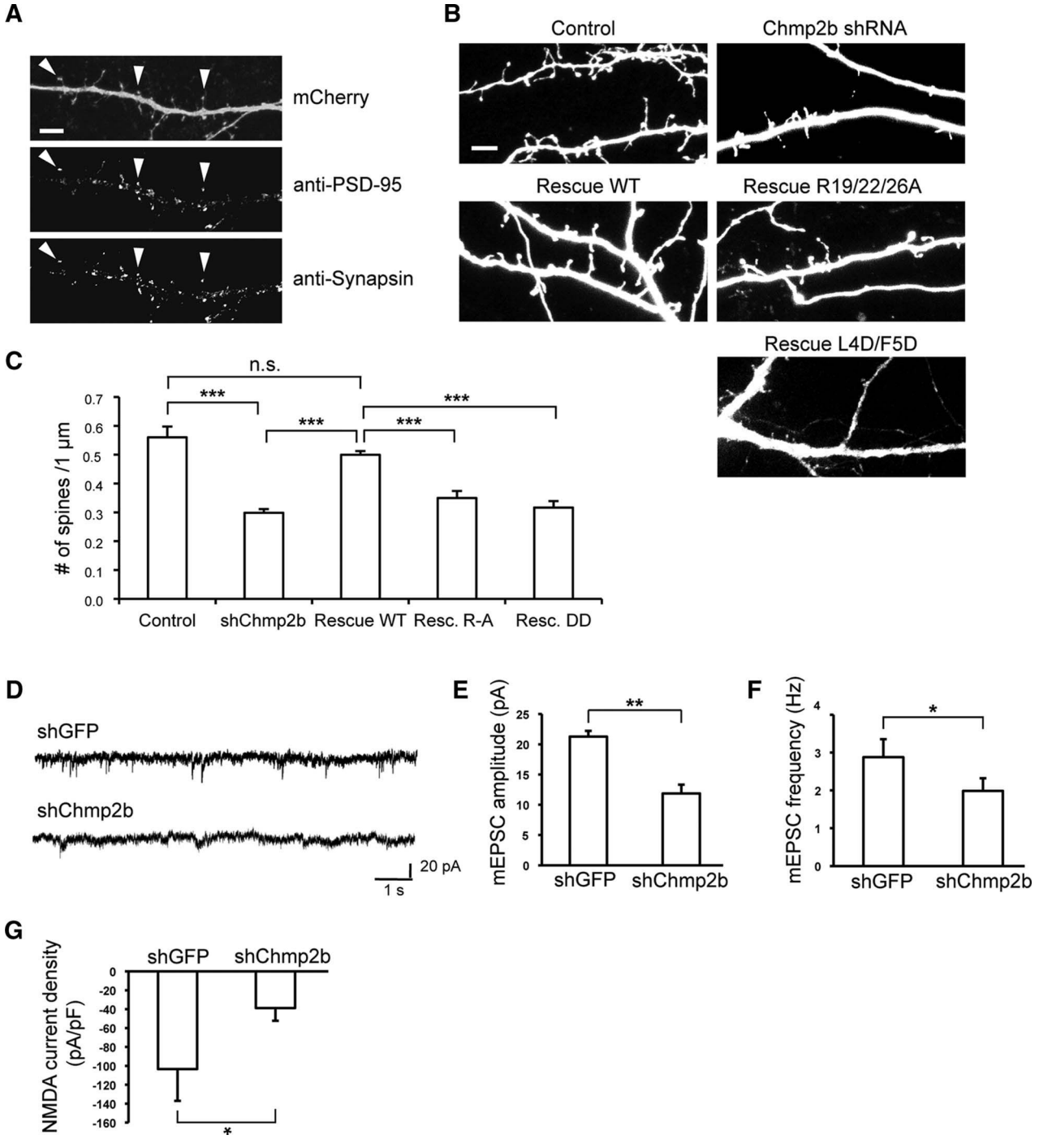



**Figure 4.** Chmp2b is involved in the maintenance of excitatory synapses in cultured neurons. ***A***, Hippocampal neurons were transfected at 16 DIV with pSuper-mCherry encoding control (GFP) shRNA. The neurons were fixed at 18 DIV, stained by dual immunofluorescence with anti-PSD-95 and anti-synapsin I antibodies, and dendrites were imaged by confocal microscopy. Postsynaptic spines (arrowheads) were identified as dendritic protrusions (top) containing PSD-95 puncta (middle). Nearly all of the spines colocalized with the presynaptic marker Synapsin (bottom). mCherry fluorescence was used as a mask to facilitate visualization of puncta belonging to the transfected neuron. Scale bar, 15 $\mu$m. ***B***, Neurons were transfected at 16 DIV with the same plasmid combinations as in Figure 3*A*. Images of dendritic morphology were acquired, and postsynaptic spines were identified as in ***A*** and counted. A representative field is shown for each condition. Scale bar, 5 $\mu$m. ***C***, Mean density of postsynaptic spines along the dendrites of neurons transfected as in ***B***. Compared with the control (GFP) shRNA, the Chmp2b-depleting shRNA induced a large drop in spine density (***$p = 2.4 \times 10^{-11}$, two-sided Wilcoxon test with Holm correction). Coexpressing wild-type Chmp2b* completely restored density ($p = 1$ vs control, ***$p = 6.3 \times 10^{-14}$ vs Chmp2b shRNA alone). Coexpressing the Chmp4b binding-defective mutant Chmp2b*$^{R19/22/26A}$ did not rescue spine density at all (***$p = 3.8 \times 10^{-6}$ vs Chmp2b*$^{WT}$, $p = 0.14$ vs Chmp2b shRNA alone); neither did the membrane binding-defective mutant Chmp2b*$^{L4D/F5D}$ (***$p = 2.9 \times 10^{-7}$ vs Chmp2b$^{WT}$, $p = 1$ vs Chmp2b shRNA alone). Neurons per condition: control, $n = 34$; Chmp2b shRNA, $n = 33$; Chmp2b*$^{WT}$, $n = 30$; Chmp2b*$^{R19/22/26A}$, $n = 16$; Chmp2b*$^{L4D/F5D}$, $n = 14$. ***D–F***, Hippocampal neurons were transfected at 18 DIV with the indicated plasmids. Transfected neurons were identified by fluorescence at 21 DIV, and their miniature EPSCs were measured by patch-clamp recordings in whole-cell configuration. ***D***, Sample traces from neurons transfected as indicated. ***E***, Histogram of mean mEPSC amplitudes in neurons transfected as indicated ($n = 5$ cells, >100 minis per cell in each condition). The amplitude of mEPSCs was markedly reduced in Chmp2b-deficient neurons (**$p = 0.005$, two-sided *t* test). ***F***, Histogram of mean mEPSC frequencies in neurons transfected as indicated. Frequencies were lower in Chmp2b-deprived neurons (*$p = 0.012$, two-sided *t* test). ***G***, Neurons transfected as above were stimulated at 21 DIV by bath-applied NMDA (control, $n = 6$ cells; Chmp2b shRNA, $n = 5$ cells). The density of NMDA-evoked currents (calculated as current normalized by capacitance) was strongly decreased in Chmp2b-deprived neurons (*$p = 0.031$, two-sided *t* test).

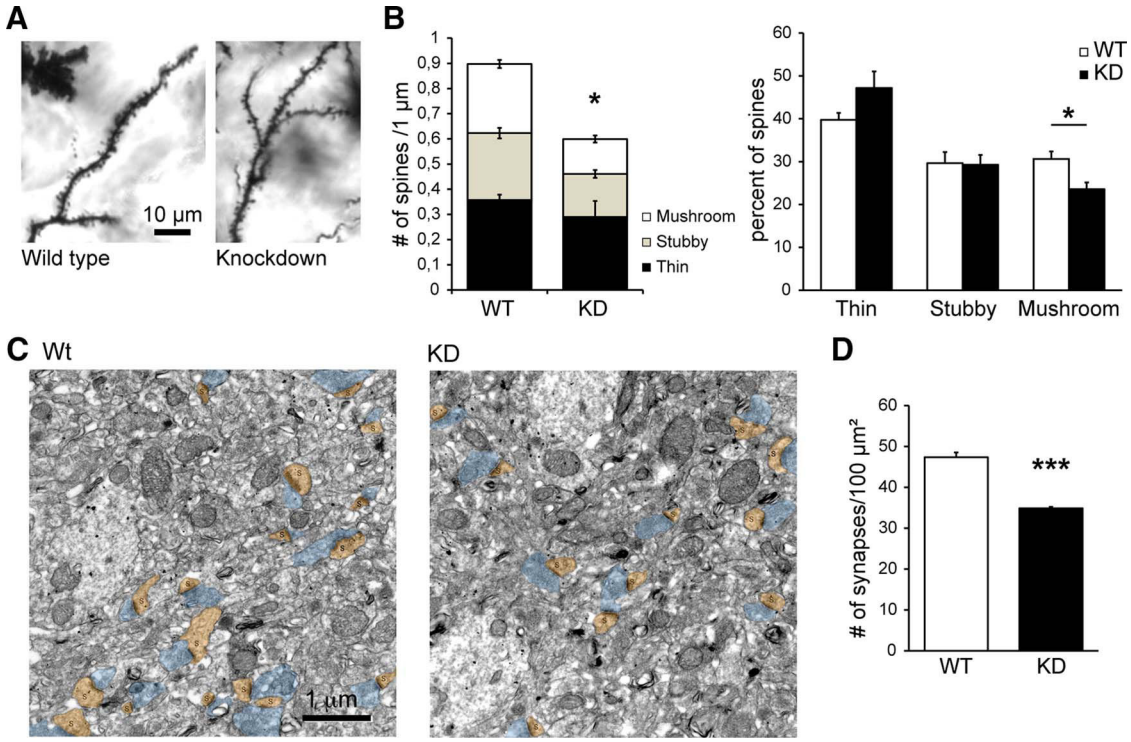



**Figure 5.** Chmp2b is involved in the maintenance of excitatory synapses *in vivo*. ***A***, Brain sections from 5-week-old Chmp2b knockdown mice (KD) or sibling controls (Wild type) were stained by the Golgi impregnation technique. Stained dendritic segments were visualized by bright-field microscopy of the stratum radiatum. Shown are representative images of dendritic shafts and spines in both genotypes. ***B***, Spines were classified into thin, stubby, or mushroom types, and their density per unit dendritic length was measured for each type ($n = 4$ animals, 36 dendrites per genotype). Left, Histogram showing the mean density of each spine type in KD and WT mice. The total spine density was significantly lower in KD mice than in controls (*$p = 0.039$, two-sided *t* test). Right, Histogram showing the mean proportion of the three spine types. The percentage of mushroom spines was significantly reduced in the KD mice (*$p = 0.02$). ***C***, Representative electron micrographs of the CA1 stratum radiatum from Wt and KD siblings. Presynaptic profiles are highlighted in blue, and postsynaptic spines (s) are in brown. ***D***, Quantification of synapse density in the electron micrographs. WT: $n = 3$ animals, 851 axo-spinous synapses from 30 micrographs; KD: $n = 3$ animals, 627 axo-spinous synapses from 30 micrographs. The density of postsynaptic spines per unit surface was significantly lower in the KD (***$p = 0.0008$).

Chmp2b was also readily detectable in primary cultures of rat neurons. Consistent with the developmental profile shown in Figure 1*B*, immunoblotting analysis of cultured hippocampal (Belly et al., 2010) or cortical (Fig. 2*A*) neurons showed that endogenous Chmp2b expression steadily increased during neuronal maturation, reaching a plateau after 9 DIV, thus overlapping the period of synapse formation. As already observed in non-neuronal cells, immunofluorescent staining of mature hippocampal neurons revealed Chmp2b immunoreactivity throughout the entire cytoplasm. However, focusing on dendrites, we noted that Chmp2b staining formed numerous small clusters, many of which were found at the base, neck, and head of dendritic spines. Within spine heads, Chmp2b clusters were often juxtaposed to PSDs labeled with anti-PSD-95 antibody (Fig. 2*B*). The overlap of Chmp2b with PSD-95 puncta was significantly more frequent than expected by random superposition (Fig. 2*C*). The specificity of synaptic staining with the anti-Chmp2b antibody was confirmed by extinction with a well validated shRNA construct (Belly et al., 2010; Fig. 2*D*).

### Chmp2b regulates the stability of dendritic branches

After these observations, we used cultured hippocampal neurons to examine whether Chmp2b played a role in the maintenance of dendrites and synapses. For this, neurons were transfected with the same Chmp2b-depleting shRNA as above. Control transfections were performed with a GFP-specific shRNA with no effect on neurons (Alvarez et al., 2006). The shRNA vectors also expressed mCherry, allowing visualization of the cellular morphology. To assess the effect of Chmp2b depletion on dendrite branching, neurons were transfected at 10 DIV and imaged at 14 DIV by confocal microscopy. As shown in Figure 3, *A* and *B*, dendritic branching was reduced in Chmp2b-depleted neurons compared with neurons transfected with control shRNA. Coexpression of an RNAi-resistant version of the Chmp2b mRNA together with the shRNA almost fully rescued dendritic complexity. These data indicate that Chmp2b is required for maintaining the integrity of dendritic trees.

In non-neuronal settings, Chmp2 proteins are known to interact with Chmp4 for formation of biologically active ESCRT-III (Morita et al., 2011). Consistent with such an interaction, we observed that when coexpressed in neurons at 10 DIV, epitope-tagged Chmp2b and Chmp4b colocalized into puncta distributed along the dendrites (Fig. 3*C*). Chmp2b/Chmp4b puncta were repeatedly found at dendritic branch points or at the base of dendritic protrusions. We then tested whether the effect of Chmp2b on dendrite branching depended on its ability to bind to endogenous Chmp4b. For this, we designed a Chmp2b point mutant deficient for binding to Chmp4b. Morita et al. (2011) showed that binding of Chmp4b to the close Chmp2b homolog Chmp2a depends on three arginine residues in the Chmp2a N terminus. Based on sequence alignment with Chmp2a, we replaced arginine residues 19, 22, and 26 of Chmp2b by alanine. We demonstrated that, unlike $Chmp2b^{WT}$, $Chmp2b^{R19/22/26A}$ failed to colocalize with Chmp4b in the cell cytoplasm and to coimmunoprecipitate with Chmp4b in cell lysates (Fig. 3*D–F*). Thus, $Chmp2b^{R19/22/26A}$ is unable to interact with Chmp4b.

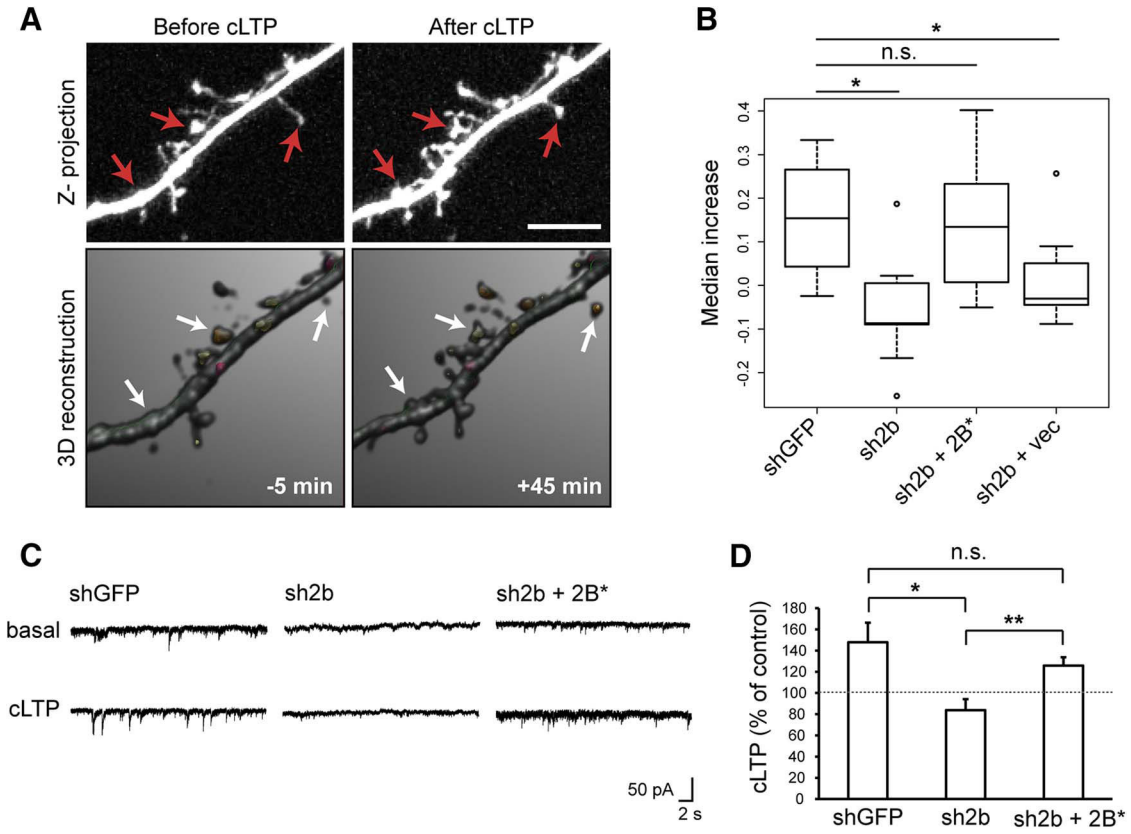



**Figure 6.** Chmp2b is required for stable increase in spine volume and in synaptic efficacy during chemical LTP. ***A***, ***B***, Hippocampal neurons were transfected with pSuper-mCherry and rescue plasmids. Confocal image stacks of dendritic segments (visualized by mCherry fluorescence) were acquired before and after induction of cLTP. 3D models of dendritic morphology were built from the stacks with NeuronStudio and used to measure changes in spine volume. ***A***, Maximal intensity projection of confocal images (top) and 3D models (bottom) of a representative dendritic segment before and after cLTP in a neuron transfected with control plasmid. Arrows indicate spines that have expanded. ***B***, The percentage increase in spine volume was measured for each stable spine of a segment 5 min before and 45 min after cLTP induction, and median increases were calculated per transfected neuron. The box plot shows the distribution of median increases in neurons transfected as indicated ($n = 8–9$ neurons per condition, 50–100 spines per neuron). vec, Vector expressing GFP alone. The spines of control neurons were significantly expanded after cLTP induction ($p = 0.0075$, Wilcoxon one-sample test). The increase was abolished by Chmp2b knockdown ($^*p = 0.011$ compared with control, Wilcoxon test with Holm correction) and reinstated by expression of Chmp2b* ($p = 0.336$ compared with control), but not by GFP alone ($p = 0.041$ vs control). ***C***, ***D***, Hippocampal neurons were transfected at 18 DIV with the indicated plasmids and cLTP was induced as in ***A***. mEPSCs were recorded before and after cLTP induction by patch-clamp recording in the whole-cell configuration. ***C***, Sample traces obtained before and after cLTP in neurons transfected as indicated. ***D***, The histogram shows the relative potentiation of mEPSCs (mean percentage increase per neuron) compared with the mean amplitude before cLTP. The dotted line indicates 100% of basal amplitude (mean mEPSC amplitude before LTP). LTP was abolished in Chmp2b-deprived neurons ($^*p = 0.033$ compared with control, Holm-corrected *t* test). Expression of Chmp2b* rescued LTP ($p = 0.046$ compared with basal amplitude in the same cells, paired *t* test; $^{**}p = 0.0062$ vs nonrescued cells; $p = 0.34$ vs control cells, two-sided *t* tests). Control, $n = 5$ cells; Chmp2b shRNA plus vector, $n = 11$ cells; Chmp2b shRNA plus Chmp2b$^{*\,WT}$, $n = 9$ cells.

In Chmp2b-depleted neurons, Chmp2b$^{R19/22/26A}$ was much less efficient than Chmp2b$^{WT}$ for restoring dendritic complexity (Fig. 3*B*), suggesting that Chmp2b activity in dendrite morphogenesis depends on its capacity to bind to Chmp4b. A second point mutant, Chmp2b$^{L4D/F5D}$, was also tested in dendrite branching assays (Fig. 3*B*). The L4D/F5D mutation prevents recruitment of the protein to the plasma membrane (Fig. 3*G*) and abolishes the ability of Chmp2b to deform the plasma membrane when overexpressed (Bodon et al., 2011). We found that Chmp2b$^{L4D/F5D}$ was severely deficient in the dendrite rescue assay, suggesting that the contribution of Chmp2b to dendrite branching correlates with its membrane-deforming potential. Together, the results show that Chmp2b regulates dendrite morphogenesis in a way correlated with its capacity to bind to Chmp4b, thereby suggesting a role for ESCRT-III complexes in this process.

### Chmp2b is required for maintenance of synapse density *in vitro* and *in vivo*

We previously showed that Chmp2b depletion impaired the morphological maturation of dendritic spines in young cultured neurons (transfected at 10 DIV; Belly et al., 2010). To investigate the contribution of Chmp2b to the maintenance of mature postsynaptic spines, neurons were transfected at 16 DIV with control or Chmp2b-targeting shRNA plasmid, together with control or Chmp2b rescue vector. Two days later, the neurons were fixed, and spines were labeled by immunofluorescence with anti-PSD-95 antibody. Transfected neurons were then imaged by confocal microscopy, and postsynaptic spines were counted (Fig. 4*A*). In neurons transfected with the Chmp2b-depleting construct, the density of postsynaptic spines along the dendrites was reduced to 53% of that in control neurons (Fig. 4*B*,*C*). Coexpression of RNAi-resistant Chmp2b$^{WT}$ restored spine density to 89% of the control value. In contrast, replacing Chmp2b$^{WT}$ with either the Chmp2b$^{R19/22/26A}$ or the Chmp2b$^{L4D/F5D}$ mutant resulted in a complete lack of spine restoration. These results indicate that Chmp2b is necessary for spine maintenance and suggest that this function requires interaction of Chmp2b with both Chmp4b and the plasma membrane.

To determine whether the loss of morphologically identified spines correlated with changes in synaptic transmission, we performed whole-cell patch-clamp recordings of spontaneous mEPSCs

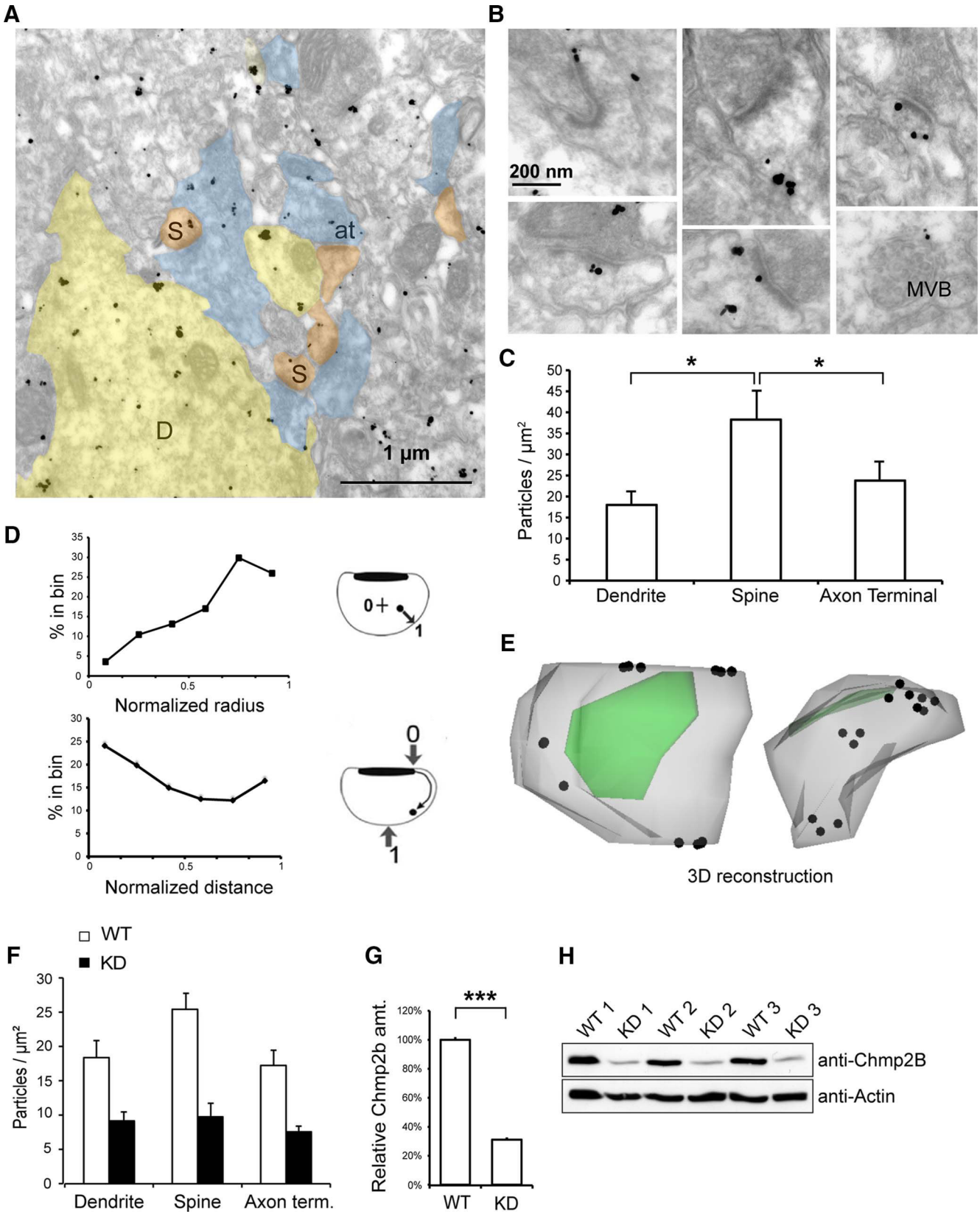



**Figure 7.** Ultrastructural localization of Chmp2b in dendritic spines. ***A***, Electron micrograph of Chmp2b immunoreactivity in the mouse stratum radiatum, detected by pre-embedding immunogold labeling. D, Dendrites; S, spines; at, axon terminals. ***B***, High-magnification views of typical dendritic spines. Chmp2b usually appears on the periphery of the PSD or on the neck of the spine, beneath the plasma membrane. Bottom right, Labeled MVB in a dendritic shaft. ***C***, Quantitative analysis of immunogold labeling in the stratum radiatum. The graph shows mean density of gold particles in three neuronal compartments. The ultrastructural localization of 2100 gold particles was analyzed in 30 fields similar to that shown in ***A***. Chmp2b density was significantly higher in spines than in shafts or axonal boutons ($p = 0.0498$, $n = 3$ animals, 3 compartments and 10 fields per animal, Friedman test). ***D***, Distribution of gold particle positions inside dendritic spines ($n = 335$ particles, 3 animals). Top, Histogram of normalized positions along the spine radius. Inset, Coordinate 0 corresponds to the spine center, and 1.0 corresponds to (*Figure legend continues.*)

in cultured hippocampal neurons transfected with control or shChmp2b constructs (Fig. 4*D–F*). Transfection was done at 18 DIV, and recordings were performed on mCherry fluorescent neurons at 21 DIV. In Chmp2b-depleted neurons, the mean amplitude of mEPSCs was reduced by 43% and the mean frequency by 30% (Fig. 4*E*,*F*). We also recorded excitatory currents evoked by direct activation with bath-applied NMDA. Transfection of the Chmp2b-depleting plasmid resulted in a 63% drop in NMDA receptor-mediated current density (Fig. 4*G*). Cell capacitance was not significantly affected (GFP shRNA, 16.2 ± 0.8 pF; Chmp2b shRNA, 14.0 ± 1.0 pF; $p = 0.3037$, *t* test). Thus, Chmp2b knockdown induced a loss of functional NMDA receptors. Together, these data indicate that Chmp2b is required for maintenance of functional excitatory synapses in cultured hippocampal neurons.

To confirm the specificity of the shRNA effects and to determine whether these results extended to *in vivo* conditions, we investigated the dendritic morphology of neurons stained by Golgi impregnation in hippocampal CA1 sections from wild-type and Chmp2b KD mice (Fig. 5*A*; Ghazi-Noori et al., 2012). We found that the total density of spines was reduced by 33% in KD mice compared with age-matched control siblings. This included a 50% loss in the density of mushroom spines (Fig. 5*B*). We also evaluated the density of excitatory synapses in wild-type and KD hippocampus by counting asymmetric synaptic profiles in electron microscopic images of hippocampal stratum radiatum (Fig. 5*C*). KD hippocampus displayed a 33% drop in excitatory synapse density (Fig. 5*D*). Together, the data strongly support the conclusion that Chmp2b plays an important role in formation and maintenance of postsynaptic spines.

### Chmp2b is required for stable spine expansion and synaptic potentiation during chemical LTP

We then examined whether Chmp2b was required for activity-induced changes in spine structure and synaptic function. We first measured the change in spine volume in cultured hippocampal neurons subjected to a chemical LTP (cLTP) protocol, after transfection with control or Chmp2b-depleting vectors. Hippocampal neurons were transfected at 16–18 DIV and imaged 3 d later during cLTP induced by brief stimulation of synaptic NMDA receptors with glycine. The volume of individual spines 5 min before and 45 min after cLTP induction was estimated by 3D reconstruction and voxel counting (Fig. 6*A*). As expected (Park et al., 2006), in control neurons, spine volumes were increased at 45 min by ≈15% (median value of the relative increment). In contrast, no such increase was seen in Chmp2b-depleted neurons (Fig. 6*B*). Coexpression of RNAi-resistant Chmp2b fully restored the increase in spine volume (Fig. 6*B*). These data indicated that Chmp2b was required for stable expansion of spine heads during cLTP.

We also determined the effect of the cLTP protocol on mEPSCs in control and Chmp2b-depleted neurons. As expected, glycine induced a stable increase in the amplitude of mEPSCs in control neurons, thus demonstrating effective LTP (Fig. 6*C*,*D*). Knockdown of Chmp2b impaired the increase in synaptic currents, and LTP could be rescued by expression of RNAi-resistant Chmp2b$^{WT}$ (Fig. 6*D*). These data indicated that Chmp2b was required for long-term synaptic plasticity.

### CHMP2B is concentrated at the PSD and close to the spine membrane

Chmp2b might regulate synaptic function by acting within synapses. To investigate this point, we examined the localization of the protein in neuronal processes *in situ* at ultrastructural resolution, using the same antibody as above for pre-embedding immunogold labeling of the adult mouse hippocampus. EM of the stratum radiatum revealed Chmp2b immunoreactivity in axons, dendrites, and spines (Fig. 7*A*,*B*). Importantly, immunogold labeling was greatly reduced in Chmp2b KD brain, confirming the specificity of labeling (Fig. 7*F–H*). In the dendritic shafts, as expected based on the known endosomal function of ESCRT-III, particles sometimes decorated multivesicular bodies (MVBs; Fig. 7*B*, bottom right). Spines (which are usually devoid of MVB; Cooney et al., 2002) displayed a density of immunogold particles that was twofold higher than in dendritic shafts or axonal boutons (Fig. 7*C*). The particles found in spines showed no obvious association with internal vesicular compartments.

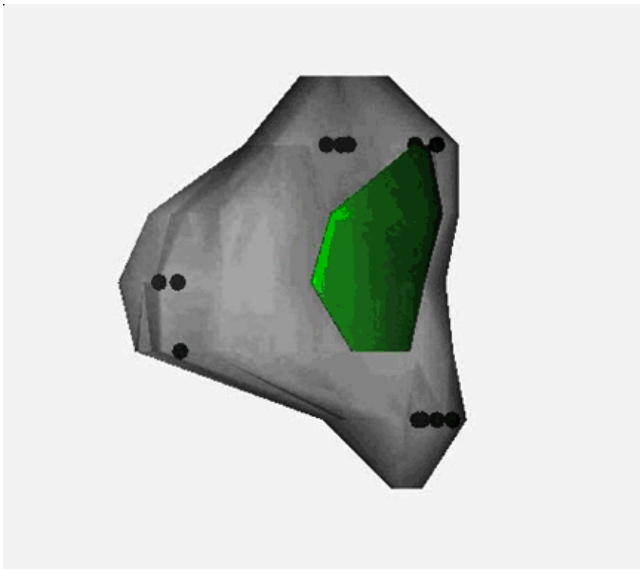
We quantitated the distribution of Chmp2b within dendritic spines by measuring the normalized distance of the gold particles relative to either the center of the spine (radial distance) or the edge of the PSD (tangential distance), following the method of Rácz and Weinberg (2008). Chmp2b immunoreactivity peaked at radial positions corresponding to submembrane cortex and at tangential positions immediately adjacent to the PSD (Fig. 7*D*). Correcting the radial distribution for distance-dependent increase in the sampling area did not change the submembrane location of the density maximum (see Materials and Methods). Along the tangential coordinate, in addition to the PSD-proximal peak, a second peak was observed at large tangential distances, corresponding to a distinct accumulation in the spine neck. These results were confirmed by reconstructing the three-dimensional distribution of Chmp2b immunoreactivity within individual spines (Fig. 7*E*; Movie 1). Most particles were arrayed just beneath the spine membrane around the PSD. Particles were also found next to the limiting membrane of the spine neck. The concentration of Chmp2b molecules in the perisynaptic domain is consistent with the possibility that Chmp2b-containing assemblies might associate with the exterior fringe of the PSD.

### Synaptic Chmp2b is part of a stable synaptic ESCRT-III complex

We used immunoblotting to analyze the distribution of Chmp2b and its direct interactor Chmp4b among subcellular fractions derived from rat forebrain. Soluble protein and membranous organelles were recovered from cortical lysates, and synaptoneurosomes were isolated from the total membranes by sedimentation on sucrose gradients. Antibodies against synaptophysin and

←

(*Figure legend continued.*) the plasma membrane. Particles concentrate in the subplasmalemmal cortex. Bottom, Histogram of normalized particle distances from the PSD. Inset, Coordinate 0 corresponds to the PSD edge, and 1.0 corresponds to the point equidistant from both edges of the PSD. Particles concentrate in the proximity of the PSD and become scarcer further away, with a slight rebound in frequency at the usual position of the neck. ***E***, 3D reconstruction of a typical spine using immuno-electron micrographs of serial sections. The plasma membrane is in gray, PSD in green, and particles are marked by dots. Particles appear beneath the perisynaptic membrane around the PSD and also in the neck. Left, View from above the PSD; right, lateral view. An animated version of the 3D model appears in Movie 1 (see Notes). ***F***, Quantitation of immunogold labeling in the stratum radiatum of WT and KD siblings. The density of gold particles in the three neuronal compartments is much lower in the KD animals ($p < 10^{-5}$, $n = 3$ animals per genotype, Kruskal–Wallis test, density vs genotype). ***G***, Comparison of Chmp2b amounts in WT and KD brains. Total brain extract was obtained from three animals of each genotype and analyzed by SDS-PAGE and Western immunoblotting with anti-Chmp2b antibody. Actin was used as a loading control. Quantitation of the Chmp2b band in each lane was obtained by densitometry and normalized to the respective actin control. KD brain still expressed 30% of the wild-type amount. ***H***, Western blot used for the quantitation in ***G***.



**Movie 1.** Animated view of a reconstructed spine, showing under various angles the distribution of Chmp2b labeling (black dots) around the PSD (green) and in the neck.

PSD-95 were used as markers of the presynaptic and postsynaptic compartments, respectively. Chmp2b was more concentrated in the membranes and in the synaptoneurosomes than in the soluble fraction (Fig. 8*A*). By comparing the intensity of the Chmp2b band with recombinant protein standards, we estimated that Chmp2b represented ~0.03% (w/w) of total synaptosomal protein (data not shown). The relative level of Chmp2b remained elevated in the Triton X-100-insoluble material extracted from synaptoneurosomes (PSDI fraction). Chmp4b was mostly Triton insoluble and highly enriched in the PSDI fraction. Subsequent solubilization of PSDI revealed that unlike PSD-95, Chmp2b and Chmp4b could be solubilized from the PSD fraction using the more stringent detergent Sarkosyl (Fig. 8*B*, fraction PSDIII). Solubilization of Chmp2b from synaptoneurosomes was completely ineffective with 1% digitonin, only partial with the mild nonionic detergent dodecylmaltoside, and very efficient with 1% DOC (Fig. 8*C*). These data indicated that although Chmp2b and Chmp4b were associated with Triton-insoluble fractions containing postsynaptic scaffolding proteins, they did not behave as "core" proteins of the PSD, but rather as peripherally attached PSD proteins.

To determine the oligomeric state of Chmp2b at synapses, gradient-purified synaptoneurosomes were lysed in DOC (Husi and Grant, 2001). The lysates were clarified by high-speed centrifugation, and the solubilized proteins were then analyzed by gel filtration and immunoblotting of fractions. This revealed that 30% of synaptic Chmp2b was associated with large molecular assemblies (>1.5 MDa), coeluting with the expected peak of postsynaptic receptor/scaffold complexes (Fig. 8*D*). The remaining Chmp2b molecules were eluted in low-molecular-weight (LMW) fractions (peaking at ≅50 kDa apparent molecular weight) corresponding to monomeric Chmp2b, as indicated by comparison with the purified recombinant protein (Fig. 8*E*). Importantly, DOC buffer did not affect the apparent size of monomeric recombinant Chmp2b (Fig. 8*E*), demonstrating that Chmp2b polymerization is not activated by the detergent during solubilization. The vast majority of synaptic Chmp4b, as well as a fraction of the Chmp4b-binding protein Alix, coeluted with the HMW pool of Chmp2b and PSD-95 (Fig. 8*D*). These data show that at synapse Chmp2b, Chmp4b and Alix are part of stable polymers, possibly representing ESCRT-III complexes associated with synaptic structures. To investigate this point further, we performed coimmunoprecipitation experiments. The HMW and monomeric entities resolved by gel filtration were separately immunoprecipitated with anti-Chmp2b, and the immunoprecipitates were probed with anti-Chmp4b antibody. A large proportion of the Chmp4b present in the HMW peak coprecipitated along with Chmp2b (Fig. 8*F*, lanes 1–3). In contrast, Chmp4b molecules and Chmp2b present in the LMW fraction were not coprecipitated (Fig. 8*F*, lanes 4–6). Thus, in synaptoneurosomes solubilized by DOC, the polymeric pool of Chmp4b corresponds to molecules associated with Chmp2b, supporting the conclusion that synapses contain stable ESCRT-III complexes.

To further define the composition of synaptic ESCRT-III, Chmp2b immunoprecipitates derived from the purified HMW peak or from total synaptoneurosomal lysates were analyzed by mass spectrometry. In agreement with the above data, Chmp4b was detected as one of the most prominent proteins among the numerous Chmp2b-associated species (Table 3). Alix and the ESCRT-III subunits Chmp1A, Chmp2A, Chmp3, Chmp5, and Chmp6 were also identified, confirming that synaptic Chmp2b is part of an ESCRT-III-type complex. On the other hand, proteomic analysis also identified GluN2B, Homer, and Shank peptides among Chmp2b-bound species. The presence of these postsynaptic proteins was confirmed by immunoblotting (Fig. 8*G*). In addition to Chmp4b and Alix, Chmp2b immunoprecipitates derived from synaptosomal DOC lysates also contained detectable amounts of NMDA receptors but no GluA2-containing AMPA receptors. Furthermore, mass spectrometry also revealed a set of proteins regulating or belonging to the cortical actin cytoskeleton (Table 4). Together with the intraspine distribution of Chmp2b immunoreactivity, these biochemical data suggest that a subset of Chmp2b molecules exist within stable ESCRT-III polymers attached to the spinoskeleton, around the PSD and in the spine shell.

## Discussion

Our previous work indicated that Chmp2b depletion, as well as expression of FTD-linked Chmp2b mutants, impaired the morphological maturation of dendritic spines in cultured hippocampal neurons, suggesting that this extremely conserved protein might play a specific role at synapses (Belly et al., 2010). In the present study, we confirmed and extended these results. We found that, compared with other tissues, Chmp2b was highly expressed in the brain and that its expression was upregulated during synaptogenesis. In cultured hippocampal neurons, depleting Chmp2b by RNAi decreased the stability of dendritic branches and the density, efficacy, and plasticity of excitatory synapses. Chmp2b-deficient mouse hippocampus displayed a striking reduction in spine and synapse density, supporting the specificity and *in vivo* relevance of the RNAi effects. Furthermore, EM observations showed that the protein preferentially accumulated close to the spine plasma membrane and near the PSD. Finally, biochemical data demonstrated that the protein was present inside ESCRT-III polymers physically associated with the PSD. Thus, Chmp2b-containing ESCRT-III complexes play a previously unsuspected role in the regulation of long-term synaptic plasticity. The circular geometry and membrane-scaffolding properties of ESCRT-III polymers suggest that they may directly contribute to shaping domains of the spine membrane.

The importance of Chmp2b for synaptic stability was supported by the concomitant drop in synaptic markers, mEPSC

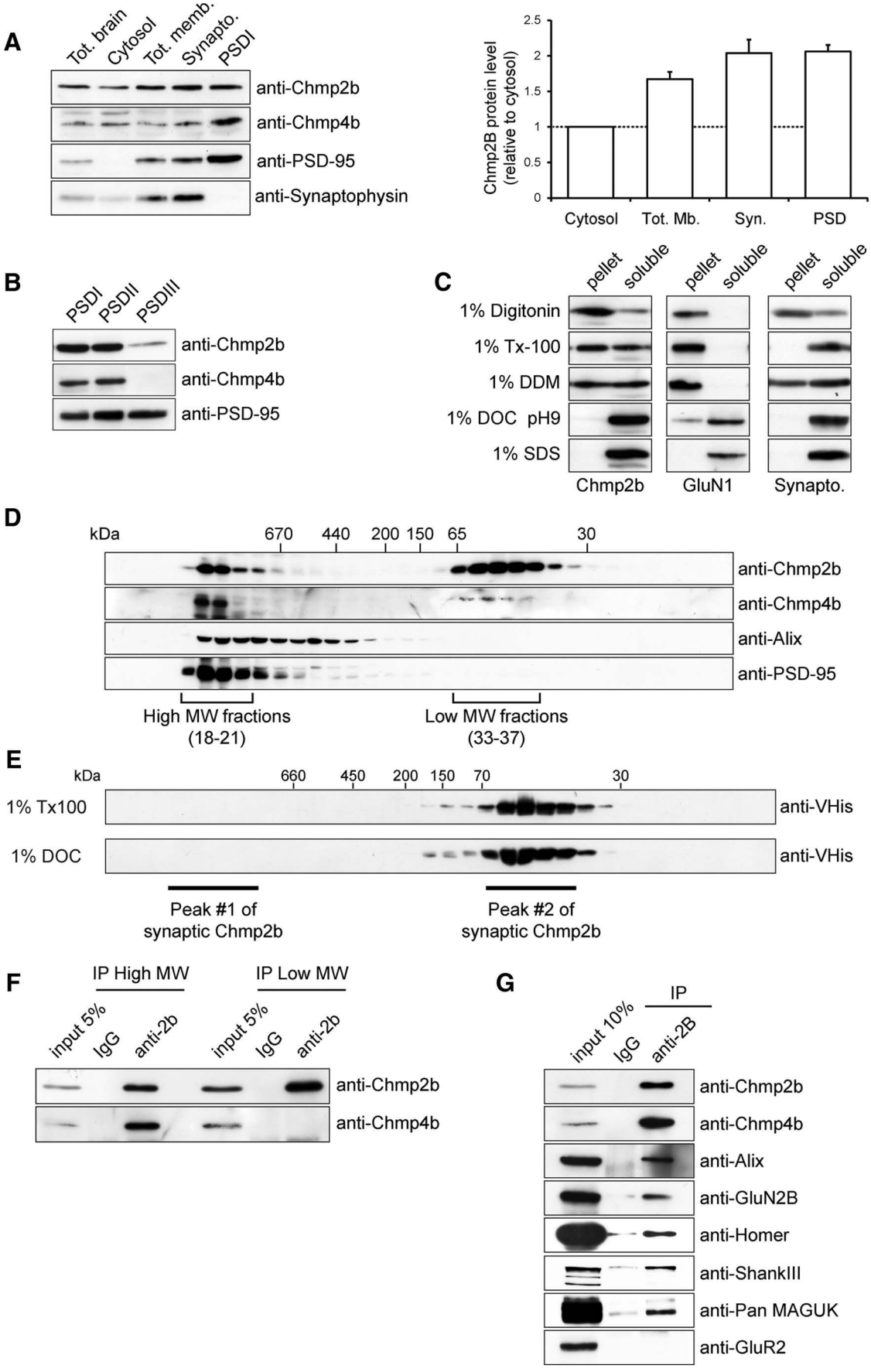

A
Tot. brain
Cytosol
Tot. memb.
Synapto.
PSDI
anti-Chmp2b
anti-Chmp4b
anti-PSD-95
anti-Synaptophysin
Chmp2B protein level (relative to cytosol)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Cytosol
Tot. Mb.
Syn.
PSD
B
PSDI
PSDII
PSDIII
anti-Chmp2b
anti-Chmp4b
anti-PSD-95
C
pellet
soluble
pellet
soluble
pellet
soluble
1% Digitonin
1% Tx-100
1% DDM
1% DOC pH9
1% SDS
Chmp2b
GluN1
Synapto.
D
kDa
670
440
200
150
65
30
anti-Chmp2b
anti-Chmp4b
anti-Alix
anti-PSD-95
High MW fractions (18-21)
Low MW fractions (33-37)
E
kDa
660
450
200
150
70
30
1% Tx100
1% DOC
anti-VHis
anti-VHis
Peak #1 of synaptic Chmp2b
Peak #2 of synaptic Chmp2b
F
IP High MW
IP Low MW
input 5%
IgG
anti-2b
input 5%
IgG
anti-2b
anti-Chmp2b
anti-Chmp4b
G
IP
input 10%
IgG
anti-2B
anti-Chmp2b
anti-Chmp4b
anti-Alix
anti-GluN2B
anti-Homer
anti-ShankIII
anti-Pan MAGUK
anti-GluR2

**Table 3. ESCRT-III subunits and postsynaptic scaffold proteins detected by mass spectrometry of the synaptic Chmp2b-containing complex**

| | | Unique peptides (IP HMW complex) | | Spectral counts (IP HMW complex) | | Spectral counts (IP lysate) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Protein name | Accession number | Chmp2b IgG | Control IgG | Chmp2b IgG | Control IgG | Chmp2b IgG | Control IgG |
| CHMP2B | F1M8B7_RAT | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| CHMP2A | B2RZB5_RAT | 8 | 0 | 8 | 0 | 4 | 0 |
| CHMP4B | D4A9Z8_RAT | 12 | 0 | 12 | 0 | 14 | 0 |
| CHMP6 | D3ZDR2_RAT | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| CHMP5 | CHMP5_RAT | 3 | 0 | 3 | 0 | 4 | 0 |
| CHMP1A | D4AE79_RAT | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 |
| CHMP3 | CHMP3_RAT | 8 | 0 | 8 | 0 | 3 | 0 |
| ALIX | PDC6I_RAT | 10 | 0 | 10 | 0 | 2 | 0 |
| GLUN2B | NMDE2_RAT | 2 | 0 | 2 | 0 | 10 | 0 |
| PSD-95 | DLG4_RAT | 3 | 0 | 3 | 0 | 26 | 7 |
| SHANK1 | SHAN1_RAT | 5 | 0 | 5 | 0 | 7 | 0 |
| HOMER1 | HOME1_RAT | 6 | 0 | 6 | 0 | 11 | 3 |

Gradient-purified synaptoneurosomes were lysed in DOC buffer and fractionated by gel filtration. The HMW fractions were pooled and immunoprecipitated with anti-Chmp2b or control IgG. Immunoprecipitates were analyzed by LC-MS/MS. For each protein, the total number of protein-derived peptides (spectral counts) is shown as a semiquantitative estimate of relative protein abundance. The number of unique peptides was equal to the spectral count for all proteins shown. Spectral counts are also given for the same proteins identified in an independent immunoprecipitate prepared from total synaptosomal lysate (right column). Note the consistency of Chmp spectral counts between experiments. Proteins were detected in a total of three immunoprecipitation (IP) experiments.

frequency, and NMDA-evoked current density in mature cultured neurons in which Chmp2b had been depleted. In these neurons, remaining synapses were less efficient than in control neurons and less apt to undergo potentiation. We also showed that Chmp2b is necessary for synapse integrity *in vivo*, based on the observed decrease in both Golgi-stained spines and EM synaptic profiles in the stratum radiatum of "leaky KO" mice expressing 15–30% of the normal Chmp2b amount (Ghazi-Noori et al., 2012).

Given the established function of Chmp proteins in the transfer of material to the endo-lysosomal apparatus, the neuronal effects of Chmp2b deficiency might arise from impaired endosomal traffic. Endosomes have been shown to play a crucial role in postsynaptic function and plasticity, e.g., for receptor delivery and as membrane reservoirs for spine expansion (Park et al., 2006). Chmp2b might conceivably regulate some aspect of endosomal dynamics or function in spines. Consistent with this possibility, in non-neuronal cells, ESCRT complexes seem to be involved in trafficking endosomal cargo to multiple cellular localization, including the plasma membrane and associated cytoskeletal structures (Baldys and Raymond, 2009; Lobert and Stenmark, 2012).

However, native endosomal ESCRT-III complexes are thought to be very transient, in contrast with the synaptic complex described here. An alternative hypothesis, which we favor, rests on the finding that ESCRT-III assemblies made of Alix, Chmp4, and Chmp2 can locally reshape the plasma membrane, as during virus egress, cytokinesis, and membrane repair (Henne et al., 2013; Jimenez et al., 2014). That Chmp2b might have such a membrane-scaffolding activity in neurons was suggested by the finding that Chmp2b$^{L4D/F5D}$ was not able to restore dendritic complexity in Chmp2B-depleted neurons. Since we had previously characterized this mutant for its inability to bind to and scaffold the plasma membrane (Bodon et al., 2011), these results suggested that Chmp2b locally acts as a morphoregulatory protein. The effect of Chmp2B on dendritic branches also correlated with its ability to bind its direct ESCRT-III partner Chmp4b, in agreement with previous findings that Chmp4b was required for dendritic growth and maintenance in *Drosophila* and mouse neurons (Sweeney et al., 2006; Lee et al., 2007). However, since Chmp2b depletion did not cause the rapid lethality induced by Chmp4b RNAi, the morphogenetic function mediated by Chmp2b appears to be distinct from other vital ESCRT-III activities. Interestingly, mutation of Chmp2b arginine 22 (one of the three residues required for binding to Chmp4b) was recently detected in a sporadic case of amyotrophic lateral sclerosis (van Blitterswijk et al., 2012), suggesting that dysfunction of the Chmp2b–Chmp4b interaction might have disease relevance.

Gel filtration of synaptosomal lysates showed that at least 30% of synaptic Chmp2b was bound into a large supramolecular complex that comigrated with postsynaptic scaffolds. Coimmunoprecipitation indicated that within this complex, Chmp2b was associated with the Shank–Homer network and GluN2B-containing NMDA receptors but not with the more mobile GluA2-containing AMPA receptors. In accordance with the strong concentration of Chmp4b in the PSD fraction, ~70% of synaptosomal Chmp4b comigrated with the Chmp2b/PSD-95 peak and coprecipitated with Chmp2b. Unbiased analysis by mass spectrometry confirmed the presence of Chmp4b in the Chmp2b immunoprecipitates. Using mass spectral counts as a semiquantitative criterion for abundance, Chmp4b; ESCRT-III components Chmp2A, Chmp3, Chmp1A, and Chmp5; and the Chmp4b-binding platform Alix were all strongly represented. This composition corresponds to that expected for ESCRT-III.

←

**Figure 8.** Chmp2b is part of a stable ESCRT-III-type complex. ***A***, Rat forebrain homogenates were fractionated as described in Materials and Methods. Equivalent amounts of each fraction were analyzed by Western immunoblotting with the indicated antibodies. Both Chmp2b and Chmp4b were enriched in the PSD fraction. ***B***, PSDI was re-extracted with either 0.5% Triton X-100 or 3% Sarkosyl to yield insoluble fractions PSDII or PSDIII, respectively. Equivalent amounts of each fraction were analyzed by Western immunoblotting. ***C***, Synaptoneurosomes were solubilized with the indicated detergents and centrifuged at high speed. The resulting supernatants and pellets were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. ***D***, Gradient-purified synaptoneurosomes were lysed in 1% DOC, insoluble material was removed, and the extract was fractionated by size-exclusion chromatography on a Sephacryl S-300 column. Column fractions were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. Apparent molecular weights (MW) were calibrated with protein markers. A subset of Chmp2b displayed the same high MW as the PSD-95 complex. ***E***, Monomeric recombinant His-tagged Chmp2b was incubated with either 1% Triton X-100 or 1% DOC and fractionated by size-exclusion chromatography on a Sephacryl S-300 column. Fractions were analyzed by immunoblotting with an anti-His tag antibody. DOC did not cause detectable aggregation of monomeric Chmp2b. The elution peaks of synaptic Chmp2b-containing fractions resolved on the same column are indicated for reference. ***F***, Fractions corresponding to HMW and LMW Chmp2b populations were separately pooled and immunoprecipitated with anti-Chmp2b antibody or control IgG. The immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with anti-Chmp2b or anti-Chmp4b antibody. Chmp4b coprecipitated with Chmp2b in the HMW peak. ***G***, Synaptoneurosome extracts were prepared as in ***D*** and immunoprecipitated with anti-Chmp2b antibody or control IgG. The immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

**Table 4. Complete list of proteins detected by mass spectrometry of the synaptic Chmp2b-containing HMW complex**

| Protein name | Accession number | Note | SC 2B/SC Control | Chmp2b IgG SC | Control IgG SSC | Control IgG SC | Control IgG SSC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bag6 | BAG6_RAT | | 2B only | 35 | 35 | | |
| Gja1 | CXA1_RAT | | 2B only | 29 | 29 | | |
| Get4 | F1LXF5_RAT | | 2B only | 23 | 23 | | |
| Camk2g | KCC2G_RAT | PSD | 2B only | 14 | 4 | | |
| Chmp4b | D4A9Z8_RAT | ESCRT-III | 2B only | 12 | 12 | | |
| Fasn | FAS_RAT | | 2B only | 11 | 11 | | |
| Ptpn23 | F1M951_RAT | ESCRT-III | 2B only | 10 | 10 | | |
| Alix | PDC6I_RAT | ESCRT-III | 2B only | 10 | 10 | | |
| Ubl4a | UBL4A_RAT | | 2B only | 10 | 10 | | |
| Wdr7 | WDR7_RAT | | 2B only | 10 | 10 | | |
| Myo6 | D4A5I9_RAT | CSK | 2B only | 9 | 9 | | |
| Hk1 | HXK1_RAT | | 2B only | 9 | 9 | | |
| Sptbn2 | SPTN2_RAT | CSK | 2B only | 9 | 7 | | |
| Chmp2a | B2RZB5_RAT | ESCRT-III | 2B only | 8 | 8 | | |
| Chmp3 | CHMP3_RAT | ESCRT-III | 2B only | 8 | 8 | | |
| Pfkp | K6PP_RAT | | 2B only | 8 | 7 | | |
| Ogt | OGT1_RAT | | 2B only | 8 | 8 | | |
| Pfkm | Q52KS1_RAT | | 2B only | 8 | 7 | | |
| Srcin1 | SRCN1_RAT | | 2B only | 8 | 8 | | |
| Myo1d | MYO1D_RAT | CSK | 2B only | 7 | 7 | | |
| Capzb | CAPZB_RAT | CSK | 2B only | 6 | 6 | | |
| Myh14 | F1LNF0_RAT | CSK | 2B only | 6 | 2 | | |
| Ank2 | F1M9N9_RAT | CSK | 2B only | 6 | 6 | | |
| Sfxn | G3V804_RAT | | 2B only | 6 | 2 | | |
| Homer1 | HOME1_RAT | PSD | 2B only | 6 | 6 | | |
| Ppp1ca | PP1A_RAT | | 2B only | 6 | 2 | | |
| Ppp1cc | PP1G_RAT | | 2B only | 6 | 2 | | |
| Hspa12a | D3ZC55_RAT | | 2B only | 5 | 5 | | |
| Dbn1 | DREB_RAT | PSD | 2B only | 5 | 5 | | |
| Gphn | GEPH_RAT | | 2B only | 5 | 5 | | |
| Idh2 | IDHP_RAT | | 2B only | 5 | 5 | | |
| Shank1 | SHAN1_RAT | PSD | 2B only | 5 | 5 | | |
| Tpi1 | TPIS_RAT | | 2B only | 5 | 5 | | |
| Sptbn1 | G3V6S0_RAT | CSK | 35, 0 | 35 | 33 | (1) | (1) |
| Myh10 | F1LQ02_RAT | CSK | 24, 0 | 24 | 19 | (1) | (1) |
| Dync1h1 | DYHC1_RAT | | 22, 0 | 22 | 5 | (1) | (1) |
| Ap3d1 | B5DFK6_RAT | | 12, 0 | 12 | 12 | (1) | (1) |
| Myh9 | G3V6P7_RAT | CSK | 11, 0 | 11 | 6 | (1) | (1) |
| Cyfip2 | D3ZX82_RAT | CSK | 2B only | 4 | 4 | | |
| Chmp1a | D4AE79_RAT | ESCRT-III | 2B only | 4 | 4 | | |
| Glud1 | DHE3_RAT | | 2B only | 4 | 4 | | |
| Sucla2 | F1LM47_RAT | | 2B only | 4 | 4 | | |
| Epb41l3 | G3V874_RAT | CSK | 2B only | 4 | 4 | | |
| Kif2a | KIF2A_RAT | | 2B only | 4 | 4 | | |
| Pclo | PCLO_RAT | | 2B only | 4 | 4 | | |
| Snf8 | SNF8_RAT | | 2B only | 4 | 4 | | |
| Snap25 | SNP25_RAT | | 2B only | 4 | 4 | | |
| Actn1 | ACTN1_RAT | CSK | 2B only | 3 | 3 | | |
| Agap2 | AGAP2_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Snap91 | AP180_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Atp5f1 | AT5F1_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| LOC681996 | B0BN63_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Arpc4 | B2RZ72_RAT | CSK | 2B only | 3 | 3 | | |
| Ndufa4 | B2RZD6_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Capza2 | CAZA2_RAT | CSK | 2B only | 3 | 3 | | |
| Chmp5 | CHMP5_RAT | ESCRT-III | 2B only | 3 | 3 | | |
| Rapgef4 | D3KR63_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Chmp6 | D3ZDR2_RAT | ESCRT-III | 2B only | 3 | 3 | | |
| Dclk1 | DCLK1_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Dlg4 | DLG4_RAT | PSD | 2B only | 3 | 3 | | |
| Dynll1 | DYL1_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| H2a1c | H2A1C_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Prkar2b | KAP3_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Prkcg | KPCG_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Nckap1 | NCKP1_RAT | CSK | 2B only | 3 | 3 | | |
| Ndufs2 | NDUS2_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Ndufv2 | NDUV2_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Plec | PLEC_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Pura | PURA_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Pygb | PYGB_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Syt7 | Q99P34_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Rab2a | RAB2A_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Ran | RAN_RAT | | 2B only | 3 | 3 | | |
| Dnm1 | DYN1_RAT | | 8, 7 | 26 | 26 | 3 | 3 |
| Atp2b1 | AT2B1_RAT | | 8, 0 | 8 | 3 | (1) | (1) |
| Nsf | NSF_RAT | | 8, 0 | 16 | 16 | 2 | 2 |
| Rab3c | RAB3C_RAT | | 8, 0 | 8 | 4 | (1) | (1) |
| Atp2b2 | AT2B2_RAT | | 7, 0 | 7 | 3 | (1) | (1) |
| Rab14 | RAB14_RAT | | 7, 0 | 7 | 3 | (1) | (1) |
| Rims1 | RIMS1_RAT | | 7, 0 | 7 | 7 | (1) | (1) |
| Syn2 | SYN2_RAT | | 7, 0 | 7 | 4 | (1) | (1) |
| Add2 | ADDB_RAT | CSK | 5, 0 | 5 | 4 | (1) | (1) |
| Atp5o | ATPO_RAT | | 5, 0 | 5 | 5 | (1) | (1) |
| RGD1307615 | D3ZKQ4_RAT | | 5, 0 | 5 | 5 | (1) | (1) |
| Sptan1 | E9PSZ3_RAT | CSK | 5, 0 | 35 | 35 | 7 | 7 |
| Immt | IMMT_RAT | | 5, 0 | 5 | 5 | (1) | (1) |
| Camk2b | KCC2B_RAT | PSD | 5, 0 | 30 | 13 | 6 | (1) |
| Aco2 | ACON_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Maoa | AOFA_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Ap3m2 | AP3M2_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Actr2 | ARP2_RAT | CSK | 2B only | 2 | 2 | | |
| Arpc5l | ARP5L_RAT | CSK | 2B only | 2 | 2 | | |
| Atad3 | ATAD3_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Cacna1a | CAC1A_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Cand1 | CAND1_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Crym | CRYM_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Caskin1 | CSKI1_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Atp5j2 | D3ZAF6_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Dsg1b | D3ZQ45_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Atp6v1a | D4A133_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Add3 | D4A3Q7_RAT | CSK | 2B only | 2 | 2 | | |
| Epb41l1 | E41L1_RAT | CSK | 2B only | 2 | 2 | | |
| Hadha | ECHA_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Ank3 | F1LP19_RAT | CSK | 2B only | 2 | 2 | | |
| Mrpl48 | F1LWB8_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Chmp2b | F1M8B7_RAT | ESCRT-III | 2B only | 2 | 2 | | |
| Gnb1 | GBB1_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Slc2a1 | GTR1_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Eif4a2 | IF4A2_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Kcnh1 | KCNH1_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Prkcb | KPCB_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Ldha | LDHA_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Mink1 | MINK1_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Grin2b | NMDE2_RAT | PSD | 2B only | 2 | 2 | | |
| Pdhb | ODPB_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Pde2a | PDE2A_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Mrps9 | Q5I0K4_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Ndufs7 | Q5RJN0_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Ndufv1 | Q5XIH3_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Uqcrc2 | QCR2_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Rab18 | RAB18_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Rab7a | RAB7A_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Rac1 | RAC1_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Mras | RASM_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Rpl23a | RL23A_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Rtn1 | RTN1_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Sept5 | SEPT5_RAT | CSK | 2B only | 2 | 2 | | |
| Sipa1l1 | SI1L1_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Ssbp1 | SSBP_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |
| Stx1b | STX1B_RAT | | 2B only | 2 | 2 | | |

Four hundred twenty-eight candidate proteins detected in the sample were filtered as described in Materials and Methods, yielding a list of 134 proteins, shown by order of decreasing spectral counts. The Note column points out ESCRT-III proteins, PSDs, and components of the spine actin cytoskeleton (CSK). SC, Spectral counts (cut- off 2); SSC, specific spectral counts (unique peptides); SC 2B/SC Control, ratio of spectral counts between specific and control immunoprecipitation (cut-off 5); 2B only, no peptides in control immunoprecipitation; (1), SSC = 1, insufficient for definite identification.

The simplest explanation of these data is that Chmp2b, Chmp4b, and other subunits were all bound together in stable ESCRT-III polymers attached to postsynaptic scaffolds. The size of scaffolds would account for the apparent molecular weight of the complex, which was >1 MDa larger than the 450 kDa measured in yeast ESCRT-III (Teis et al., 2008). The difference in solubility between Chmp4b and Chmp2b is consistent with multimerization of these molecules in filaments with a high Chmp4/Chmp2 ratio, similar to that determined in yeast.

In view of the known features of ESCRT-III in yeast and cell lines, the apparent stability of synaptic ESCRT-III was unexpected. The transient nature of ESCRT-III assembly *in vivo* is considered one of its cardinal features, as it arises from tight coupling between subunit polymerization, recruitment of the depolymerizing ATPase Vps4, and membrane scission (Lata et al., 2008; Henne et al., 2013). Detection of wild-type yeast ESCRT-III polymers required protein cross-linking (Teis et al., 2008), and to our knowledge, the biochemical recovery of physiologically assembled ESCRT-III from metazoan cells has not been previously reported. In contrast, in synaptoneurosomes, a large fraction of Chmp2b and Chmp4b was polymerized at steady state, and the polymer survived solubilization in deoxycholate. One possible explanation for this stability is that Vps4 may not have access to synaptic ESCRT-III because of steric hindrance by synaptic proteins. In line with this possibility, proteomic analysis failed to detect Vps4 among Chmp2b-associated proteins, even though Vps4 was present in total synaptosomal lysates.

That a subset of Chmp2b-containing ESCRT-III assembles under the spine membrane is supported by congruent immuno-EM and biochemical data. First, the preferential localization of Chmp2b around the PSD and in the neck indicated that Chmp2b was recruited to the submembrane scaffold of spines. Moreover, isolation and differential detergent extraction of the PSD fraction showed that Chmp2b was anchored to but not embedded within the PSD. Our biochemical data suggest that most of the Chmp2b molecules lying under the spine membrane are part of ESCRT-III polymers. Because Chmp2b exists in axonal boutons as well as in spines, it is possible that some of the complexes originated in the presynaptic compartment. However, since Chmp2b was significantly more concentrated in spines than in boutons, and given that postsynaptic entities predominate in the PSD-95 peak and among Chmp2b-bound proteins, it is likely that most of the ESCRT-III identified in synaptoneurosome extracts was postsynaptic.

We speculate that the intrinsic geometry and rigidity of ESCRT-III filaments may be responsible for imparting spines with some aspects of their typical architecture, thus promoting synaptic stability and plasticity. Chmp4 and Chmp2 polymers reconstituted *in vitro* from recombinant subunits or via overexpression in transfected cells, consistently form 100- to 300-nm-wide circular or helical arrays strongly adhering to the plasma membrane. Together with the ultrastructural distribution of Chmp2b within dendritic spines, these dimensions are compatible with circular ESCRT-III filaments lining the cytoplasmic side of the spine plasma membrane in the neck and around the PSD. The filaments might conceivably help shape the neck or set up boundaries for PSD growth. Because of the high affinity of the filaments for lipids, they could also act as diffusion barriers, regulating exchange of molecules between the PSD and the extrasynaptic membrane or between spine and shaft. Given the numerous actin-regulating proteins detected by LC-MS in Chmp2b immunoprecipitates, ESCRT-III filaments might also provide an anchor for assembly of actin-based structures or a fulcrum for application of mechanical force by actin.

The Chmp2b$^{R19/22/26A}$ and Chmp2b$^{L4D/F5D}$ mutants were defective for both dendrite and spine maintenance, suggesting that both processes share a requirement for ESCRT-III assembly and binding to the plasma membrane. In cultured neurons, overexpressed ESCRT-III assemblies were frequently localized at dendritic branch points. Chmp2b-containing ESCRT-III might control local cytoskeletal rearrangements, or stabilize membrane curvature at the base of dendritic branches, perhaps by assembling into ≈1-$\mu$m-wide rings, akin to those observed in the intercellular bridge of dividing cells (Guizetti et al. 2011). This diameter would correspond to that of distal dendrites, known by EM measurements to be no larger than 0.5–1 $\mu$m (Bartlett and Banker, 1984). More studies are necessary to identify ESCRT-III structures in neurons and to elucidate the mechanisms whereby they help maintain dendrites and spines.

Our work showing that CHMP2B resides at synapses and is involved in synaptic plasticity opens new avenues for understanding how Chmp2b deficiency contributes to the cognitive effects of Chmp2b mutations in FTD patients.

## References


Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL (2006) Retraction of synapses and dendritic spines induced by off-target effects of RNA interference. J Neurosci 26:7820–7825. CrossRef Medline

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

Baldys A, Raymond JR (2009) Critical role of ESCRT machinery in EGFR recycling. Biochemistry 48:9321–9323. CrossRef Medline

Bartlett WP, Banker GA (1984) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. J Neurosci 4:1944–1953. Medline

Belly A, Bodon G, Blot B, Bouron A, Sadoul R, Goldberg Y (2010) CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. J Cell Sci 123:2943–2954. CrossRef Medline

Bodon G, Chassefeyre R, Pernet-Gallay K, Martinelli N, Effantin G, Hulsik DL, Belly A, Goldberg Y, Chatellard-Causse C, Blot B, Schoehn G, Weissenhorn W, Sadoul R (2011) Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. J Biol Chem 286:40276–40286. CrossRef Medline

Bolte S, Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. J Microsc 224:213–232. CrossRef Medline

Buchkovich NJ, Henne WM, Tang S, Emr SD (2013) Essential N-terminal insertion motif anchors the ESCRT-III filament during MVB vesicle formation. Dev Cell 27:201–214. CrossRef Medline

Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, Siekevitz P (1980) Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. J Cell Biol 86:831–845. CrossRef Medline

Cooney JR, Hurlburt JL, Selig DK, Harris KM, Fiala JC (2002) Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. J Neurosci 22:2215–2224. Medline

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

Ghazi-Noori S, Froud KE, Mizielinska S, Powell C, Smidak M, Fernandez de Marco M, O'Malley C, Farmer M, Parkinson N, Fisher EM, Asante EA, Brandner S, Collinge J, Isaacs AM (2012) Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. Brain 135:819–832. CrossRef Medline

Goetze B, Grunewald B, Baldassa S, Kiebler M (2004) Chemically controlled formation of a DNA/calcium phosphate coprecipitate: application for

transfection of mature hippocampal neurons. J Neurobiol 60:517–525. CrossRef Medline

Guizetti J, Schermelleh L, Mäntler J, Maar S, Poser I, Leonhardt H, Müller-Reichert T, Gerlich DW (2011) Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT- III-dependent filaments. Science 331:1616–1620. CrossRef Medline

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

Harlow E, Lane DP (1988) Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Henne WM, Buchkovich NJ, Zhao Y, Emr SD (2012) The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. Cell 151:356–371. CrossRef Medline

Henne WM, Stenmark H, Emr SD (2013) Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol 5:pii:a016766. CrossRef Medline

Husi H, Grant SG (2001) Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. J Neurochem 77:281–291. CrossRef Medline

Isaacs AM, Johannsen P, Holm I, Nielsen JE (2011) Frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutations. Curr Alzheimer Res 8:246–251. CrossRef Medline

Jiang M, Chen G (2006) High $Ca^{2+}$-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. Nat Protoc 1:695–700. CrossRef Medline

Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F (2014) ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. Science 343:1247136. CrossRef Medline

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

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

Lobert VH, Stenmark H (2012) The ESCRT machinery mediates polarization of fibroblasts through regulation of myosin light chain. J Cell Sci 125:29–36. CrossRef Medline

Lu W, Man H, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, Wang YT (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. Neuron 29:243–254. CrossRef Medline

McCullough J, Colf LA, Sundquist WI (2013) Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway. Annu Rev Biochem 82:663–692. CrossRef Medline

Milbradt J, Kraut A, Hutterer C, Sonntag E, Schmeiser C, Ferro M, Wagner S, Lenac T, Claus C, Pinkert S, Hamilton ST, Rawlinson WD, Sticht H, Couté Y, Marschall M (2014) Proteomic analysis of the multimeric nuclear egress complex of human cytomegalovirus. Mol Cell Proteomics 13:2132–2146. CrossRef Medline

Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Baci Hamilton I, Sundquist WI (2011) ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. Cell Host Microbe 9:235–242. CrossRef Medline

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

Rácz B, Weinberg RJ (2008) Organization of the Arp2/3 complex in hippocampal spines. J Neurosci 28:5654–5659. CrossRef Medline

R Core Team (2013) R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. http://www.R-project.org/.

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

Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL (2008) Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. PLoS One 3:e1997. CrossRef Medline

Shim S, Kimpler LA, Hanson PI (2007) Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. Traffic 8:1068–1079. CrossRef Medline

Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sørensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J (2005) Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. Nat Genet 37:806–808. CrossRef Medline

Sweeney NT, Brenman JE, Jan YN, Gao FB (2006) The coiled-coil protein shrub controls neuronal morphogenesis in Drosophila. Curr Biol 16:1006–1011. CrossRef Medline

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

Urwin H, Authier A, Nielsen JE, Metcalf D, Powell C, Froud K, Malcolm DS, Holm I, Johannsen P, Brown J, Fisher EM, van der Zee J, Bruyland M, Van Broeckhoven C, Collinge J, Brandner S, Futter C, Isaacs AM (2010) Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. Hum Mol Genet 19:2228–2238. CrossRef Medline

van Blitterswijk M, Vlam L, van Es MA, van der Pol WL, Hennekam EA, Dooijes D, Schelhaas HJ, van der Kooi AJ, de Visser M, Veldink JH, van den Berg LH (2012) Genetic overlap between apparently sporadic motor neuron diseases. PLoS One 7:e48983. CrossRef Medline

Xu J, Nonogaki M, Madhira R, Ma HY, Hermanson O, Kioussi C, Gross MK (2012) Population-specific regulation of Chmp2b by Lbx1 during onset of synaptogenesis in lateral association interneurons. PLoS One 7:e48573. CrossRef Medline

## Résumé

Alix (ALG-2 Interacting Protein X) est une protéine cytoplasmique impliquée dans divers processus cellulaires allant de l'apoptose à la cytocinèse en passant par le bourgeonnement des virus, la réparation membranaire et la régulation de la voie endosomale. Toutes ces fonctions sont étroitement associées à l'interaction d'Alix avec ses partenaires impliqués dans la déformation des membranes telles que les endophilines A, Tsg-101 et CHMP4B du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Le but de ce projet est de caractériser le phénotype de la souris Alix ko récemment développée au laboratoire, dans l'espoir de mieux comprendre le rôle physiologique d'Alix. Ces souris, viables et fertiles, sont caractérisées par une microcéphalie apparaissant au cours de l'embryogenèse. Ce phénotype est accompagné d'une apoptose massive touchant les progéniteurs neuronaux durant la neurogenèse et d'une altération du développement de l'arborisation dendritique après la naissance. Les souris adultes présentent également des défauts de plasticité synaptique accompagnés d'une altération du recyclage des vésicules synaptiques. L'ensemble de ces processus repose sur la capacité d'Alix à contrôler le remodelage de la membrane plasmique. Au niveau moléculaire, nos travaux sur les neurones en cultures et sur les fibroblastes montrent une régulation de l'endocytose indépendante de la clathrine (CIE) par Alix et les endophilines A qui pourrait être à l'origine du phénotype neuronal de la souris. Cependant, l'association d'Alix avec CHMP4B du complexe ESCRT pourrait également être nécessaire au développement du système nerveux puisque l'interaction Alix-CHMP4B est nécessaire pour le contrôle de la CIE et de la mort neuronale.

L'ensemble de ces résultats mets en évidence qu'à travers des mécanismes et des partenaires bien caractérisés, Alix est requise pour de nouvelles fonctions nécessaires au développement et au fonctionnement du système nerveux.



## Abstract

Alix (ALG-2 Interacting Protein X) is a cytoplasmic protein implicated in multiple processes including apoptosis, endosome function, membrane repair, viral budding and cytokinesis. Most of these involve modifications of plasma or endosomal membrane organization. Consistent with this, Alix is known to interact with diverse proteins modulating membrane deformation, such as endophilins or Tsg-101 and CHMP4B of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT). By studying the phenotype of Alix ko mice that we recently developed, we aim to better understand the precise role of Alix *in vivo*. These mice are viable and fertile but develop microcephaly even at embryonic stages. This microcephaly is associated with an increase of apoptosis in neural progenitor cells in embryos and a defect in neurite outgrowth at post-natal stages. Later on, these mice also develop defects in synaptic plasticity related to an alteration of synaptic vesicle recycling. All of these processes are tightly dependent on membrane shaping and remodelling. These features of the phenotype can be related to a new function of Alix with endophilin A in the control of clathrin-independent endocytosis (CIE), as described in Alix ko fibroblasts and cultured neurons. However, these defects might also be related to the well-known Alix partner CHMP4B, since we now know that this interaction is needed for controlling CIE and neuronal cell death.

All together, these results shed light on novel functions of Alix in the developing and adult central nervous system, all relying on well-known molecular mechanisms and partners.