



**HAL**  
open science

# Rôle de CHMP2B et du complexe ESCRT-III dans le remodelage dans membranes cellulaires : cas des épines dendritiques

Romain Chassefeyre

► **To cite this version:**

Romain Chassefeyre. Rôle de CHMP2B et du complexe ESCRT-III dans le remodelage dans membranes cellulaires : cas des épines dendritiques. Neurobiologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV049 . tel-01555464

**HAL Id: tel-01555464**

**<https://theses.hal.science/tel-01555464>**

Submitted on 4 Jul 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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Neurosciences/Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Romain CHASSEFEYRE**

Thèse dirigée par **Yves GOLDBERG**

préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences –  
INSERM U836 – Equipe : Neurodégénérescence et Plasticité**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

# Rôle de CHMP2B et du complexe ESCRT-III dans le remodelage des membranes cellulaires : cas des épines dendritiques

Thèse soutenue publiquement le **16 décembre 2013**,  
devant le jury composé de :

**Winfried WEISSEHORN**

Professeur – Université Joseph Fourier – Grenoble, **Président**

**Dominique MULLER**

Professeur – Université de Genève, **Rapporteur**

**Philippe CHAVRIER**

Directeur de recherche – Institut Curie – Paris, **Rapporteur**

**Julie PERROY**

Chercheur CNRS – IGF – Montpellier, **Examineur**

**Yves GOLDBERG**

Chercheur CEA – GIN – Grenoble, **Directeur de Thèse**





## Remerciements

Je voudrais commencer par remercier les membres du jury, Julie Perroy, Philippe Chavier, Dominique Muller et Winfried Weissenhorn pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

J'ai une pensée pour le corps enseignant et administratif de l'Université Joseph Fourier, pour avoir directement ou indirectement contribué à ma progression universitaire. Ce doctorat n'aurait pas non plus été possible sans financement. Je remercie donc l'école doctorale chimie et sciences du vivant de m'avoir accordé une bourse universitaire de trois ans.

Je tiens à remercier tout particulièrement Rémy Sadoul, directeur du laboratoire et Yves Goldberg mon directeur de thèse.

Merci à toi Rémy, pour m'avoir recruté et pour m'avoir fait confiance. Si j'ai obtenu ma bourse c'est probablement grâce à ta ténacité et ton soutien. Même si je le voulais, je crois que je ne pourrais pas oublier certaines soirées au chalet. Je pense que c'est pareil pour toi...

Yves, merci de m'avoir encadré pendant toutes ces années et de m'avoir considéré, dès le début de ma thèse, comme un chercheur à part entière. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Tu m'as laissé gagner en autonomie, tout en étant toujours disponible pour répondre à toutes mes interrogations et me proposer de nouvelles idées.

Gilles, merci de m'avoir encadré avec autant d'implication et de décontraction. Tu as joué un rôle important, surtout dans ma manière d'appréhender la recherche et les manips au quotidien. Trois ans jours pour jours après toi, c'est à mon tour de passer le cap.

L'équipe 2 est vraiment un labo à part. La bonne ambiance et l'esprit d'équipe ont probablement été aussi déterminants que la thématique scientifique, dans mon choix de faire ma thèse au sein du laboratoire.

Je vous remercie tous pour votre accueil et votre contribution à ce travail.

Anne, Christine, Fred, David, Fiona, Chantal, Sandrine, Karine, pour les discussions scientifiques et non scientifiques au coin café, les questions, les conseils...

Karine, que je n'harcèlerai plus avec mes billets de train à la dernière minute.

José, sans qui tout ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Elise et Vincent, mes « petits » M2 à qui je souhaite le meilleur avenir possible en Sciences.

Et à Béa, merci pour ton aide, et merci d'avoir souvent dit tout haut ce que je pensais tout bas.

J'adresse mes amitiés à tous les autres thésards « sadouliens ». Malgré les difficultés de nos thèses respectives, nous avons toujours formé une équipe unie et soudée. Merci à vous de m'avoir conseillé et soutenu, surtout sur la fin.

Marine, tu pourras réintégrer le bureau, tu auras maintenant deux fois moins de chance de bavarder (surveillance Charlotte quand même).

Vincent, les apéros tranquilles du lundi soir vont me manquer.

Mathilde, à qui je souhaite bon vent vers l'Italie.

Charlotte, qui je l'espère, transmettra le flambeau « aux générations futures ».

Et Agnès, Gaëlle et Gilles, les « anciens » que nous n'avons pas oubliés.

Je vous souhaite à tous un excellent avenir professionnel, en sciences, ou ailleurs.

Un grand merci aux collègues thésards du bureau et des autres équipes : Anouk, Marie-Lise, Hélène, Fanny, Mathieu, Alexis, Marc, Maxime...

J'ai aussi une pensée pour tous mes copains de fac, pour toutes ces soirées mémorables, ces parties de tarot à la pause, ces randos nocturnes... Bon courage à tous les thésards et également à ceux qui sont passé du côté obscur de la force. Un merci tout particulier à mes colocs de fin de thèse : Stéphane, Jérôme, Jules (et Lorraine). Avec vos petits plats, j'étais paré pour rédiger le lendemain.

Je tiens à remercier mes parents, Michel et Ghislaine et mon frère Florent, pour leur amour et leur soutien inconditionnel.

Un merci tout particulier pour ma Camille. Grâce à toi, j'ai compris qu'en dehors de la thèse, il y avait la vraie vie, et que c'est finalement ça qui compte le plus. Prépare toi pour de nouvelles aventures à mes côtés, ici, ou ailleurs.

## Abréviations principales

Alix : ALG-2-interacting protein X  
ANR : Agence nationale de la recherche  
ALS : amyotrophic lateral sclerosis (sclérose latérale amyotrophique)  
AMPA : acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque  
ATP : adénosine triphosphate  
BAR : Bin, Amphiphysin, Rvs  
Cep55 : centrosomal protein of 55 kDa  
CHMPs : charged multivesicular body proteins  
DIV : days *in vitro*  
DOC : sodium deoxycholate  
EMV : endosome multivésiculé  
ESCRT : endosomal sorting complex required for transport  
FRAP : fluorescence recovery after photobleaching  
FRET : fluorescence resonance energy transfer  
FTD : frontotemporal dementia (démence fronto-temporale)  
FTLD : frontotemporal lobar degeneration (dégénérescence lobaire fronto-temporale)  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GAP : GTPase activating protein  
GEF : guanine exchange factor  
GFP : green fluorescent protein  
GTP : guanosine triphosphate  
GUV : giant unilamellar vesicle  
HEK : human embryonic kidney  
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
IgG : immunoglobuline G  
IP : immunoprécipitation  
LTD : long-term depression  
LTP : long-term potentiation  
MA : maladie d'Alzheimer  
MAGUK : membrane-associated guanylate kinase  
MALZ : maladie d'Alzheimer et maladies apparentées  
ME : microscopie électronique  
MIM : MIM interacting motif  
MIT : microtubule interacting and trafficking  
MS : mass spectrometry (spectrométrie de masse)  
NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique  
ON : ouverture numérique  
PA : potentiel d'action  
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis (électrophorèse sur gel de polyacrylamide)  
PBS : Phosphate buffered saline

PtdInsP : phosphatidylinositol phosphate  
PPSE : potentiel postsynaptique excitateur  
PSD : postsynaptic density (densité postsynaptique)  
RNAi : RNA interference  
Snf7 : sucrose non-fermenting  
SDS : dodécylsulfate de sodium  
SSC : specific spectral counting  
TBS : Tris-buffered saline  
TDP-43 : TAR DNA-binding protein 43  
Tsg101 : Tumor susceptibility gene 101  
Vps : vacuolar protein sorting  
WT : wild-type (sauvage)

# Sommaire

## **Introduction.....1**

### **1. Rôle des épines dendritiques dans la physiologie neuronale : implication dans les maladies neuropsychiatriques ..... 2**

1.1. Du neurone à la synapse ..... 2

1.2. Epines dendritiques : rôles et fonctionnement ..... 4

1.2.1. Organisation générale et subcellulaire des épines dendritiques ..... 5

1.2.2. Organisation moléculaire..... 7

1.2.3. Aspects morphologiques..... 9

1.2.4. Développement des épines dendritiques..... 12

1.3. Rôle des épines dendritiques dans les phénomènes de plasticité synaptique ..... 15

1.3.1. Découverte de la potentialisation à long terme (LTP)..... 15

1.3.2. Bases moléculaires de la LTP : L'épine dendritique comme élément central dans la plasticité synaptique ..... 16

1.3.3. Acteurs moléculaires de la morphologie des épines dendritiques ..... 20

1.4. Dysfonctionnements des épines dans les pathologies neuropsychiatriques ..... 28

1.4.1. Altérations morphologiques et fonctionnelles des synapses dans les maladies neurologiques ..... 28

1.4.2. L'épine dendritique comme élément déclencheur des maladies neurodégénératives : exemple de la maladie d'Alzheimer..... 30

### **2. ESCRT-III : une machinerie de déformation membranaire ..... 34**

2.1. Déformation et remodelage membranaire..... 34

2.1.1. Le remodelage des membranes est indispensable à la physiologie neuronale 34

2.1.2. Topologies de déformation membranaire..... 35

2.1.3.	Grands mécanismes de remodelage membranaire.....	36
2.1.4.	Fusion et fission membranaire.....	38
2.2.	La machinerie ESCRT : un acteur du tri endolysosomal.....	39
2.2.1.	La voie endolysosomale .....	39
2.2.2.	Découverte des protéines ESCRT .....	42
2.2.3.	Assemblage séquentiel du complexe ESCRT « canonique » (contexte de la formation des EMV).....	43
2.3.	La machinerie ESCRT chez les mammifères : diversification des fonctions et des substrats membranaires .....	47
2.3.1.	Topologie de la déformation membranaire dépendante des ESCRT .....	47
2.3.2.	Processus cellulaires impliquant la machinerie ESCRT.....	50
2.4.	ESCRT-III : le catalyseur de la courbure membranaire.....	54
2.4.1.	Structure des protéines ESCRT-III.....	54
2.4.2.	Les filaments ESCRT-III déforment les membranes .....	57
2.4.3.	Modèles d'assemblage du complexe ESCRT-III .....	61
2.4.4.	Modèles de déformation et de fission membranaire par ESCRT-III.....	63
<b>3.</b>	<b>Machinerie ESCRT et maladies neurodégénératives : des mutations de CHMP2B sont responsables de la démence fronto-temporale.....</b>	<b>67</b>
3.1.	ESCRT et maladies neurodégénératives.....	67
3.2.	CHMP2B et démence frontotemporale (FTD).....	68
3.2.1.	La démence fronto-temporale.....	68
3.2.2.	Mutations de CHMP2B .....	69
3.2.3.	Physiopathologie de la DFT causée par les mutations de CHMP2B .....	70
<b>4.</b>	<b>But de l'étude.....</b>	<b>73</b>

## **Matériel et Méthodes.....77**

<b>1. Plasmides et anticorps.....</b>	<b>79</b>
<b>2. Biologie moléculaire .....</b>	<b>81</b>
<b>3. Biochimie.....</b>	<b>82</b>
<b>4. Biologie cellulaire .....</b>	<b>85</b>
<b>5. Neurones.....</b>	<b>86</b>
<b>6. Microscopie .....</b>	<b>87</b>

## **Résultats.....89**

<b>1. Déformation de la membrane plasmique par la sous-unité CHMP2B.....</b>	<b>91</b>
Article 1 : 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.....	91
<b>2. Rôle de CHMP2B et du complexe ESCRT-III dans la morphogenèse des neurones et des épines dendritiques.....</b>	<b>113</b>
Article 2 : Regulation of post-synaptic function by the dementia-related ESCRT-III subunit CHMP2B .....	113
<b>3. Purification d'interacteurs synaptiques de CHMP2B .....</b>	<b>169</b>
3.1. Objectif et démarche expérimentale .....	169
3.2. Immunoprécipitation(s) de CHMP2B à partir de synaptosomes de rat .....	170
3.2.1. Mise au point des conditions d'IP .....	170
1.1.1. Analyse protéomique par spectrométrie de masse .....	172
1.1.2. Partenaires identifiés.....	173
1.1.3. L'analyse des échantillons par Western-Blot confirme certains des résultats de spectrométrie de masse.....	177

3.3. Chromatographie d'affinité (pull-down).....	178
3.4. Immunoprécipitation à partir de cerveaux de souris knockdown pour CHMP2B	180

## **Discussion .....184**

### **1. Déformation de la membrane plasmique par la sous-unité CHMP2B..... 186**

1.1. CHMP2B s'associe préférentiellement à la membrane plasmique.....	186
1.2. CHMP2B se polymérise en filaments hélicoïdaux .....	186
1.3. Rôle morphogénétique d'un complexe ESCRT-III contenant CHMP2B à la membrane plasmique ?.....	188

### **2. Rôle du complexe ESCRT-III dans la morphogénèse des épines dendritiques.. 190**

2.1. CHMP2B se concentre dans les épines dendritiques.....	190
2.2. CHMP2B s'associe à la membrane plasmique postsynaptique .....	190
2.3. CHMP2B prend part à un complexe ESCRT-III stable et de haut poids moléculaire 192	
2.4. CHMP2B est un élément du squelette postsynaptique .....	195
2.5. Rôle de CHMP2B et du complexe ESCRT-III dans la stabilisation de l'arborisation dendritique et la morphogénèse des épines dendritiques.....	196
2.6. CHMP2B est requis pour la plasticité structurale et fonctionnelle des épines dendritiques .....	197
2.7. Modèle(s) fonctionnel(s).....	199
2.8. Perspectives.....	202

### **3. Conclusion générale (de l'ensemble du travail de thèse) ..... 205**

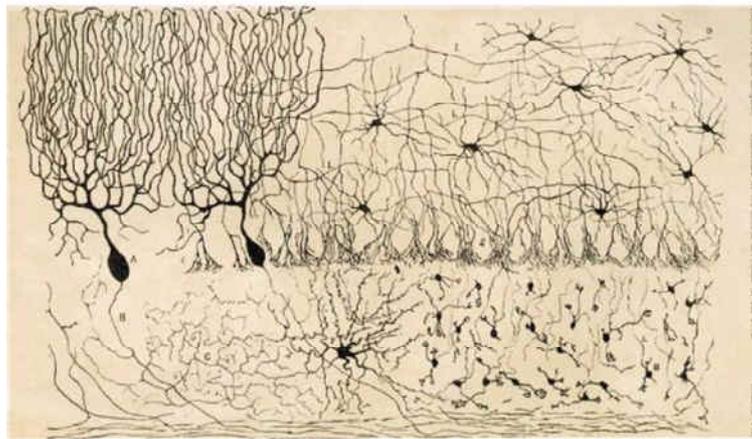
## **Références bibliographiques.....206**

# Introduction

# 1. Rôle des épines dendritiques dans la physiologie neuronale : implication dans les maladies neuropsychiatriques

## 1.1. Du neurone à la synapse

Le neurone est l'unité structurale et fonctionnelle du système nerveux. Cette théorie, sur laquelle reposent toutes les neurosciences modernes, est l'œuvre de Santiago Ramón y Cajal et de ses contemporains, à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle (Cajal, 1888). Cajal optimisa la technique d'imprégnation argentique, mise au point un peu plus tôt par Camillo Golgi, et utilisa des microscopes optiques de pointe, pour démontrer que les neurones sont des entités cellulaires indépendantes et non les fibres d'un seul et même réseau. Les nombreuses planches de Cajal mettent aussi en évidence que les neurones sont des cellules polarisées et extrêmement ramifiées qui forment des contacts entre elles (Figure 1).



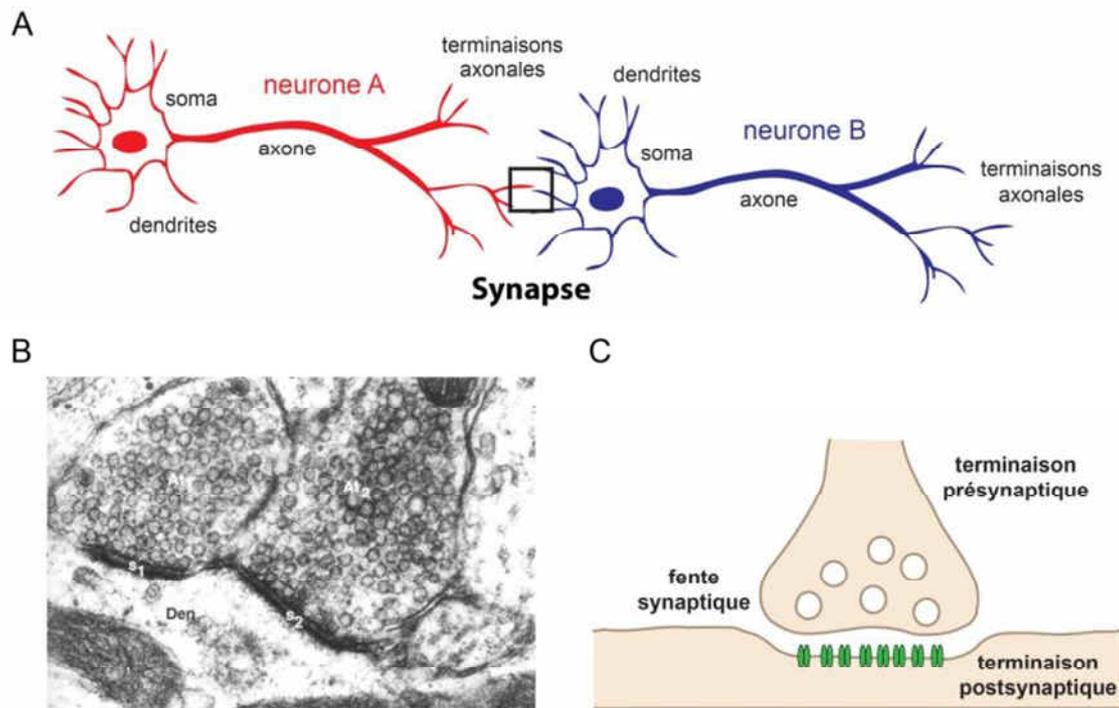
**Figure 1. Santiago Ramón y Cajal, artisan de la théorie neuronale**

Dessin provenant de l'article original publié en 1888 (Cajal, 1888), dans lequel Cajal postula pour la première fois que les cellules du système nerveux sont des entités indépendantes. Cervelet de poussin. Adapté de (Sotelo, 2003).

De la théorie neuronale émerge le concept de synapse, évoqué pour la première fois par Charles Scott Sherrington, en 1897 (Foster and Sherrington, 1897). Selon lui, la présence d'une discontinuité entre deux cellules autorise à penser que les synapses pourraient avoir un rôle fonctionnel, dans la régulation de la propagation des informations nerveuses. Au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, le développement de la microscopie électronique (Palade and Palay, 1954) et les progrès réalisés en neuropharmacologie ont permis de valider le concept de discontinuité synaptique, et de décrire le caractère chimique de la transmission synaptique.

La synapse chimique, telle que nous la définissons aujourd'hui, est la zone de contact fonctionnelle entre deux neurones (Figure 2A). Morphologiquement, elle est constituée de trois éléments : une terminaison présynaptique, une terminaison postsynaptique et, entre les deux, la fente synaptique (Figure 2B et C). La terminaison présynaptique correspond à un renflement de l'axone et se distingue par la présence de petites vésicules. La terminaison postsynaptique est dépourvue de vésicules, mais contient souvent des mitochondries,

nécessaires pour assurer le fonctionnement de la synapse. La fente synaptique, quant à elle, constitue un petit espace, de quelques dizaines de nanomètres, qui sépare les membranes des neurones pré et postsynaptique.



**Figure 2. 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 et un prolongement axonal. La synapse est la jonction qui permet classiquement le passage de l'information nerveuse entre l'extrémité axonale d'un neurone présynaptique (neurone A) et l'extrémité dendritique d'un neurone postsynaptique (neurone B).

(B) Morphologie d'une synapse du système nerveux central observée en microscopie électronique à transmission. At : terminaison axonale, s : fente synaptique, Den : dendrite. Noter la présence des vésicules présynaptique et de la densité postsynaptique. Cortex auditif de rat (x 100 000). (<https://wiki.brown.edu/>)

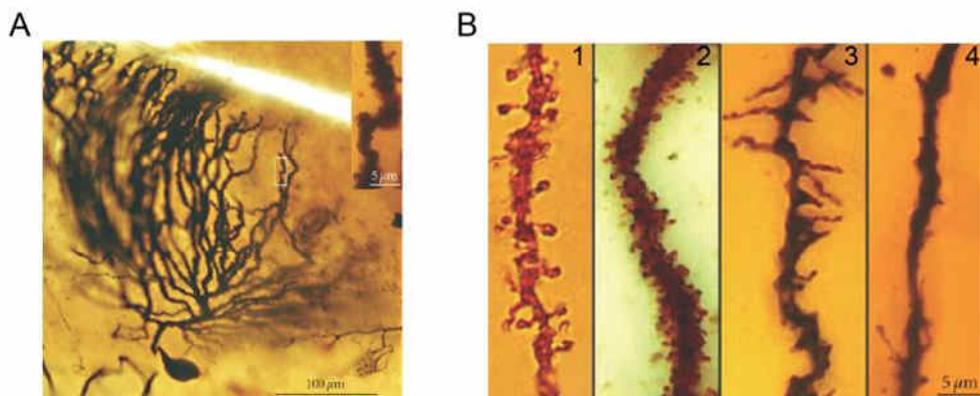
(C) Représentation schématique d'une synapse chimique mettant en évidence terminaison présynaptique, qui contient des vésicules de neurotransmetteurs, la fente synaptique et la terminaison postsynaptique, qui porte les récepteurs aux neurotransmetteurs.

L'information nerveuse se propage de manière électrique le long des neurones, sous forme de potentiels d'action (PA). Lorsque le PA arrive au niveau de la terminaison axonale, la dépolarisation membranaire autorise l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage, et donc l'entrée de calcium. Ce calcium permet la fusion des vésicules présynaptiques avec la membrane plasmique, libérant ainsi de petites molécules, appelées neurotransmetteurs, dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs, en se fixant au niveau de récepteurs postsynaptiques, déclencher l'entrée d'un courant d'ions dans le neurone efférent et modifier localement le potentiel de membrane. Dans le cas d'une synapse excitatrice, la membrane postsynaptique sera électriquement dépolarisée par un influx d'ions  $\text{Na}^+$ , et éventuellement  $\text{Ca}^{2+}$ . La réponse à la libération de neurotransmetteurs se retrouve codée, à nouveau, de

manière électrique dans le neurone postsynaptique. La synapse chimique amène donc une rupture dans la transmission du signal nerveux qui va permettre de nombreuses régulations de l'excitabilité neuronale. Un neurone présynaptique peut libérer, par exemple, plusieurs neurotransmetteurs ou neuromodulateurs, avec des propriétés chimiques différentes. De même, un neurone postsynaptique peut intégrer des signaux au niveau synaptique et répondre avec des amplitudes différentes à une même stimulation. La synapse est donc un élément central dans la régulation du fonctionnement des réseaux neuronaux et du système nerveux en général.

## 1.2. Epines dendritiques : rôles et fonctionnement

Les synapses ont été initialement classées en deux catégories, sur la base de leur morphologie, en microscopie électronique (Gray, 1959a, 1959b). Les synapses dites de type II se forment principalement au niveau du soma ou sur les branches les plus proximales de l'arbre dendritique. Les synapses dites de type I, ou synapses asymétriques, sont représentées dans les régions plus distales de l'arbre dendritique. Elles possèdent un certain nombre de caractéristiques morphologiques, notamment au niveau de la partie postsynaptique. La densité postsynaptique (PSD) est plus développée et la fente synaptique plus large. De plus, la plupart des synapses de type I sont portées, au niveau postsynaptique, par des petites protubérances, qui émergent à la surface des dendrites, appelées épines dendritiques.



**Figure 3. Premières observations des épines dendritiques par Santiago Ramón y Cajal**

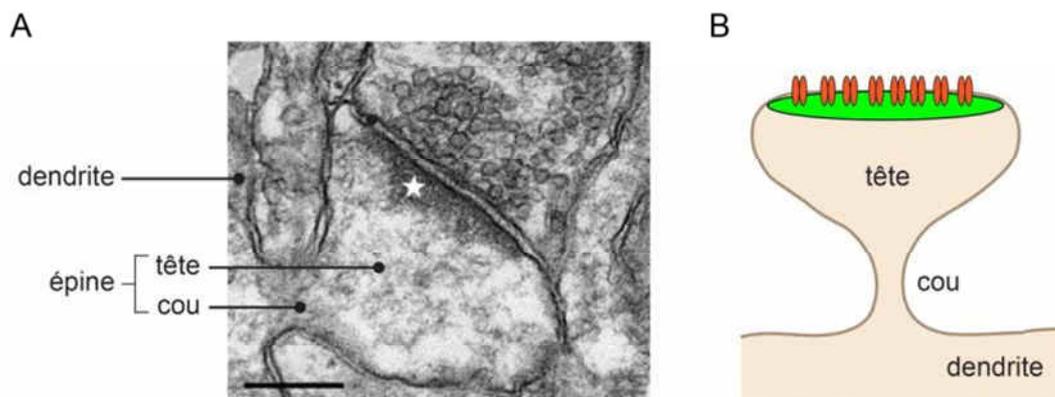
(A) Cellule de Purkinje observée par Cajal à partir d'une préparation histologique de cervelet d'oiseau imprégnée par la méthode de Golgi. L'agrandissement met en évidence des renflements à la surface de la dendrite que Cajal nomma *epinas* (épines).

(B) Epines dendritiques le long de dendrites. Images prises à partir de préparations histologiques colorées par la méthode d'imprégnation de Golgi. 1 : cellule pyramidale, cortex pariétal humain ; 2 : cellule de Purkinje, cervelet de chat ; 3 : cellule en panier, cervelet de chien ; 4 : cellule de Golgi, cervelet de chien. Les épines arborent une grande diversité au niveau de leur forme et de leur densité, selon les types cellulaires. Adapté de (García-López et al., 2010).

Ces structures avaient déjà été observées sur les préparations de Cajal dès 1888 (Cajal, 1888). Il pensait que les épines pouvaient augmenter la surface de la région réceptrice pour faciliter l'échange des informations entre neurones (Figure 3A et B). Il émit aussi l'idée que la morphologie de ces connexions neuronales pouvait être influencée par l'hérédité et l'expérience. Nous allons voir, dans les paragraphes suivants, que les théories de Cajal et de ses contemporains ont été vérifiées et que l'étude des épines dendritiques constitue un champ de recherche très actif en neurosciences.

### 1.2.1. Organisation générale et subcellulaire des épines dendritiques

L'épine dendritique est par définition une petite excroissance de la membrane plasmique de la dendrite. L'épine dendritique « caractéristique » est constituée d'une tête et d'un cou (Figure 4A). La tête mesure de l'ordre du  $\mu\text{m}$  de diamètre. C'est une structure renflée, qui fait face à la partie présynaptique et porte à sa surface des récepteurs aux neurotransmetteurs (Figure 4B). Le cou permet de relier la tête de l'épine au reste de l'arbre dendritique. Il a généralement un diamètre beaucoup plus restreint, de l'ordre de la centaine de nm.



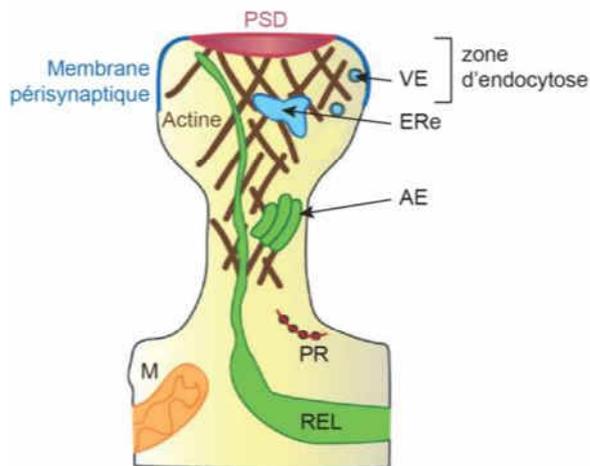
**Figure 4. Morphologie caractéristique d'une épine dendritique**

(A) Image de microscopie électronique à transmission d'une synapse d'un neurone d'hippocampe de rat mettant en évidence la morphologie caractéristique d'une épine dendritique. Echelle : 200 nm. L'étoile représente la densité postsynaptique (PSD). Adapté de (Rostaing et al., 2006).

(B) Représentation schématique d'une épine dendritique. Elles sont constituées d'une tête, qui porte la PSD (en vert) et les récepteurs glutamatergiques, et d'un cou, structure plus fine, qui relie l'épine à la dendrite.

L'observation des épines dendritiques en microscopie électronique (ME) met en évidence que la densité postsynaptique (PSD, postsynaptic density) est particulièrement développée. La PSD est une région dense aux électrons, en ME, donc très sombre, située juste sous la membrane postsynaptique. Elle forme un disque de 400 nm de diamètre et 50 nm d'épaisseur, en moyenne. Elle est constituée d'un maillage très dense de protéines d'ancrage, de récepteurs aux neurotransmetteurs et de protéines d'échafaudage associées. Elle permet notamment de confiner les récepteurs en face de la *zone active* présynaptique, c'est à dire la

région où les vésicules de neurotransmetteurs fusionnent avec la membrane présynaptique (Figure 4A).



### Figure 5. Organisation subcellulaire d'une épine dendritique

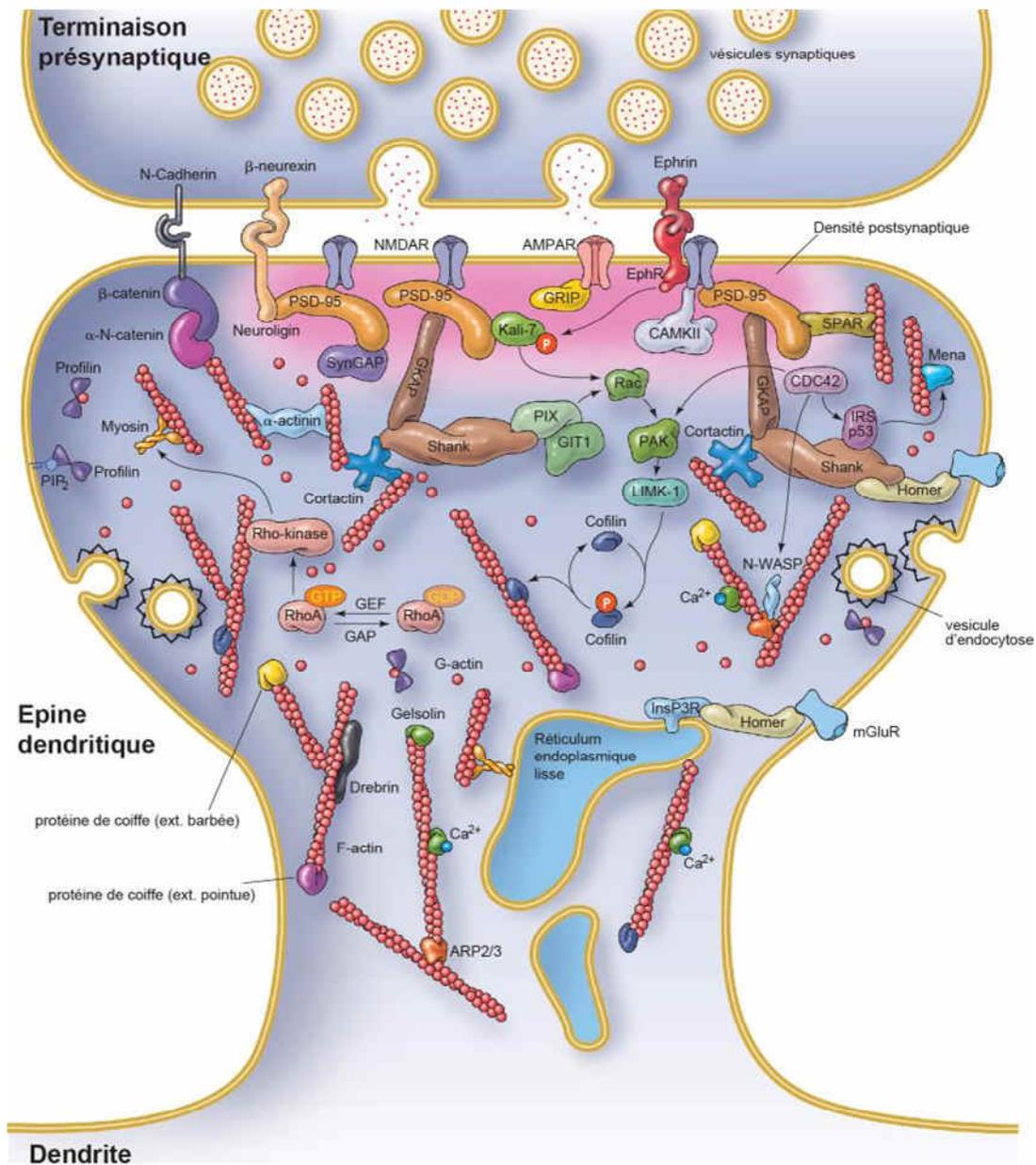
Représentation schématique mettant en évidence les organelles associés aux épines dendritiques. PSD : densité postsynaptique ; VE : vésicule d'endocytose ; ERe : endosome de recyclage ; AE : appareil épineux ; PR : polyribosomes ; REL : réticulum endoplasmique lisse ; M : mitochondrie.

Adapté de (Sheng and Hoogenraad, 2007) .

Les neurones sont des cellules extrêmement étendues et polarisées et les épines dendritiques les plus apicales peuvent se trouver à des centaines de  $\mu\text{m}$  du soma. Les épines disposent donc de toute une série d'organelles délocalisés, qui se situent à proximité, ou à l'intérieur même de la tête de l'épine (Figure 5). Les mitochondries ne rentrent généralement pas dans les épines, mais sont présentes à la base (Popov et al., 2005). Le réticulum endoplasmique lisse (REL) s'étend souvent au travers du cou (Spacek and Harris, 1997). Des polyribosomes (PR) sont également localisés à l'intérieur ou à proximité des épines, ce qui permet une synthèse locale de protéines. Une forme spécialisée du REL, appelée l'appareil épineux (AE) est régulièrement retrouvée dans le cou ou la tête des épines (Spacek and Harris, 1997). Cette structure est formée par un empilement de plusieurs tubules ou citernes du REL. L'appareil épineux est une spécificité des épines dendritiques et semble important pour leur fonctionnement, mais son rôle exact reste encore à découvrir. Environ un tiers des épines contiennent des compartiments liés au trafic endosomal (Cooney et al., 2002; Kennedy and Ehlers, 2006). Nous retrouvons des vésicules d'endocytose à clathrine (VE), des petites vésicules sans clathrine, des endosomes précoces, des endosomes de recyclage (ERe), mais très peu d'endosomes multivésiculés (EMV). La zone d'endocytose a été identifiée en périphérie de la PSD, dans une région membranaire spécialisée appelée zone périssynaptique (Blanpied et al., 2002) (Figure 5). La présence de telles organelles dans l'épine elle-même ou à la base indique que ces dernières disposent de la machinerie de trafic intracellulaire leur permettant d'assurer l'internalisation locale de leurs récepteurs aux neurotransmetteurs, ainsi que les processus de recyclage et d'exocytose. Des endosomes tardifs et lysosomes se trouvent également à proximité immédiate des épines, ce qui autorise également des processus de dégradation des protéines endocytées.

Les épines dendritiques se comportent comme des entités subcellulaires semi-autonomes, capables de modifier leur contenu en protéines, au niveau local, et disposant du soutien métabolique des mitochondries à proximité. Les épines sont donc équipées pour répondre rapidement à des changements d'activité ou de connectivité neuronale.

## 1.2.2. Organisation moléculaire



**Figure 6. Organisation moléculaire d'une épine dendritique**

Représentation schématique mettant en évidence l'organisation moléculaire d'une épine dendritique. Notez la présence de récepteurs aux neurotransmetteurs et protéines d'ancrage transmembranaires. La PSD (en rose) contient également des protéines d'échafaudage (PSD-95, Shank...). Le cytosquelette d'actine et ses régulateurs sont omniprésents et en relation étroite, aussi bien structurellement, que fonctionnellement, avec les protéines la PSD. Adapté de (Calabrese et al., 2006).

Les épines dendritiques sont une caractéristique de la synapse excitatrice, dite synapse glutamatergique, car le neurotransmetteur libéré est le glutamate. Même si, dans le système nerveux central adulte, la majorité des synapses glutamatergiques sont portées par des épines dendritiques, il est important de noter, qu'elles peuvent aussi se former directement sur les

branches dendritiques (synapses présentées dans la [Figure 2C](#)). A l'inverse, les synapses inhibitrices, ou GABAergiques, se font presque exclusivement directement sur le soma ou les branches dendritiques. Bien que le phénomène semble marginal, il semblerait que certaines épines puissent recevoir des signaux GABAergiques en combinaison avec des signaux glutamatergiques ([Chiu et al., 2013](#)).

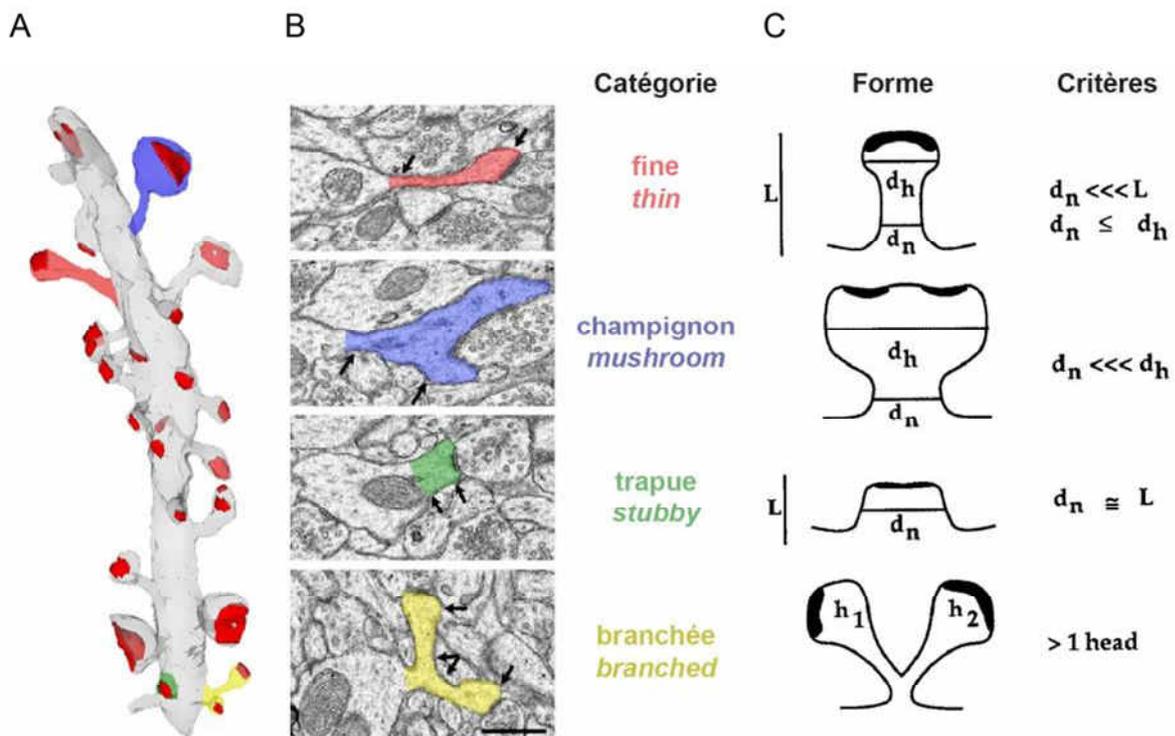
En tant que compartiment postsynaptique, les épines dendritiques expriment plusieurs types de récepteurs aux neurotransmetteurs spécifiques du glutamate. La transmission excitatrice est assurée par des récepteurs ionotropiques ou récepteurs canaux, principalement de la famille des récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino -3-hydroxy -5-méthyl -4-acide isoxazolepropionique) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Ces récepteurs transmembranaires sont principalement enrichis dans la partie membranaire de la PSD, c'est à dire celle qui fait face à la zone active présynaptique. Ils sont confinés au sein de la PSD via des interactions intermoléculaires avec des protéines d'échafaudage cytoplasmiques. Les membranes postsynaptique et pérисynaptique contiennent également des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR), des récepteurs à activité tyrosine-kinase, des canaux ioniques, ainsi que des molécules d'adhérence intercellulaire ([Figure 6](#)).

Il est aisé de purifier la PSD à partir de synaptosomes isolés du tissu cérébral de mammifères ([Carlin et al., 1980](#)). De nombreux groupes se sont donc intéressés à sa composition, en utilisant diverses techniques de protéomique. Les analyses en spectrométrie de masse les plus récentes estiment que la PSD contient de quelques centaines à un millier de protéines totales. L'identification des principaux composants a permis d'étudier plus spécifiquement les interactions et l'organisation moléculaire au sein de la PSD. Les principales protéines d'échafaudage associées aux récepteurs sont donc PSD-95, GKAP, Shank et Homer. Le cytosquelette d'actine apparaît également comme un constituant essentiel des épines dendritiques. L'actine filamenteuse (actine-F) est présente dans la tête et le cou. Les filaments s'associent à la membrane plasmique, aux protéines d'échafaudage de la PSD et aux compartiments intracellulaires, par l'intermédiaire de nombreuses protéines se liant à l'actine (Cortactine, Arp2/3,  $\alpha$ -actinine, cofiline, N-WASP, protéines de coiffe...) ([Hotulainen and Hoogenraad, 2010](#)). Nous verrons, dans la suite de ce manuscrit, que ces protéines régulent également la dynamique d'assemblage du cytosquelette d'actine, un mécanisme essentiel au fonctionnement et au maintien de la morphologie des épines ([Figure 6](#)).

Les épines dendritiques contiennent aussi des protéines cytoplasmiques impliquées dans des phénomènes de transduction du signal. Des dizaines de voies de signalisation existent dans les épines et impliquent de nombreuses protéines kinases (CAMKII, Rho-kinase, Pyk2...) et protéines phosphatases (PP1, Calcineurine...). Les petites protéines G sont fortement représentées (familles Ras, Rho, Rac, Rap, Arf...), ainsi que leurs facteurs d'échange (Kalirin, Tiam...) et d'activité GTPase (SynGAP, SPAR...). La plupart de ces voies de signalisation découlent de l'activation des récepteurs au glutamate par les neurotransmetteurs. Elles entraînent en réponse des modifications de l'activité de ces mêmes récepteurs. Elles régulent aussi les phénomènes de synthèse, de recyclage et de dégradation de protéines au niveau local ainsi que la dynamique d'assemblage des filaments d'actine ([Figure 6](#)).

### 1.2.3. Aspects morphologiques

Les épines dendritiques ont été observées chez un grand nombre d'espèces et sur un grand nombre de types neuronaux (cellules de Purkinje, cellules pyramidales du cortex, neurones pyramidaux de l'hippocampe, cellules granulaires du gyrus denté...). Elles sont présentes à une densité qui peut dépasser 5 épines par  $\mu\text{m}$  de segment dendritique. A partir de ses préparations histologiques, Cajal avait déjà été en mesure d'identifier des différences de morphologie et de densité des épines dendritiques entre espèces, mais également entre régions cérébrales, au sein d'une même espèce (Figure 3B). Plus généralement, il a mis en évidence que la distribution et la morphologie des épines dendritiques n'étaient pas homogènes, le long de l'arbre dendritique d'un seul et même neurone. Ses travaux, et ceux de ses contemporains, ont progressivement amené l'hypothèse que la morphologie de ces structures pouvait être un élément important, jouant un rôle dans le fonctionnement du système nerveux.



**Figure 7. Diversité de forme et de taille des épines dendritiques**

(A) Reconstruction tridimensionnelle d'une dendrite de neurone d'hippocampe représentant la diversité morphologique des épines dendritiques : champignon (*bleu*), fine (*rouge*), trapue (*vert*) et branchée (*jaune*). La taille (le diamètre) de la PSD est également extrêmement variable (*rouge*).

(B) Images de microscopie électronique à transmission illustrant les différences de taille et de forme des épines. Le code couleur est le même que pour (A). Adapté de (Bourne and Harris, 2008).

(C) Représentation schématique des quatre catégories d'épines dendritiques accompagnée des critères de classification : L (longueur),  $d_n$  ( $\varnothing$  du cou),  $d_h$  ( $\varnothing$  de la tête). Adapté de (Harris et al., 1992).

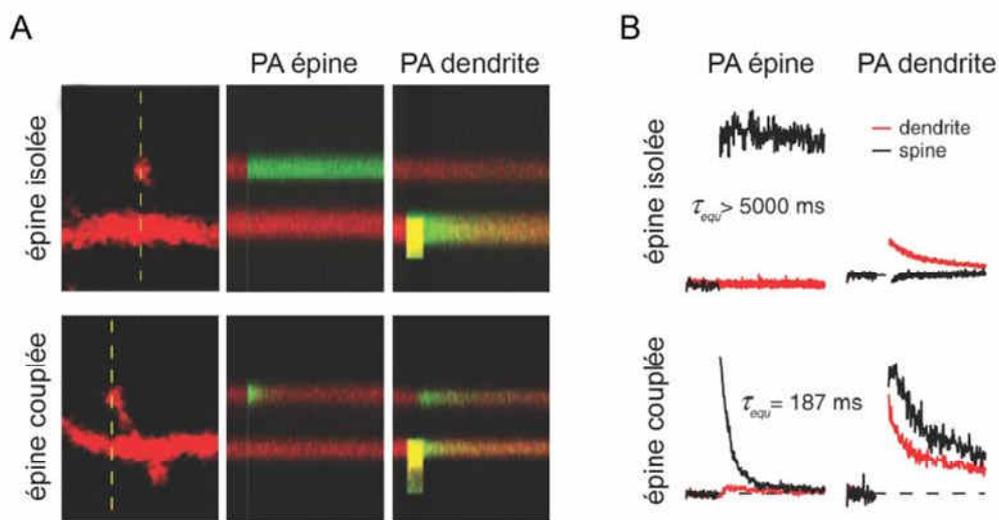
Les observations ultrastructurales ont permis d'identifier les épines dendritiques comme des éléments postsynaptiques (Gray, 1959a, 1959b), de vérifier l'hypothèse d'une diversité morphologique le long des dendrites, puis de les classer en différentes catégories en fonction

de leur taille et de leur forme (Jones and Powell, 1969). La convention actuelle compte quatre grandes catégories. La classification est maintenant beaucoup plus aisée, grâce aux reconstructions tridimensionnelles des dendrites autorisées par la microscopie confocale (Figure 7A) et à l'amélioration des techniques de microscopie électronique (Figure 7B). Les épines fines (« thin »), les plus abondantes, ont une petite tête et un long cou fin. Les épines champignon (« mushroom »), sont celles que nous avons considérées comme épines caractéristiques jusqu'ici. Elles sont caractérisées par une tête de gros diamètre. Les épines trapues (« stubby ») sont dépourvues de cou, et enfin, les épines branchées (« branched ») sont celles qui possèdent plusieurs têtes (Harris et al., 1992) (Figure 7C). Bien que cette classification soit très pratique et encore largement utilisée actuellement, il faut garder à l'esprit que les épines obéissent à un continuum morphologique et qu'il existe de nombreuses formes intermédiaires.

Il semble évident qu'il existe une corrélation étroite entre la morphologie des épines dendritiques et leur fonction. La taille de la PSD (ou « zone synaptique ») est directement proportionnelle au volume de la tête (Freire, 1978). Les épines champignon ont une PSD plus développée que les épines fines (Figure 7A). Il existe une corrélation étroite entre la taille de la PSD et le nombre de récepteur au glutamate de type AMPA. Le volume de la tête est donc lié au nombre de récepteurs postsynaptiques, ce qui suggère une corrélation entre la morphologie de l'épine dendritique et l'efficacité de la transmission synaptique (Kasai et al., 2003). Nous reviendrons plus en détails sur la relation bidirectionnelle qui existe entre morphologie des épines et efficacité de transmission du message nerveux dans la partie concernant la plasticité synaptique.

Un autre point important, dans la relation structure-fonction des épines dendritiques concerne les propriétés structurales du cou. La diffusion de marqueurs solubles entre la tête de l'épine et l'arbre dendritique est beaucoup plus lente que dans les dendrites elles-mêmes (Bloodgood, 2005) (Figure 8A). Les propriétés de diffusion des marqueurs entre l'épine et la dendrite sont, par contre, considérablement différentes d'une épine à l'autre (Figure 8A et B). Il a donc été supposé que le diamètre ou la longueur du cou pouvaient jouer un rôle essentiel dans la diffusion des molécules et des signaux électriques entre la tête de l'épine et la dendrite. La stimulation des récepteurs postsynaptiques est accompagnée par l'entrée d'ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), la production ou libération de seconds messagers ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{IP}_3$ ...) et la mise en place de cascades de signalisation au niveau de la tête de l'épine (CAMKII...) qui vont permettre des modifications du fonctionnement des synapses (voir paragraphe 1.3 pour plus de détails concernant les cascades de signalisation). La régulation de la diffusion au travers du cou est donc un paramètre essentiel permettant aux épines de répondre de manière indépendante aux stimuli postsynaptiques. Le développement de la microscopie biphotonique et des sondes fluorescentes photoactivables a permis de s'intéresser aux phénomènes de diffusion sur des neurones vivants (neurones isolés, tranches organotypiques ou *in vivo*). Il a été montré qu'il existe une corrélation bidirectionnelle entre l'activité neuronale et les propriétés de diffusion au travers du cou. La stimulation des récepteurs postsynaptiques au glutamate diminue la diffusion de molécules solubles du cou vers la dendrite (Bloodgood, 2005). Le  $\text{Ca}^{2+}$  provenant de la stimulation des récepteurs NMDA postsynaptiques se propage plus ou moins vers la

dendrite en fonction de la géométrie du cou (Noguchi et al., 2005). Le cou de l'épine participe donc à faire de l'épine dendritique un compartiment isolé sur le plan biochimique. Cette compartimentalisation a le double avantage, de permettre à des réactions chimiques de se faire au niveau local, et de prévenir la diffusion de molécules potentiellement toxiques pour le neurone, comme le calcium. Il est important de noter que le cou est une structure très fine (quelques centaines de nm), à la limite de la résolution offerte par la microscopie optique et souvent altérée par les techniques de fixation associées à la microscopie électronique. Il est donc difficile d'établir la corrélation directe entre une restriction de diffusion et un rétrécissement du diamètre du cou. Il est également possible que les modifications des propriétés de diffusion passent par des mouvements d'organelles ou des changements de la densité en protéines à l'intérieur du cou, sans changement de diamètre.



**Figure 8. Le cou de l'épine dendritique forme une barrière de diffusion aux protéines solubles**

(A) Des tranches organotypiques d'hippocampe ont été transfectées avec la GFP photactivable (PAGFP) et du DsRed. Les neurones sont imagés in vivo avec un microscope biphoton. La fluorescence du DsRed (rouge) permet de reconstruire l'architecture du neurone (gauche). La PAGFP (vert) est photoactivée (PA) avec un laser à 720 nm soit au niveau de l'épine (milieu), soit au niveau de la dendrite sous-jacente (droite). Le devenir de la PAGFP en fonction du temps est suivi le long de la ligne pointillée (temps total 1,5 min).

(B) Quantifications associées à l'expérience (A), indiquant les constantes d'équilibre.

Adapté de (Bloodgood, 2005).

Une autre fonction des épines, dépendante de leur morphologie, pourrait être la compartimentalisation électrique. Il a été proposé que l'épine se comporte électriquement comme un câble. Le courant envahit la tête de l'épine sans atténuation, alors que la résistance générée par le cou diminue l'amplitude des potentiels postsynaptiques excitateurs qui se propagent vers la dendrite (Tsay and Yuste, 2004). Lors de la stimulation d'une seule épine par la technique du « glutamate uncaging », l'amplitude des potentiels mesurés au soma est inversement proportionnelle à la longueur du cou de l'épine (Araya et al., 2006a). Les épines qui possèdent un très long cou sont même considérées comme silencieuses électriquement. L'indépendance électrique pourrait expliquer pourquoi les inputs excitateurs s'additionnent linéairement lorsqu'ils sont générés sur des épines dendritiques alors qu'au niveau de l'arbre

dendritique, chaque potentiel a tendance à altérer les potentiels voisins (Araya et al., 2006b). Cette intégration linéaire pourrait favoriser le développement des potentiels d'action au niveau du soma et donc jouer un rôle fondamental dans la transmission des messages nerveux excitateurs.

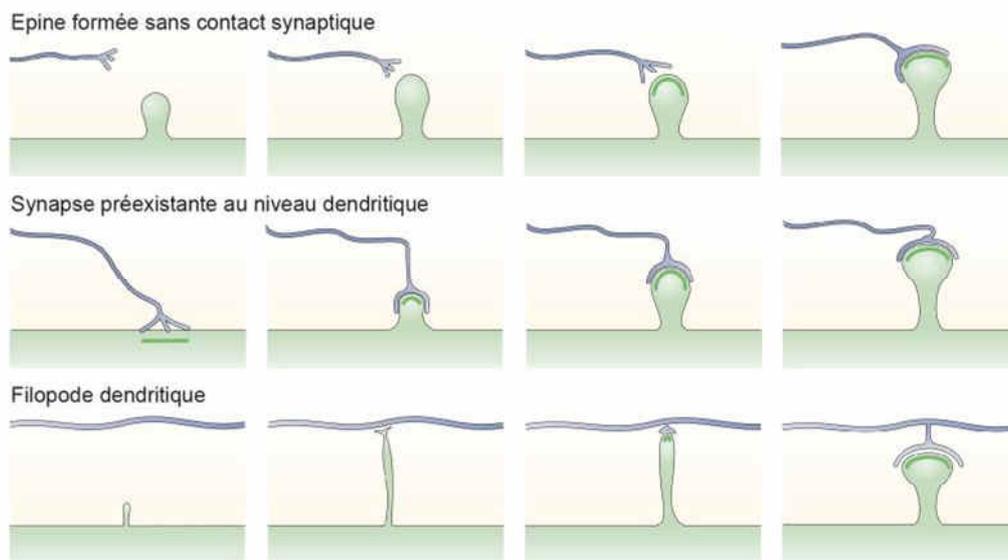
Les épines dendritiques peuvent être considérées comme de véritables compartiments membranaires isolés à la fois spatialement, biochimiquement et électriquement du reste du neurone. Ces structures sont absentes sur certains types neuronaux (interneurones) et surtout très peu développées chez les organismes inférieurs (*C. elegans*, *D. melanogaster*), ce qui suggère qu'elles jouent un rôle fonctionnel important dans l'établissement de mécanismes neuronaux complexes.

#### 1.2.4. Développement des épines dendritiques

Nous avons vu précédemment que les épines dendritiques arborent une grande diversité morphologique et que nous pouvons les classer en différentes catégories. Cette vision « statique » des épines ne reflète pas complètement ce qui se passe réellement *in vivo*. En effet, les épines dendritiques ont la particularité d'être des éléments très dynamiques. Elles peuvent changer de morphologie, apparaître et disparaître, même chez les organismes adultes. Au contraire, dans certaines circonstances, elles peuvent s'avérer remarquablement stables et rester en place durant toute la durée de vie de l'individu (Grutzendler et al., 2002). Les premières indications de cette dynamique datent de l'époque des découvertes de Cajal. Demoor et Stefanowska furent les premiers à mettre en évidence que les « protrusions dendritiques » pouvaient changer de forme et de taille durant la vie de l'individu et que cela avait une influence sur la connectivité neuronale (Demoor, 1896; Stefanowska, 1897). Dans cette partie, nous allons nous intéresser principalement aux mécanismes associés au développement de nouvelles épines dendritiques. Les changements morphologiques et la stabilisation à long terme, chez les organismes adultes, seront abordés dans la partie 1.3.3.

Les épines dendritiques apparaissent très tôt durant le développement postnatal, juste après que les branchements dendritiques se soient formés. Il existe trois grands modèles de développement des épines (ou spinogénèse) (Figure 9). Le premier provient d'études réalisées sur les cellules de Purkinje du cervelet. Il prétend que la spinogénèse est un phénomène intrinsèque de la partie postsynaptique. Les épines émergent de la dendrite, puis mûrissent sans que le contact avec la partie présynaptique ne se soit encore formé (Sotelo, 1990). Les deux autres modèles ont été établis à partir d'études sur des neurones pyramidaux. Le second propose que les épines émergent à partir de synapses préexistantes au niveau des branches dendritiques (Miller and Peters, 1981). Dans ce modèle la formation de l'épine est dépendante de l'extrémité axonale, qui vient former une synapse directement sur la branche dendritique. La partie postsynaptique finit par changer de morphologie pour donner une épine. Le troisième modèle est basé sur l'émergence de fines projections appelées, filopodes dendritiques, à la surface de la dendrite. Les filopodes dendritiques viennent ensuite au contact de l'extrémité axonale, puis ils mûrissent en épines dendritiques (Dailey and Smith,

1996; Ziv and Smith, 1996). De nombreuses observations suggèrent que ces trois modèles coexistent et sont impliqués de manière préférentielle, selon le degré de maturation des neurones ou l'âge de l'animal. Nous allons néanmoins nous focaliser, dans la suite de cet exposé, sur les filopodes dendritiques qui constituent maintenant le modèle le plus étudié.



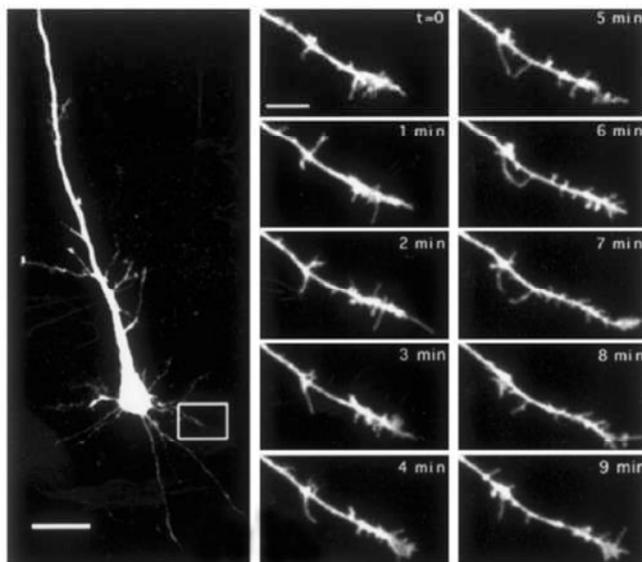
**Figure 9. Les trois grands modèles de spinogénèse**

Représentation schématique des trois grands modèles de formation des épines dendritiques : une épine émerge de manière indépendante de l'extrémité présynaptique (haut) ; une synapse préalablement formée sur le shaft dendritique mûrit en épine (milieu) ; un filopode dendritique contacte une extrémité axonale et mûrit ensuite en épine (bas). Adapté de (Yuste and Bonhoeffer, 2004).

Durant les premiers jours de vie postnatale, les dendrites sont majoritairement recouvertes de fines protrusions appelés filopodes dendritiques. Durant les semaines qui suivent (en ce qui concerne les modèles murins), le nombre de filopodes diminue et certains commencent à arborer une tête renflée, semblable à celle d'une épine fine. La maturation et le gonflement des épines se poursuivent en fonction des expériences cognitives, sensorielles et motrices que subit l'individu, pour aboutir à la diversité morphologique que nous connaissons. Le nombre global d'épines matures demeure ensuite constant à l'âge adulte (voir Figure 16). Cependant, bien que la dynamique soit fortement réduite, les connexions synaptiques restent modulables, avec une proportion conséquente d'épines qui apparaissent ou disparaissent continuellement (De Roo et al., 2008; Zuo et al., 2005).

Il existe une relation évidente entre la formation des épines (spinogénèse) et la formation des connexions neuronales (synaptogénèse). De nombreuses observations suggèrent que les filopodes dendritiques jouent un rôle très important dans ces deux mécanismes. Ils se distinguent des épines par leur longueur (supérieure à 2  $\mu\text{m}$ ) et l'absence de tête. Des expériences de vidéo-microscopie, sur des neurones vivants ont permis de montrer que les filopodes dendritiques sont des structures extrêmement motiles, qui s'étendent et se rétractent sans cesse, et très rapidement (Figure 10) (Portera-Cailliau et al., 2003). Les filopodes

dendritiques sont capable de former des contacts avec les extrémités terminales des axones et ceux-ci peuvent aboutir à la formation d'épines et de synapses matures (Dailey and Smith, 1996). Bien que les épines dendritiques semblent capables d'émerger directement à partir des dendrites (Kwon and Sabatini, 2011), les filopodes dendritiques sont considérés comme les précurseurs ontogénétiques des épines. Il est important de noter que les filopodes dendritiques sont émis aussi bien par les neurones épineux que par les neurones non épineux. Certaines études suggèrent qu'il existe deux populations de filopodes, une située à l'extrémité terminale des dendrites, qui donnera naissance aux futurs branchements dendritiques et une située le long des dendrites, qui donnera naissance aux épines dendritiques (Portera-Cailliau et al., 2003). Les filopodes dendritiques semblent donc impliqués de manière générale dans la morphogénèse neuronale. Leur fonction supposée est d'agir comme des senseurs de l'environnement. Un des enjeux actuels est de comprendre quels sont les mécanismes moléculaires et les signaux qui conduisent à maturation d'une certaine proportion de filopodes en épines. Comme l'indiquent certaines études récentes, ces mécanismes pourraient être dépendants de l'activité neuronale et/ou de l'association physique avec l'extrémité axonale, via des molécules d'adhérence (Ethell and Pasquale, 2005; De Roo et al., 2008).



**Figure 10. Les filopodes dendritiques sont des structures extrêmement motiles dans les neurones postnataux**

Vidéo-microscopie réalisée avec un microscope biphotonique sur des neurones pyramidaux du cortex visuel d'une souris âgée de 2 jours. Les neurones sont marqués avec le marqueur soluble Alexa-488. Notez que le temps de demi-vie des filopodes dendritiques est très restreint, ils ne font qu'apparaître et de rétracter durant les 10 min de l'expérience.

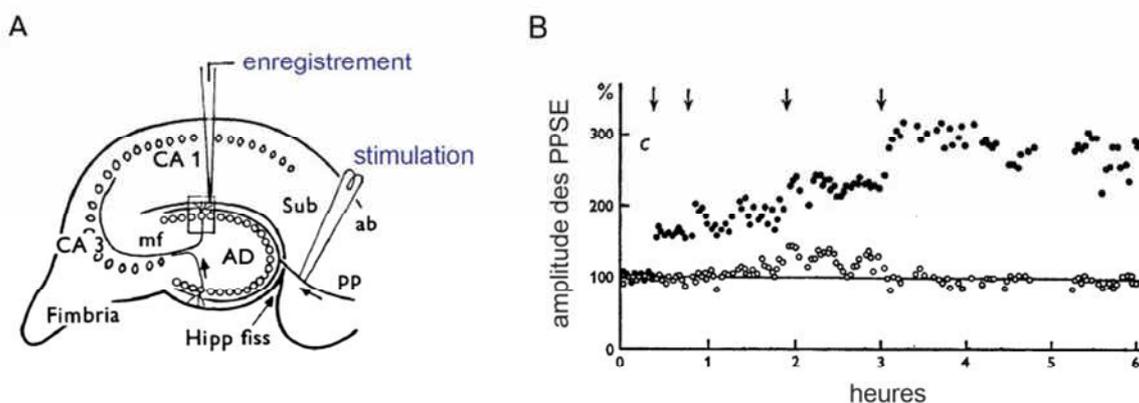
Adapté de (Portera-Cailliau et al., 2003).

Les filopodes dendritiques sont principalement constitués d'actine filamenteuse. Les mécanismes de pousse, de rétraction et de gonflement du filopode, lorsqu'il contacte une extrémité axonale, font tous appel à la dynamique de polymérisation, ainsi qu'aux réarrangements du cytosquelette d'actine (Ethell and Pasquale, 2005). Ces mécanismes moléculaires seront décrits dans la partie 1.3.3, relative aux changements de morphologie des épines dendritiques. Nous verrons qu'un certain nombre de ces mécanismes sont impliqués d'une manière plus générale dans la plupart des mécanismes de morphogénèse neuronale.

## 1.3. Rôle des épines dendritiques dans les phénomènes de plasticité synaptique

### 1.3.1. Découverte de la potentialisation à long terme (LTP)

La plasticité synaptique se définit comme la capacité des synapses à modifier leurs propriétés de transmission, en fonction de l'usage qui en est fait. C'est un moyen supposé pour le système nerveux adulte, d'apprendre de nouvelles tâches, de mémoriser des informations et de faire face aux altérations. La première preuve de l'existence d'un mécanisme de plasticité induisant des modifications synaptiques durables a été identifiée dans l'hippocampe, avec la découverte de la potentialisation à long terme (LTP) (Bliss and Lomo, 1973). Bliss et Lomo ont travaillé sur le lapin anesthésié chez lequel des électrodes de stimulation avaient été implantées au niveau de la voie perforante (PP) et des électrodes d'enregistrement au niveau du gyrus denté (AD) (Figure 11A). Ils ont montré qu'une stimulation ponctuelle à haute fréquence (15 Hz, 10 secondes, même amplitude) avait tendance à augmenter de manière prolongée l'amplitude des potentiels postsynaptiques excitateurs évoqués (PPSE) au niveau du gyrus denté (Figure 11B). L'amplitude des PPSE se retrouvait potentialisée pendant plusieurs heures, même après le retour à une fréquence de stimulation normale (1Hz), d'où le nom de potentialisation à long terme.



**Figure 11. La potentialisation à long terme dans l'hippocampe**

(A) Représentation schématique d'une section coronale de l'hippocampe. L'électrode de stimulation est située au niveau de la voie perforante provenant du cortex entorhinal (PP). L'électrode d'enregistrement est localisée au niveau de la couche moléculaire du gyrus denté (AD).

(B) Graphe représentant l'amplitude de PPSE mesurés dans la couche moléculaire du gyrus denté, en fonction du temps. Les cercles pleins correspondent à la voie potentialisée et les cercles vides au contrôle ipsilatéral. Chaque point correspond à la moyenne de trente réponses. La ligne de base (100%) correspond aux PPSE évoqués par le stimulus test préalable à la potentialisation. Une stimulation téτανique (15 Hz, 10 sec) est appliquée à 4 reprises (flèches). La condition contrôle se subit pas de stimulation téτανique.

Adapté de (Bliss and Lomo, 1973).

La LTP est un équivalent biologique de la théorie de l'apprentissage de Hebb, qui postule que la connexion synaptique est renforcée si les deux neurones sont activés en même temps (Hebb, 1949). Depuis sa découverte dans l'hippocampe, la LTP a été mise en évidence dans

d'autres régions cérébrales (autres voies excitatrices de l'hippocampe, différentes aires du cortex, amygdale, cervelet) et certains pensent qu'elle constitue un mécanisme généralisable à toutes les synapses excitatrices du cerveau. La découverte du phénomène de potentialisation dans l'hippocampe, une région qui joue un rôle central dans la mémoire, et le fait que cette potentialisation perdure dans le temps, ont tout de suite suggéré que la LTP de l'hippocampe pouvait avoir un rôle à jouer dans les processus de mémorisation. Les expériences de Morris fournirent la première indication que la LTP était impliquée dans mémorisation de nouvelles informations (Morris et al., 1986). Il s'est appuyé sur le fait que l'hippocampe joue un rôle important dans la mémorisation spatiale. Il a montré que chez des rats, l'injection intraventriculaire d'AP5, un antagoniste des récepteurs NMDA, induisait aux mêmes doses, le blocage de la LTP et une perte de performance des animaux lors d'une tâche de mémorisation spatiale, la désormais célèbre piscine de Morris. Les travaux de Whitlock ont montré, plus récemment, que des tâches d'apprentissage spatial, chez des rats, avaient le même effet sur l'amplitude des PPSE, dans la région CA1 de l'hippocampe, que la stimulation à haute fréquence (Whitlock et al., 2006). Le rôle « physiologique » de la LTP, dans certains processus de mémorisation, est donc désormais établi.

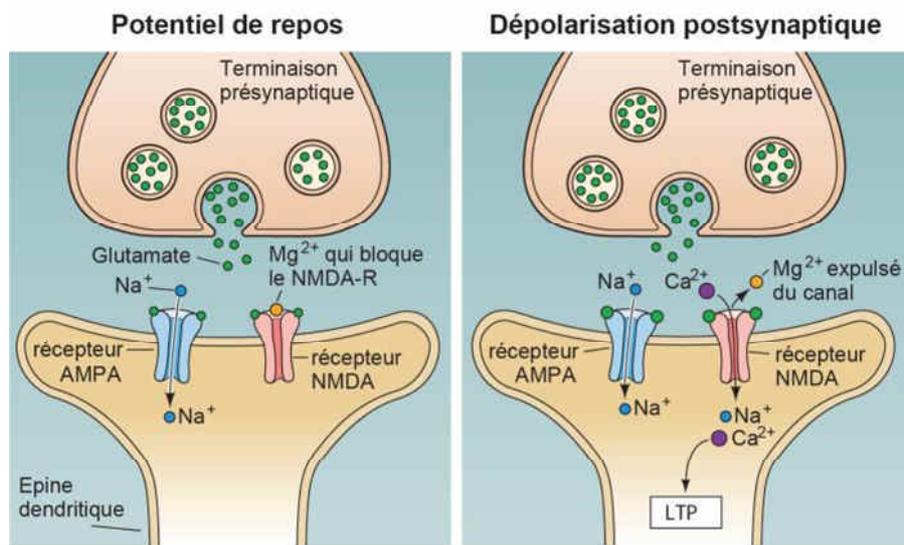
La LTP est largement étudiée actuellement et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, d'un point de vue comportemental et cognitif, pour son importance dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Comme nous allons le voir, la LTP induit aussi des modifications fascinantes sur le plan synaptique. Tout un domaine de recherche s'intéresse aux mécanismes moléculaires qui sous-tendent la LTP, et la plasticité synaptique en général. La LTP est également une cible thérapeutique en clinique, dans l'optique de diminuer les troubles cognitifs associés aux maladies neurodégénératives.

La LTP ne découle pas d'un mécanisme unique de plasticité synaptique. C'est une dénomination générale qui regroupe les mécanismes de plasticité qui ont tendance à augmenter la force synaptique. Il existe probablement des variantes de la LTP, en fonction des régions cérébrales et de la manière dont elle se met en place. A l'inverse certaines synapses peuvent aussi diminuer de manière prolongée leur capacité à transmettre de l'information. Ce mécanisme s'appelle la dépression à long terme (LTD) et fait appel à des mécanismes similaires à la LTP. Nous allons maintenant nous intéresser aux bases moléculaires de la LTP/LTD et aux rôles qu'elles jouent dans l'induction et le maintien à long terme des modifications de l'activité synaptique.

### ***1.3.2. Bases moléculaires de la LTP : L'épine dendritique comme élément central dans la plasticité synaptique***

Dans de nombreux cas, la LTP est dite dépendante du récepteur postsynaptique au glutamate de la famille NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Bliss and Collingridge, 1993). De nombreuses études ont montré que le blocage de ce récepteur, avec des antagonistes comme l'AP5, n'avaient pas d'effet sur les PPSE, mais empêchaient la potentialisation (Collingridge et al., 1983). Le rôle du récepteur NMDA provient de sa perméabilité au  $Ca^{2+}$  et du blocage de son

canal, sous la dépendance du voltage, par l'ion  $Mg^{2+}$ . Pour que le récepteur NMDA laisse rentrer du  $Ca^{2+}$  dans la partie postsynaptique (c'est à dire généralement une épine dendritique), deux phénomènes doivent coïncider. D'une part, la membrane postsynaptique doit être suffisamment dépolarisée pour entrainer l'expulsion du  $Mg^{2+}$ . D'autre part, du glutamate doit être relargué dans la fente synaptique pour permettre l'ouverture du récepteur-canal. L'augmentation de fréquence des inputs due à la stimulation tétanique permet de faire coïncider temporellement ces deux phénomènes. Les trains de potentiels d'actions qui arrivent au niveau de la terminaison présynaptique vont entrainer une libération continue de glutamate dans la fente synaptique. Ce glutamate va activer les récepteurs de la famille AMPA, qui vont laisser entrer massivement du  $Na^+$ , et ainsi dépolariser la membrane postsynaptique de manière prolongée et laisser massivement entrer du  $Na^+$ . Cette dépolarisation, associée à la présence de glutamate dans la fente synaptique, permet d'ouvrir le récepteur NMDA et de faire rentrer du  $Ca^{2+}$  dans la partie postsynaptique (Figure 12).

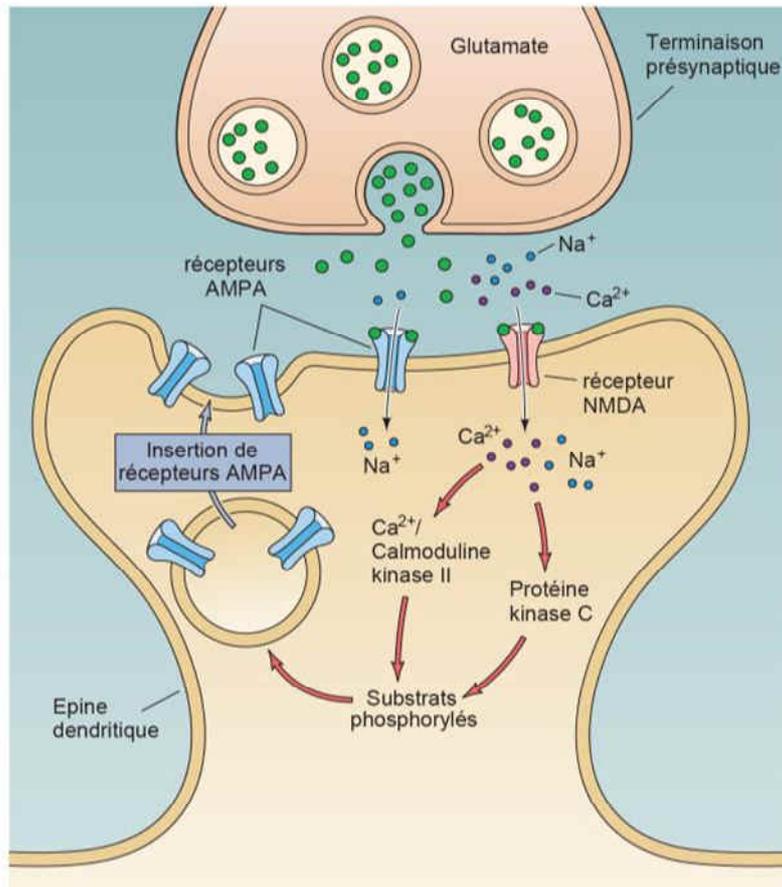


**Figure 12. La LTP est dépendante de l'ouverture des récepteurs NMDA postsynaptiques**

Représentation schématique des mécanismes qui conduisent à l'entrée de  $Ca^{2+}$  par les récepteurs NMDA postsynaptiques. L'ouverture nécessite la fixation de glutamate dans des conditions où la membrane postsynaptique est déjà dépolarisée pour permettre la libération de l'ion  $Mg^{2+}$  qui bloque le canal. Adapté de (Purves, 2004), page 588.

Il est important de comprendre que le récepteur NMDA est responsable de l'augmentation d'amplitude des PPSE (potentialisation), mais que les PPSE eux-mêmes reflètent l'ouverture des récepteurs AMPA. Le débat a donc fait rage pendant des années pour savoir si la potentialisation était plutôt un mécanisme présynaptique (augmentation de la quantité de glutamate libérée par input), postsynaptique (augmentation du nombre et/ou de la conductance des récepteurs AMPA), extrasynaptique (diminution de la recapture de glutamate dans la fente synaptique), ou encore dû à des changements morphologiques au niveau des synapses. Dans la réalité, il semblerait que la LTP soit le fruit de la combinaison de l'ensemble de ces mécanismes, se produisant probablement avec des régulations temporelles qui leur sont propres. Nous allons maintenant nous focaliser sur la partie postsynaptique.

Nous verrons que le maintien à long terme de la potentialisation passe par des modifications profondes du fonctionnement et de la morphologie des épines dendritiques.



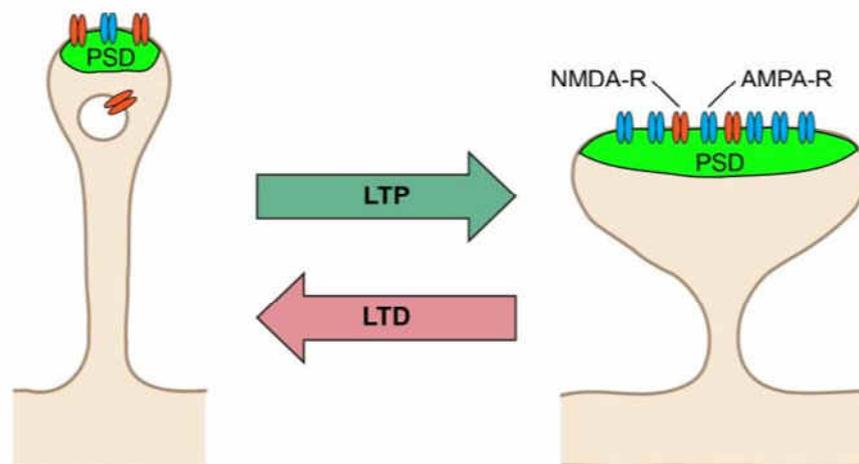
**Figure 13. Le Ca<sup>2+</sup> est l'élément déclencheur de la LTP**

L'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup>, dans la tête de l'épine, via l'ouverture des NMDA-R, va déclencher des cascades de signalisation (CaMKII, PKC...) qui aboutissent à l'augmentation du nombre et de la conductance des AMPA-R. Adapté de (Purves, 2004), page 589.

Le Ca<sup>2+</sup> libéré par l'ouverture du récepteur NMDA est considéré comme le second messager responsable de l'induction de la LTP. De nombreuses études ont montré l'importance de l'augmentation de la concentration postsynaptique en Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>ED</sub>) pour le déclenchement de la LTP. L'injection intracellulaire d'EGTA, un chélateur des ions divalents, empêche la potentialisation (Lynch et al., 1983), alors qu'à l'inverse, l'augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ED</sub> a tendance à potentialiser les synapses. Comme nous l'avons vu, la morphologie spécifique des épines dendritiques limite la diffusion des molécules vers la dendrite et permet de maintenir une [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ED</sub> élevée au niveau de la tête de l'épine (Noguchi et al., 2005). Le Ca<sup>2+</sup> déclenche la LTP en activant des cascades de signalisation au niveau postsynaptique qui vont aboutir à des modifications post-traductionnelles de protéines. Il active notamment la CamKII (Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin dependent kinase II), protéine la plus abondante dans les épines dendritiques, ainsi que la PKC (Protein Kinase C) (Figure 13). Ces deux kinases sont fondamentales pour l'induction de la LTP (Malinow et al., 1988; Silva et al., 1992). Elles

ciblent directement ou indirectement le récepteur AMPA. La CaMKII phosphoryle la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA et il a été montré que cette modification augmentait la conductance du canal  $\text{Na}^+$  (Derkach et al., 1999). De plus, ces kinases vont favoriser le recrutement de nouveaux récepteurs AMPA au niveau de la membrane postsynaptique (Hayashi et al., 2000). Cette insertion de récepteurs passe par un mécanisme de fusion de vésicules qui contiennent des stocks de récepteurs AMPA avec la membrane plasmique péri- ou postsynaptique (Figure 13) (Park et al., 2004). Le fait d'avoir plus de récepteurs AMPA, qui laissent chacun rentrer plus de  $\text{Na}^+$ , va expliquer l'augmentation prolongée de l'amplitude des PPSE, même si la quantité de glutamate libérée dans la fente synaptique reste la même. Encore une fois, il faut bien voir que la LTP peut induire des modifications à l'échelle d'une seule synapse, d'où la probable nécessité de disposer d'éléments quasi isolés comme les épines dendritiques.

Si la LTP a un rôle dans la mémoire à long terme, la potentialisation de la synapse doit pouvoir se maintenir durant des périodes pouvant aller jusqu'à la durée de vie de l'individu. Les mécanismes moléculaires qui permettraient des modifications à très long terme sont moins bien connus. Les voies de signalisation décrites plus haut entraînent une modification de l'expression des gènes, via par exemple la voie des MAPK (Thomas and Huganir, 2004). La traduction locale de protéines est également activée. Ces deux mécanismes aboutissent à la modification du contenu en protéines des épines dendritiques. De nouvelles enzymes sont synthétisées, comme par exemple la kinase constitutivement active PKM $\zeta$  (Sacktor, 2012). Les protéines d'échafaudage postsynaptiques et les éléments du cytosquelette sont réorganisés. Ces modifications ont des conséquences morphologiques sur les épines dendritiques et le neurone tout entier.



**Figure 14. Les phénomènes de plasticité synaptiques s'accompagnent de modifications morphologiques au niveau des épines dendritiques**

La LTP potentialise les épines fines en épines de type champignon. Le volume de la tête, le nombre de récepteurs AMPA et la taille de la PSD augmentent. Les épines champignon sont stables morphologiquement et sont les plus efficaces fonctionnellement. La LTD entraîne les mécanismes opposés.

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe une corrélation bidirectionnelle entre la morphologie de l'épine et l'efficacité de la transmission synaptique. Cette relation s'exerce principalement au travers de deux caractéristiques. D'une part le volume de la tête, qui conditionne à la fois la taille de la PSD et le nombre de récepteurs AMPA, et d'autre part, le diamètre du cou, qui compartimentalise l'épine électriquement et biochimiquement (voir partie 1.2.3 pour plus de détails sur les aspects morphologiques). Les changements d'activité synaptique associés à la LTP entraînent des changements de forme, de nombre et de taille des épines dendritiques. Nous observons généralement une augmentation globale du nombre d'épines associée à une augmentation de la proportion d'épines de type champignon (Lang et al., 2004; Matsuzaki et al., 2004). Les épines fines sont plus dynamiques que les épines de type champignon. Elles sont capables d'apparaître, de disparaître et de changer de forme, alors que les épines champignon ont plus tendance à rester en place (Holtmaat et al., 2005). Elles possèdent des récepteurs NMDA, mais proportionnellement moins de récepteurs AMPA, ce qui les rend aptes à la potentialisation, par insertion de nouveaux récepteur AMPA (Figure 14). Au contraire, les grosses épines sont celles qui sont à même de contenir l'appareil épineux, probablement responsable de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  (Spacek and Harris, 1997), et des polyribosomes, responsables de la synthèse protéique locale (Ostroff et al., 2002). Certains auteurs ont donc émis l'hypothèse que les épines fines sont celles « qui apprennent », alors que les épines champignons sont celles qui « ont appris », via des phénomènes de plasticité synaptique de type LTP (Bourne and Harris, 2007). En ce qui concerne la LTD, l'effet sur les épines est inversé, avec comme conséquence une diminution de la taille et de la densité (Zhou et al., 2004). Nous pouvons donc voir la LTD comme un moyen de revenir à l'état basal, avec des épines fines capable « d'apprendre à nouveau ».

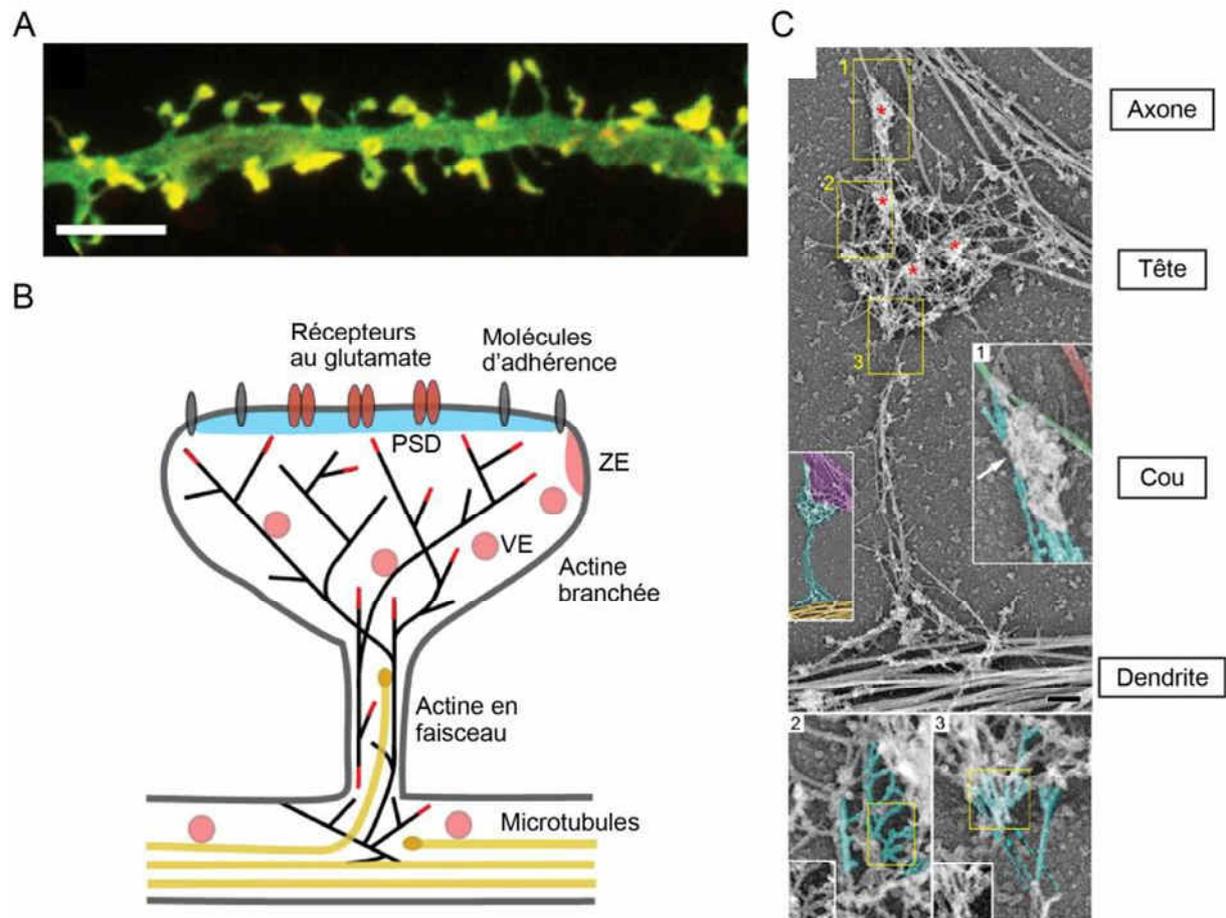
Il ne faut donc pas appréhender les changements morphologiques des épines dendritiques uniquement comme une conséquence secondaire de la LTP ou de la LTD. De plus en plus d'arguments montrent que l'état morphologique des épines est finement régulé et qu'il joue un rôle dans le maintien à long terme de la potentialisation ou dépression des synapses. Toute perturbation des acteurs de la structure de l'épine a des conséquences sur les phénomènes de plasticité synaptique et entraîne des altérations majeures de la physiologie neuronale.

### ***1.3.3. Acteurs moléculaires de la morphologie des épines dendritiques***

Les acteurs moléculaires (et subcellulaires) présentés ici sont impliqués dans tous les mécanismes relatifs à la morphologie des épines dendritiques. Nous traiterons principalement le contexte des changements de morphologie ou de la stabilisation des épines en forme de champignon associés à la plasticité des synapses. Mais nous décrirons aussi les phénomènes associés, plus généralement, à la pousse et à la stabilisation des épines dendritiques durant le développement. Les mécanismes moléculaires mis en place sont probablement identiques et même généralisables à d'autres phénomènes de morphogenèse neuronale, comme le développement de l'arborisation dendritique. Nous allons voir que la morphogenèse des épines dendritiques fait intervenir de nombreux acteurs impliqués dans la déformation des

membranes biologique dans d'autres tissus et modèles cellulaires, ainsi que des protéines spécifiques de la synapse.

## Cytosquelette d'actine et ses régulateurs



**Figure 15. Les filaments d'actine sont organisés et sont des composants composant structurant majeurs dans les épines dendritiques**

(A) Reconstruction tridimensionnelle d'un neurone d'hippocampe en culture observé en microscopie confocale. L'architecture dendritique est représentée par une protéine soluble verte. L'actine filamentueuse est représentée en jaune. Notez que l'actine-F est fortement enrichie dans les épines dendritiques. Barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$ .

(B) Représentation schématique d'une épine dendritique de type champignon mettant en évidence l'organisation des réseaux d'actine et de tubuline. ZE : zone d'endocytose/exocytose ; VE : vésicule d'endocytose/exocytose. Adapté de (Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

(C) Observation en microscopie électronique (technique de réplique sur platine) du squelette d'une épine champignon de neurone d'hippocampe. Seuls les éléments du cytosquelette et la PSD sont visibles sur ces images. 1, 2 et 3 sont des agrandissements des zones indiquées. Notez les différences dans l'organisation des filaments d'actine entre la tête et le cou. Barre d'échelle : 200 nm. Adapté de (Korobova and Svitkina, 2010).

L'actine joue un rôle dans pratiquement tous les processus cellulaires chez les eucaryotes. Les monomères d'actine sont capables de se polymériser et de s'organiser en filaments, on parle d'actine filamentueuse. Cette actine filamentueuse (actine-F) est impliquée dans un grand

nombre de mécanismes de déformation membranaire, et ce dans tous les types cellulaires (Alberts et al., 2007a). Nous pouvons citer la formation et la stabilisation des filopodes, des lamellipodes, des jonctions d'adhérence, etc. Cet élément du cytosquelette est même considéré comme l'élément essentiel, et universel, responsable (avec les microtubules) de la structure et de la forme des cellules et de leur motilité. Le cytosquelette d'actine exerce ses différentes fonctions par l'intermédiaire de régulateurs protéiques qui modifient ses propriétés (polymérisation, dépolymérisation, blocage de la polymérisation, branchements...), ainsi que l'association avec d'effecteurs spécifiques (moteurs moléculaires, enzymes diverses, protéines d'ancrage, récepteurs membranaires...).

Le cytosquelette d'actine joue un rôle prépondérant dans tous les mécanismes de morphogenèse neuronale (branchements dendritiques, terminaison axonale, épines dendritiques). L'actine filamenteuse (actine-F) est fortement enrichie dans les épines dendritiques par rapport au reste de la cellule, dans un neurone mature (Figure 15A) (Landis and Reese, 1983; Matus et al., 1982). Une des fonctions principales de l'actine-F est de maintenir la structure de l'épine. En effet, l'utilisation de drogues dépolymérisantes entraîne un effondrement des épines et une diminution du nombre de synapses. Dans les épines de type champignon, l'organisation des filaments est très différente entre le cou et la tête. Dans le cou, les filaments d'actine sont majoritairement organisés en une mixture de longs filaments parallèles et de filaments branchés, avec de courtes ramifications. Dans la tête, les filaments arborent une structure très branchée et très dense (Figure 15B et C) (Korobova and Svitkina, 2010). L'extrémité barbelée, celle où se produit la polymérisation, est dirigée vers la PSD et la membrane plasmique. Dans la tête, les filaments d'actine forment donc une sorte de squelette tridimensionnel qui exerce une tension sur la membrane plasmique et permet de maintenir la structure renflée des épines (Figure 15B et C). Cette différence d'organisation des filaments implique l'intervention de protéines régulatrices spécifiques. Un grand nombre de ces protéines ont pu être identifiées par spectrométrie de masse dans des extraits de synapse ou de PSD (Cheng et al., 2006). La majorité des régulateurs sont listés dans le **tableau 1**.

La dynamique de polymérisation/dépolymérisation du cytosquelette d'actine est impliquée dans les changements de morphologie des épines, qu'ils soient développementaux ou dépendants de l'activité synaptique. Il existe une relation directe entre la dynamique du cytosquelette d'actine et la motilité de projections membranaires. Des études de FRET (Fluorescence resonance energy transfer) ont montré que la LTP a tendance à augmenter le rapport actine-F/actine-G (Okamoto et al., 2004). Durant la potentialisation, l'actine a donc tendance à se polymériser et cet effet est corrélé à l'augmentation du volume de l'épine (Lin et al., 2005a). Le complexe Arp2/3 joue un rôle prépondérant dans l'organisation et la dynamique de l'actine dans la tête de l'épine. Arp2/3 se fixe sur des filaments existants et induit la formation latérale de nouveaux filaments, ce qui aboutit à la formation d'un réseau branché (Machesky and Gould, 1999). Ce complexe est absolument nécessaire pour le gonflement de la tête de l'épine dans les processus développementaux, comme dans les processus de plasticité synaptique (Kim et al., 2013; Wegner et al., 2008). La déplétion des composants du complexe Arp2/3 ou de ses activateurs (WAVE-1, N-WASP...) altère la

morphologie, le nombre des épines, ainsi que l'induction de la LTP. Dans les phase plus tardives de la LTP, le cytosquelette d'actine est hyper-stabilisé, comme l'atteste sa résistance à des traitements par des drogues dépolymérisantes comme la Latrunculin A (Ramachandran and Frey, 2009). Ceci est en accord avec la proposition que les épines de type champignon sont celles qui ont été potentialisées et qui ont tendance à rester stables sur de très longues périodes (Bourne and Harris, 2007). La stabilisation du cytosquelette passe par l'inhibition de protéines dépolymérisantes et l'association avec des protéines stabilisatrices (Tableau 1). Les filaments d'actine sont associés à des moteurs moléculaires comme la Myosine-II. Une des hypothèses soutenues actuellement est que le cou de l'épine serait maintenu dans sa longueur et dans son diamètre par un manchon de filaments d'actine mis en tension par la Myosine-II (Kneussel and Wagner, 2013).

**Tableau 1.** Protéines régulatrices de l'actine impliquées dans la morphogenèse des épines dendritiques

Protéines	Effets sur le cytosquelette d'actine	Rôle dans la morphogenèse des épines dendritiques	Voie de signalisation
<b>Nucléateurs</b>			
Complexe Arp2/3	Nucléation de filaments branchés	Requis pour l'expansion de la tête	Rac / Cdc42
DRF3/mDia2	Induit l'élongation de filaments droits	Requis pour la formation du cou et des filopodes dendritiques	Rif
<b>Protéines régulant le complexe Arp2/3</b>			
Cortactine	Active le complexe Arp2/3	Régule la densité des épines / se fixe sur Shank	Kinases de la famille des Src
N-WASP	Active le complexe Arp2/3	Régule la densité des épines	Cdc42 / Rac et PIP2
WAVE-1	Active le complexe Arp2/3	Régule la densité des épines	Rac et PIP3
Abp1	Contrôle Arp2/3 via N-WASP	Augmente la proportion de grosses épines / se fixe sur Shank	
<b>Echangeur d'ATP</b>			
Profiline	Augmente la vitesse de polymérisation	Stabilise la morphologie des épines	
<b>Dépolymérisateur</b>			
ADF, Cofiline	Dépolymérise et coupe les filaments	Requis pour la morphologie de la tête sa stabilisation pendant la LTP	Inhibé par PAK3
<b>Protéine de coiffe</b>			
Esp8	Se fixe au niveau des bouts +	Inhibe la formation de filopodes dendritiques	Inhibé par la voie des MAPK
<b>Protéine de crosslink</b>			
$\alpha$ -Actinine	Regroupe les filaments en faisceau	Induit l'élongation des épines	FAK réduit sa fixation sur l'actine
Calponine	Regroupe et stabilise les filaments	Induit l'élongation des épines et augmente la densité	
CaM $\kappa$ B	Regroupe et stabilise les filaments	Requis pour la maturation des épines et la stabilisation lors de la LTP	Activé par NMDA et Ca <sup>2+</sup>
Neurabine I	Regroupe les filaments en faisceau	Requis pour la maturation des épines	Inhibé par Cdk5
Drebine	Regroupe et stabilise les filaments	Induit l'élongation des épines	
<b>Moteurs moléculaires</b>			
Myosine II	Moteur associé à l'actine	Requis pour établir la morphologie du cou et de la tête	RhoA
Myosine VI	Moteur associé à l'actine	Requis pour la formation des épines	

Adapté de (Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

Il est intéressant de noter que tout ce qui touche de près ou de loin aux filaments d'actine et à leur dynamique semble affecter la morphologie des épines dendritiques et également les phénomènes de plasticité synaptique (Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Pour preuve, les centaines d'articles qui relatent des altérations de morphologie et/ou des problèmes dans la mise en place de la LTP suite à la déplétion de régulateurs de l'actine. En effet, la plupart des mécanismes mentionnés ci-dessus sont sous la dépendance de voies de signalisation dépendantes du  $Ca^{2+}$ , déclenchées par l'activation des récepteurs AMPA ou NMDA postsynaptiques. Nous pouvons citer, par exemple, l'importance des petites protéines G qui permettent d'activer ou d'inactiver un grand nombre de régulateurs de l'actine. Les protéines régulatrices de l'actine sont également capables de s'associer à des protéines d'échafaudage, ce qui crée un lien direct entre la dynamique du cytosquelette et l'organisation de la PSD.

## **Microtubules**

Les microtubules sont essentiels pour le développement des neurones (polarité, guidance axonale et dendritique, rétraction, transport d'organelles...). Il a été montré récemment que les microtubules des dendrites sont capables de pénétrer à l'intérieur de certaines épines dendritiques (Figure 15B) et qu'ils régulent leur morphologie et leur plasticité structurale. Les microtubules qui rentrent sont marqués au niveau de leur extrémité distale par la protéine de bouts+, EB3 (End-binding protein 3). La présence de microtubules coiffés par EB3 coïncide avec le grossissement des épines et l'inhibition de la dynamique des microtubules ou la déplétion d'EB3 conduisent à des altérations morphologiques (Jaworski et al., 2009). EB3 étant également impliquée dans le remodelage de l'actine, via la protéine p140Cap qui se lie à la cortactine, il a été suggéré que les microtubules exercent leur fonction via la régulation locale de la dynamique d'assemblage du cytosquelette d'actine. La collaboration entre cytosquelette de microtubules et cytosquelette d'actine est de plus en plus évidente dans de nombreux systèmes. Elle pourrait expliquer, dans notre cas, la régulation du cytosquelette d'actine à l'échelle d'une épine isolée, mais via des signaux provenant de la dendrite et non pas de l'épine elle-même.

## **Protéines de déformation membranaire à domaine BAR**

La morphologie des épines dendritiques est très caractéristique, avec leur tête renflée et leur cou fin. Il est facile d'imaginer que les contraintes imposées sur la membrane plasmique sont énormes, surtout dans les épines champignons. Des déformations membranaires de cette ampleur ne peuvent vraisemblablement pas être uniquement dépendantes du cytosquelette d'actine. Certaines protéines comme la superfamille des protéines à domaine BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs) sont capables de reconnaître et d'imposer des courbures membranaires spécifiques (Suetsugu et al., 2010). Ces domaines sont extrêmement basiques et se fixent directement sur la surface des membranes biologiques. Il existe plusieurs familles de domaines de type BAR (EFC/N-BAR, F-BAR et I-BAR) et chacune a des propriétés de

déformation qui lui sont propres. La surface d'interaction aux lipides des domaines I-BAR est intéressante car elle permet d'imposer des déformations convexes de la membrane. La protéine à domaine I-BAR, IRSp53 (Insulin receptor substrate 53) joue un rôle dans la morphologie des épines dendritiques. La déplétion en IRSp53 a un effet sur la densité et la forme des épines et il a été montré que cette protéine est associée à PSD-95 (Choi et al., 2005). Il est intéressant de noter qu'IRSp53 est associée à l'actine via une interaction avec WAVE-2 et que son activation est sous la dépendance des GTPases monomériques Rac1 et Cdc42, qui jouent un rôle important dans la dynamique du cytosquelette d'actine.

Cette protéine est particulièrement importante pour la formation des filopodes. Elle permettrait notamment d'imposer une courbure initiale de la membrane plasmique, au bout du filopode. Ceci suggère que le rôle d'IRSp53 est probablement principalement développemental, via la formation des filopodes dendritiques. Nous verrons par la suite que d'autres acteurs de la déformation des membranes biologiques sont également impliqués dans la morphogenèse et la plasticité structurale des épines dendritiques.

### **Apports de membrane**

La LTP aboutit à l'exocytose de vésicules contenant des récepteurs AMPA. Ce phénomène est fondamental à la potentialisation et est directement corrélé à l'augmentation de volume de la tête des épines. La LTP se traduit par une augmentation du trafic membranaire en provenance des endosomes de recyclage (Park et al., 2004). L'exocytose correspond à un phénomène de fusion membranaire qui va entraîner l'insertion des lipides de la vésicule dans la membrane plasmique. Un autre mécanisme séduisant pour l'augmentation du volume de la tête, lors de la LTP, serait donc un apport supplémentaire de membrane au niveau local, via l'exocytose (Park et al., 2006). Il a été montré qu'en plus de la voie d'insertion des récepteurs AMPA (dépendante de Rab11), il existait une voie d'exocytose constitutive, dans les épines (dépendante de Rab4). Cette dernière est cruciale pour le gonflement des épines mais n'influence pas le transport des récepteurs AMPA (Brown et al., 2007). Cet apport de membrane, lors de la potentialisation, pourrait servir à délivrer des protéines spécifiques à la membrane postsynaptique (en plus des récepteurs AMPA) et à modifier les propriétés de la bicouche phospholipidique en changeant sa composition biochimique.

### **Septines**

Les Septines sont une famille de protéines liant le GTP, capables de se polymériser et de former des réseaux protéiques à la surface des membranes. Elles sont capables de lier l'actine et les microtubules et sont impliquées dans divers mécanismes de déformation membranaire comme la cytokinèse ou le bourgeonnement chez les levures. Ces propriétés font que certains considèrent les Septines comme le quatrième composant du cytosquelette (Mostowy and Cossart, 2012). Les protéines de la famille des Septines se localisent à la base des épines

dendritiques et jouent un rôle dans le développement des branchements dendritiques et des épines (Tada et al., 2007; Xie et al., 2007). Les propriétés des Septines amènent à penser qu'elles pourraient jouer un rôle dans le maintien du diamètre du cou, ou dans ses propriétés de compartimentalisation. Cependant, il manque à ce jour des données fonctionnelles solides, pour pouvoir attester de l'implication de ces protéines dans la morphogenèse des épines.

### **Molécules d'adhérence**

Lors du développement et de la maturation des épines, les molécules d'adhérence trans-synaptiques jouent un rôle particulièrement important. Elles permettent notamment de stabiliser l'association entre terminaisons axonales et filopodes dendritiques, ce qui aboutit à la mise en place d'une synapse active. La Télencéphaline (TLCN) est une molécule d'adhérence de la famille des immunoglobulines impliquée dans la formation des filopodes dendritiques (Matsuno et al., 2006). Elle interagit avec la famille de protéines ERM (ezrin/radixin/moesin), qui interagissent avec l'actine (Furutani et al., 2007). La TLCN serait donc une molécule clé dans la synaptogenèse et la spinogenèse en préservant le caractère dynamique du cytosquelette d'actine des filopodes dendritiques. De manière intéressante, quand les filopodes deviennent des épines, la TLCN se relocalise au niveau des branchements dendritiques et laisse la place à la N-cadhérine, une autre molécule d'adhésion. La N-cadhérine s'associe à l' $\alpha$ -caténine qui participe à la stabilisation de la nouvelle épine. L' $\alpha$ -caténine fait le pont entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine. Elle participerait à la maturation des épines, sous la dépendance de l'activité synaptique, en réduisant le turnover de l'actine (Abe et al., 2004). Il semble évident que les molécules d'adhérence sont importantes pour autoriser les changements de morphologie des épines et surtout stabiliser ces structures sur de longues périodes.

### **Protéines de la PSD**

Il existe une relation directe entre le volume de la tête et la taille de la PSD (Arellano et al., 2007; Freire, 1978). La PSD forme un réseau très dense de protéines, maintenu au niveau architectural par les protéines de la famille des MAGUK (PSD-95...) et Shank. Un des rôles supposés de la PSD est de mettre en relation les récepteurs aux neurotransmetteurs, les protéines d'ancrages, les enzymes et les éléments du cytosquelette, pour permettre des réarrangements rapides des épines lors des phénomènes de plasticité synaptique. De par son rôle central dans l'organisation de la PSD et son association avec les récepteurs AMPA, PSD-95 est absolument requis pour les étapes tardives de la LTP, comme le gonflement et la stabilisation des épines (Ehrlich et al., 2007).

La protéine Shank est capable de recruter Homer, une protéine associée aux récepteurs métabotropiques au glutamate. Ces deux protéines forment un polymère qui s'organise en réseau à la surface membranaire des épines (Hayashi et al., 2009). La surexpression de Shank

favorise la maturation des épines, ce qui se traduit par une augmentation de taille (Sala et al., 2001). Cette surexpression est également capable d'induire le développement d'épines dans des neurones originalement non-épineux (Roussignol et al., 2005). L'hypothèse avancée, pour le rôle de Shank-Homer dans la morphologie des épines, est que ces deux protéines s'assembleraient pour former une plateforme permettant le recrutement ultérieur des autres composants de la PSD, comme PSD-95.

## **Composition phospholipidique**

Peu d'études se sont intéressées à la composition lipidique des épines et à une éventuelle modification lors des phénomènes de plasticité synaptique. Les radeaux lipidiques sont abondamment représentés dans les dendrites. Ce sont des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et qui régulent des fonctions cellulaires diverses comme le trafic intracellulaire, le recrutement de complexes protéiques à la membrane et la régulation du cytosquelette d'actine. La déplétion en cholestérol ou sphingolipides a un impact sur la densité et la morphologie des épines dendritiques (Hering et al., 2003). Les radeaux lipidiques sont également importants pour que les récepteurs AMPA restent ancrés dans la région postsynaptique, élément crucial pour le maintien de la potentialisation.

Le métabolisme des phosphoinositides a probablement un rôle à jouer dans la morphologie des épines dendritiques. Les phosphoinositides jouent un rôle important dans le trafic et la signalisation cellulaire. Le PtdIns(4,5)P2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) est très représenté à la membrane plasmique et particulièrement important pour la mobilisation de protéines régulatrices du cytosquelette d'actine (Logan and Mandato, 2006). Le PtdIns(4,5)P2 a tendance à activer le complexe Arp2/3 et à inhiber l'ADF/Cofiline, deux machineries aux effets opposés sur l'actine (Tableau 1). La concentration en PtdIns(4,5)P2 participe donc probablement à la régulation de la dynamique de polymérisation du cytosquelette d'actine lors du développement ou de la plasticité des épines. Ceci implique l'intervention des kinases et phosphatases qui régulent spécifiquement le métabolisme des phosphoinositides (Di Paolo and De Camilli, 2006).

## **Conclusion**

Cette partie n'est pas une liste exhaustive de toutes les protéines ayant un effet sur la morphologie des épines dendritiques. Elle représente une vision d'ensemble des mécanismes cellulaires à pouvoir morphogénétique. Ces mécanismes sont très variés, mais ils ont pour point commun de réguler ou d'être régulés par le cytosquelette d'actine. Nous verrons par la suite que la morphologie des épines dendritiques est fidèlement corrélée à la viabilité neuronale. Des milliers de protéines ont donc un impact indirect sur ce phénomène.

## 1.4. Dysfonctionnements des épines dans les pathologies neuropsychiatriques

Les maladies neurologiques, et en particulier celles touchant le cerveau, et les maladies psychiatriques, sont nombreuses. Nous verrons, dans cette partie, qu'un grand nombre de maladies neuropsychiatriques sont caractérisées par des altérations morphologiques et fonctionnelles des synapses. Nous nous intéresserons ensuite au rôle central que jouent les épines dendritiques dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives, en prenant l'exemple de la maladie d'Alzheimer. Nous débattons, pour finir, de l'hypothèse que les altérations épines dendritiques puissent être l'élément déclencheur dans ces maladies et nous évaluerons la possibilité d'en faire des cibles thérapeutiques.

### 1.4.1. Altérations morphologiques et fonctionnelles des synapses dans les maladies neurologiques

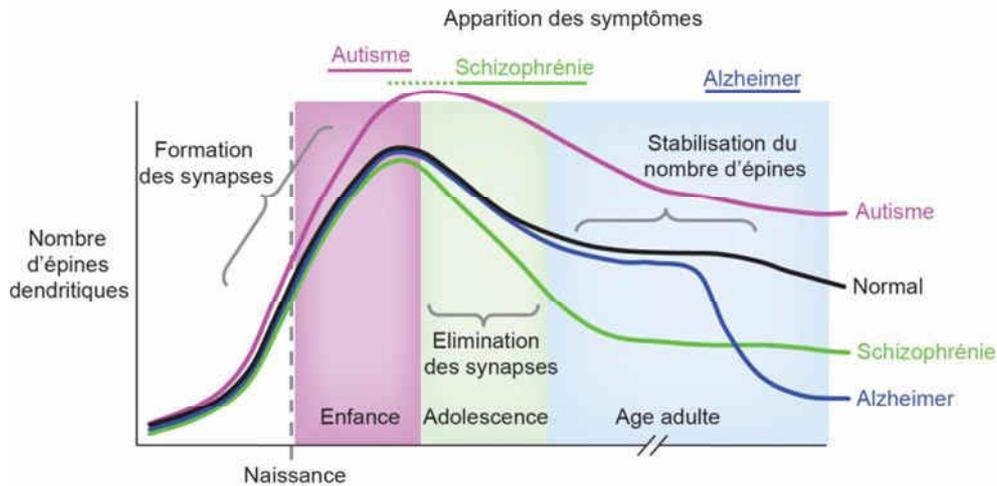
Comme nous l'avons vu précédemment, il existe une relation bidirectionnelle entre la morphologie des épines dendritiques et le fonctionnement neuronal. L'activité neuronale est en général corrélée au développement et au gonflement des épines, et inversement, leur morphologie conditionne l'efficacité de la transmission synaptique. En tant que site majeur d'intégration des signaux excitateurs dans le système nerveux central, les épines dendritiques reflètent également le nombre de synapses glutamatergiques. Une diminution de la densité en épines dendritiques peut être raisonnablement apparentée à une diminution de connectivité neuronale. Dans ce paragraphe, « épine dendritique » et « synapse excitatrice » seront regroupées sous le terme « synapse », pour faciliter la compréhension, du fait de la diversité des nomenclatures utilisées dans les différentes études présentées.

Les maladies neurologiques se traduisent par des défauts de transmission du message nerveux, de plasticité neuronale, ou encore de stockage de l'information. Il n'est donc pas étonnant de retrouver des altérations de la densité, de la forme et de la taille des épines dendritiques dans la plupart de ces pathologies. Le **tableau 2** dresse une liste non exhaustive de maladies neurologiques connues et des altérations des épines dendritiques qui leur sont associées. Ces données proviennent principalement d'observations en microscopie optique ou électronique de cerveaux post mortem de patients.

**Tableau 2.** Altérations des épines dendritiques dans les maladies neurologiques

Maladies	Altérations des synapses et des épines	Région cérébrale touchée	Références
Maladie d'Alzheimer	↘ densité ↘ taille	néocortex / hippocampe	(Einstein et al., 1994) (Anderton et al., 1998)
Epilepsie	↘ densité	néocortex / hippocampe	(Swann et al., 2000)
Syndrome de Down	↘ densité ↘ taille	néocortex / hippocampe	(Ferrer and Gullotta, 1990) (Takashima et al., 1981)
Retard Mental	↘ densité ↘ taille	néocortex	(Kaufmann and Moser, 2000)
Autisme	↗ densité	néocortex frontal et temporal	(Hutsler and Zhang, 2010)
Syndrome du X fragile	↗ densité déformation des épines	néocortex	(Hinton et al., 1991) (Irwin et al., 2001)
Dépression chronique	↘ densité	néocortex	(Cotter et al., 2002)
Maladie de Huntington	↗ densité ↗ taille	striatum	(Ferrante et al., 1991)
Syndrome de Niemann-Pick	↘ densité	néocortex frontal et temporal	(Higashi et al., 1993)
Maladie de Parkinson	↘ densité	substance noire	(Patt and Gerhard, 1993)
Démence Frontotemporale	↘ densité	néocortex frontal	(Catalá et al., 1988) (Ferrer, 1999)
Schizophrénie	↘ densité ↘ taille	néocortex frontal et temporal	(Glantz and Lewis, 2000) (Sweet et al., 2009)

La densité des synapses est le paramètre le plus facile à évaluer. En prenant l'exemple de trois pathologies : l'autisme, la schizophrénie et la maladie d'Alzheimer, nous pouvons observer qu'il existe une corrélation temporelle entre l'apparition des symptômes et les altérations du nombre de synapses (Figure 16). Le cerveau des autistes, comme celui des personnes atteintes du syndrome du X fragile, est caractérisé par une hyper-connectivité neuronale, probablement dû à des défauts de maturation et de tri des connexions durant le développement cérébral (Geschwind and Levitt, 2007). Pour ce qui est de la schizophrénie, la perte massive de matière grise à l'adolescence coïncide avec l'apparition des troubles cognitifs et s'explique principalement par une diminution du nombre de synapses (Selemon and Goldman-Rakic, 1999). De nombreuses études ont mis en évidence des altérations morphologiques et de densité d'épines dans les maladies neurodégénératives, et en particulier la maladie d'Alzheimer (MA) (Anderton et al., 1998; Einstein et al., 1994). La perte de connexion est un phénomène normal associé au vieillissement, mais dans la MA, cette diminution est précoce et massive et empire avec la progression de la maladie (Figure 16) (DeKosky and Scheff, 1990).



**Figure 16. Les pathologies neuropsychiatriques affectent le nombre d'épines à différents stades développementaux**

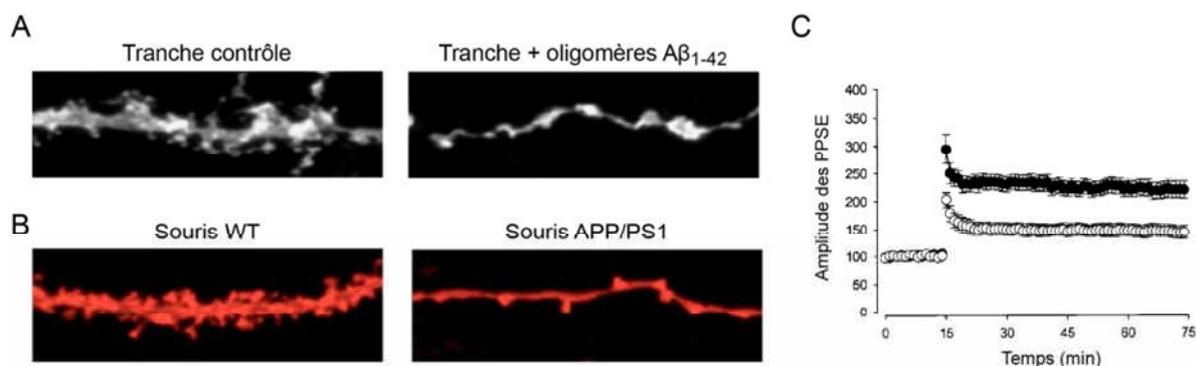
Graphique représentant l'évolution normale et pathologique du nombre d'épines dendritiques au cours de la vie d'un individu, en prenant l'exemple de l'autisme, de la schizophrénie et de la maladie d'Alzheimer.

Adapté de (Penzes et al., 2011).

Actuellement, une des grandes questions en neurosciences est de savoir si la synapse peut être un substrat commun aux maladies neuropsychiatriques. Les observations de cerveaux post mortem ne peuvent pas être suffisantes pour répondre à cette question. En effet, le tableau à ce stade résulte d'années de progression de la maladie et ne peut donc refléter les événements initiaux. Les avancées de la génétique, de la biochimie de la synapse et des modèles animaux permettent maintenant d'étudier la synapse comme potentiel élément déclencheur dans ces maladies. Nous allons maintenant nous intéresser rôle de la synapse, et de l'épine dendritique en particulier, dans les maladies neurodégénératives, en prenant l'exemple de la maladie d'Alzheimer.

#### ***1.4.2. L'épine dendritique comme élément déclencheur des maladies neurodégénératives : exemple de la maladie d'Alzheimer***

La maladie d'Alzheimer est la démence la plus commune. Elle touche des millions de personnes dans le monde et se caractérise par une altération progressive de la mémoire et d'autres fonctions cognitives. Les étapes précoces de la maladie sont difficiles à détecter. La plupart du temps, le diagnostic est effectué lorsque les troubles commencent à perturber le quotidien du patient. L'imagerie cérébrale met alors en évidence une atrophie cérébrale, dans les régions temporales et pariétales du cortex. La perte de matière cérébrale et les troubles cognitifs ne font qu'empirer, jusqu'à conduire à la mort du patient, qui intervient en général 3 à 9 ans après le diagnostic (Querfurth and LaFerla, 2010).



**Figure 17. Altérations de la structure et de la plasticité des épines dendritiques dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer**

(A) Tranches organotypiques aiguës d'hippocampe de souris WT traitées ou non avec 100 nM d'oligomères d'Aβ<sub>1-42</sub> et observées au microscope confocal. Notez la diminution de densité d'épines sur les tranches traitées.

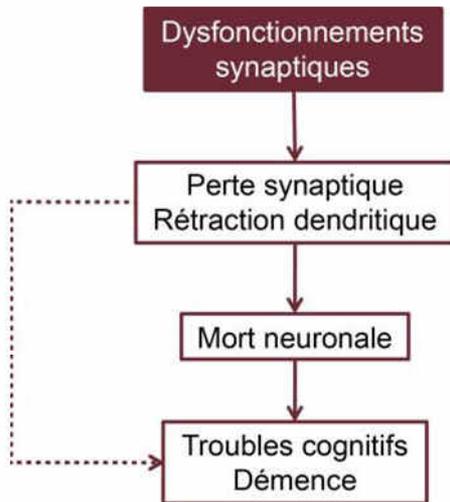
(B) Préparation identique mais en comparant des tranches de souris WT et transgéniques âgées de 4 mois. Adapté de (Smith et al., 2009).

(C) Potentialisation à long terme sur des tranches de souris WT (ronds pleins) et transgéniques APP/PS1 (ronds vides) âgées de 6 mois. Adapté de (Trinchese et al., 2004).

Les causes et la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer ont été énormément étudiées depuis sa mise en évidence par Alois Alzheimer, en 1906. Les deux principales causes de la maladie proviennent du dérèglement de la biochimie de deux protéines : le peptide Aβ (Béta-amyloïde), d'une part, et la protéine Tau (tubule-associated unit). Le débat a longtemps fait rage entre les partisans des causes « Amyloïdogénique » et « TAUgénique ». Les scientifiques s'accordent maintenant à dire que l'accumulation de ces deux protéines fait partie d'une séquence d'évènement complexe, qui implique de nombreux autres facteurs (dérèglement métabolique, inflammation...), pour conduire à la mort neuronale (Querfurth and LaFerla, 2010).

La synapse joue un rôle central dans le développement de la maladie. Comme nous l'avons vu précédemment, la densité des synapses est diminuée chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (Tableau 2) (Anderton et al., 1998; Einstein et al., 1994). Le développement de nombreux modèles animaux, principalement des souris transgéniques, chez lesquelles la concentration cérébrale du peptide pathogène Aβ est augmentée, a permis d'analyser le processus neurodégénératif de manière dynamique. Il a été montré que la diminution du nombre de synapses est précédée par des altérations morphologiques au niveau des épines dendritiques. Des souris transgéniques APP/PS1 présentent une diminution de la densité et une diminution de la proportion d'épines à grosse tête (Figure 17B) (Smith et al., 2009). On observe une corrélation entre les altérations synaptiques et la concentration en oligomères d'Aβ (Figure 17A) (Mucke et al., 2000; Walsh et al., 2002). Les modifications structurales des épines dendritiques sont associées à des modifications fonctionnelles de l'efficacité de la transmission et de la plasticité synaptique chez ces souris. Il a été observé une diminution de l'activité synaptique basale (Larson et al., 1999), ainsi que divers défauts dans l'induction et le maintien de la LTP (Figure 17C) (Larson et al., 1999; Trinchese et al., 2004). Les altérations morphologiques et fonctionnelles des épines causées par l'Aβ sont réversibles, ce

qui indique que le dysfonctionnement synaptique n'est pas la conséquence secondaire d'une toxicité neuronale (Smith et al., 2009). L'explication privilégiée pour ces observations est que la balance LTP/LTD est perturbée en faveur de la LTD dans la maladie d'Alzheimer, sous l'action des oligomères du peptide A $\beta$ . Ces derniers auraient tendance à perturber la signalisation et le trafic des récepteurs AMPA et NMDA entraînant, en conséquence, la dépression synaptique (Hsieh et al., 2006; Snyder et al., 2005).



**Figure 18. Les dysfonctionnements synaptiques précèdent la mort neuronale**

Diagramme mettant en évidence l'enchaînement supposé des événements pathogènes dans les maladies neurodégénératives. Nous prenons ici l'exemple de la maladie d'Alzheimer, particulièrement étudiée, mais cette séquence d'événements semble généralisable aux autres pathologies neurodégénératives.

Dans la maladie humaine, l'étude de patients avec des troubles cognitifs mineurs (décédés pour d'autres raisons) a permis de mettre en évidence que l'étendue des désordre cognitifs corrélait de manière plus robuste avec la perte synaptique, qu'avec la présence d'agrégats d'A $\beta$  ou de Tau (Terry et al., 1991). Le caractère quasi-indétectable des premiers troubles de la mémoire, associé au fait que les épines dendritiques sont considérées comme le substrat cellulaire de la mémoire, suggèrent que la maladie pourrait commencer par des altérations fines du fonctionnement des synapses. La perte synaptique ne peut pas expliquer à elle-seule la perte de matière neuronale observée en imagerie cérébrale, il est évident que les étapes plus tardives de la maladie sont associées à une mort neuronale massive. Les dysfonctionnements synaptiques sont considérés comme des phénomènes précoces, se traduisant par des altérations structurales et fonctionnelles des synapses. Elles conduisent à des pertes synaptiques et pourraient contribuer progressivement à la mort neuronale et aux troubles cognitifs associés à la maladie d'Alzheimer (Figure 18).

Cette séquence d'événements constitue le schéma le plus probable pour expliquer la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, démence frontotemporale...). Le concept de la synapse comme cause universelle de toutes maladies neuropsychiatriques reste en débat, mais de plus en plus d'arguments suggèrent que les altérations synaptiques jouent un rôle central dans le déclenchement des nombreuses pathologies. Les dysfonctionnements synaptiques perturbent la transmission de l'information nerveuse de manière précoce, et semblent précéder les événements de mort neuronale. Ils s'accompagnent d'altérations fines de la structure, du fonctionnement et de la plasticité des épines dendritiques.

## **Conclusion sur les épines dendritiques**

Depuis leur mise en évidence par Cajal, à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, de nombreuses études se sont intéressées aux bases moléculaires et à l'organisation subcellulaire des épines dendritiques. Nous savons maintenant que ces structures jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement et la plasticité des neurones. Les composants majoritaires des épines dendritiques et de la densité postsynaptique ont été identifiés, ainsi que leur implication dans les processus de plasticité synaptique. Cependant, l'organisation supramoléculaire exhaustive des épines dendritiques et la dynamique des interactions susceptible de moduler la morphologie et le fonctionnement synaptique sont encore en attente de caractérisation.

Nous savons que les épines dendritiques sont un élément clé de la plasticité synaptique et que la plasticité synaptique sert de base à la mémorisation. Un des défis futurs concernera la compréhension du rôle exact des épines dendritiques dans les processus de mémorisation et d'apprentissage. En d'autres termes, il s'agira de déterminer si elles sont bien les « bases élémentaires de la mémoire ». La morphologie des épines semble être un élément important pour le maintien à long terme de la plasticité synaptique, il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes de base de la morphogénèse et de la stabilisation de ces structures.

Les épines dendritiques sont aussi impliquées dans de nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques. Il est donc impératif de mieux comprendre comment des altérations moléculaires peuvent conduire aux troubles cognitifs et moteurs associés à ces pathologies.

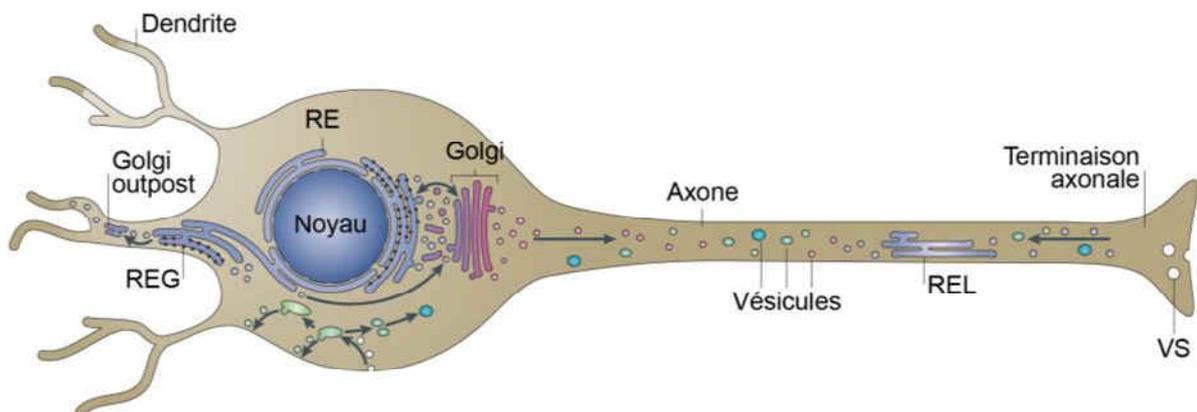
A cause du vieillissement de la population, les démences sont en passe de devenir un problème majeur de santé publique (150 millions de personnes seront touchées en 2050). A l'heure actuelle, il n'existe aucun médicament efficace. Un des enjeux scientifiques majeurs du XXI<sup>ème</sup> siècle est donc de développer de nouvelles thérapies. Les voies de signalisation postsynaptiques, impliquées dans les mécanismes de plasticité synaptique, constituent des cibles thérapeutiques majeures, en vue de stopper la neurodégénérescence ou d'empêcher l'évolution des troubles cognitifs, dans ces maladies.

## 2. ESCRT-III : une machinerie de déformation membranaire

### 2.1. Déformation et remodelage membranaire

#### 2.1.1. Le remodelage des membranes est indispensable à la physiologie neuronale

La forme d'une cellule conditionne sa fonction. Cette relation structure/fonction se vérifie particulièrement chez les organismes pluricellulaires, dans lesquels les cellules se spécialisent et acquièrent des caractéristiques morphologiques propres au tissu auquel elles appartiennent. Un exemple très frappant est celui des cellules neuronales, dans lesquelles les ramifications et la polarisation vont permettre respectivement l'intégration et la transmission du message nerveux (Figure 1 et Figure 19). Nous avons pu observer cette spécialisation de la surface neuronale jusqu'à l'extrémité des dendrites, où la membrane plasmique se courbe localement, pour donner naissance aux compartiments isolés que sont les épines dendritiques (Figure 4A et Figure 20). La relation structure/fonction s'applique aussi aux compartiments intracellulaires. Les organites présentent des invaginations et des replis membranaires qui vont conditionner leur fonction (Figure 19).

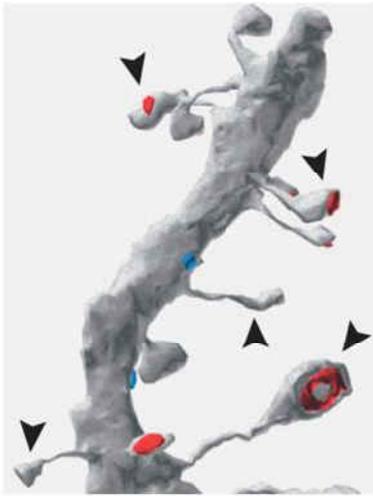


**Figure 19. Déformation des membranes dans une cellule neuronale**

Représentation schématique d'un neurone mettant en évidence sa morphologie et l'organisation de ses compartiments intracellulaires. RE : réticulum endoplasmique ; REL : RE lisse ; REG : RE granuleux ; VS : vésicule synaptique. Adapté de (Blackstone et al., 2011).

La membrane limitante de la cellule, comme celle de ses organelles est formée par une bicouche de phospholipides. Les bicouches lipidiques se comportent comme des fluides viscoélastiques. De manière isolée, elles ont tendance à conserver une courbure préférentielle, dite de repos, éventuellement nulle (membranes planes). L'observation des cellules en microscopie électronique permet de voir que les membranes peuvent présenter des courbures prononcées. La reconstruction tridimensionnelle d'un segment de dendrite met en évidence le degré de courbure membranaire au niveau des épines dendritiques (Figure 20). Il est évident que les contraintes physiques exercées sur la membrane plasmique au niveau de l'épine

dendritique sont plus élevées qu'un niveau de la dendrite sous-jacente. D'un point de vue thermodynamique, la courbure membranaire peut être considérée comme un processus défavorable, qui nécessite l'intervention de facteurs extrinsèques.



**Figure 20. Les épines dendritiques constituent des déformations extrêmes de la membrane plasmique**

Reconstruction tridimensionnelle d'un fragment de dendrite observé en microscopie électronique. Des exemples d'épines sont indiqués par des têtes de flèche.

Adapté de (Sheng and Hoogenraad, 2007).

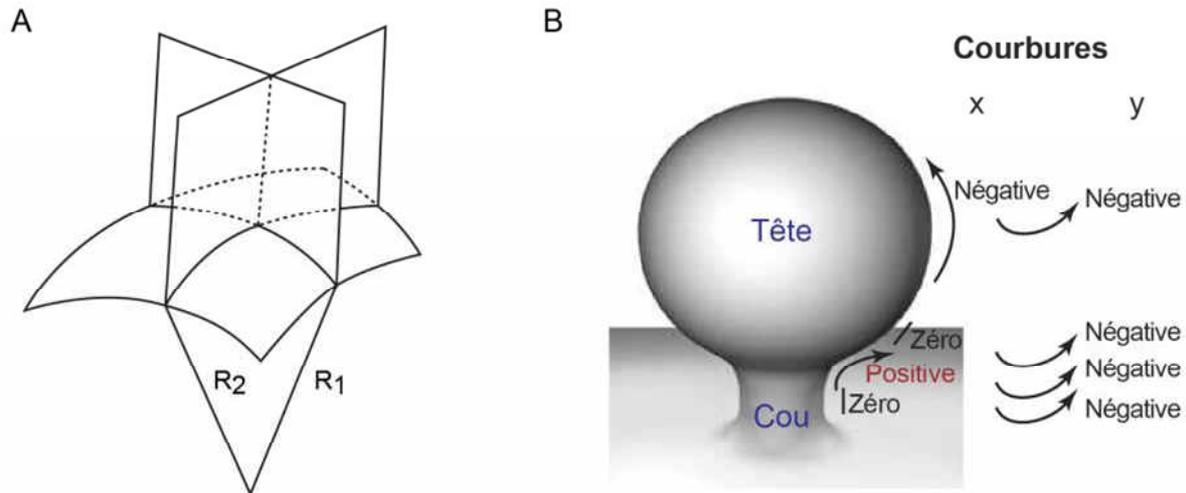
Les membranes peuvent former des structures très stables, comme nous avons pu le voir pour les épines dendritiques, ou au contraire, subir un remodelage très dynamique (extrême motilité des filopodes dendritiques). Les différents compartiments intracellulaires peuvent également communiquer, via la formation de petites vésicules. Ces vésicules bourgeonnent à partir de la surface du compartiment donneur et vont fusionner avec le compartiment receveur. Nous pouvons citer les vésicules d'endocytose, les vésicules du réticulum endoplasmique, ou encore les vésicules synaptiques, dans le cas des neurones (Figure 19). Ces phénomènes de déformation membranaire (bourgeonnement, fusion, fission) participent au trafic intracellulaire, un élément fondamental dans la physiologie neuronale.

Tous ces éléments indiquent que la déformation des membranes n'est pas qu'une conséquence passive du fonctionnement neuronal, mais qu'il s'agit d'un phénomène actif et finement régulé. Nous verrons par la suite quels sont les différentes topologies de déformation membranaire et nous donnerons un aperçu des mécanismes cellulaires impliqués.

### **2.1.2. Topologies de déformation membranaire**

Une bicouche phospholipidique est typiquement représentée comme une surface en deux dimensions, mais couvre en réalité un espace en trois dimensions (Zimmerberg and Kozlov, 2006). La forme d'une membrane, en un point donné, se caractérise par deux courbures principales ( $c_1$  et  $c_2$ ), dont les valeurs correspondent à l'inverse des rayons de courbure perpendiculaires en ce point ( $R_1$  et  $R_2$ ) (Figure 21A). La courbure est également associée à un signe, fonction de la convexité locale de la membrane. En biologie, par convention, une courbure positive correspond à une surface convexe sur la face cytosolique et une courbure négative à une surface concave (Antonny, 2011). Si nous prenons l'exemple d'une épine dendritique, nous pouvons considérer que la courbure au niveau de la tête est doublement

négative, car la surface membranaire cytosolique est concave dans les deux dimensions. En ce qui concerne le cou, la courbure est négative perpendiculairement et nulle longitudinalement (Figure 21B). Il faut noter, à nouveau, que l'épine dendritique est une protrusion relativement complexe, du point de vue de la courbure membranaire.



**Figure 21. Topologies de courbure membranaire : exemple d'une épine dendritique**

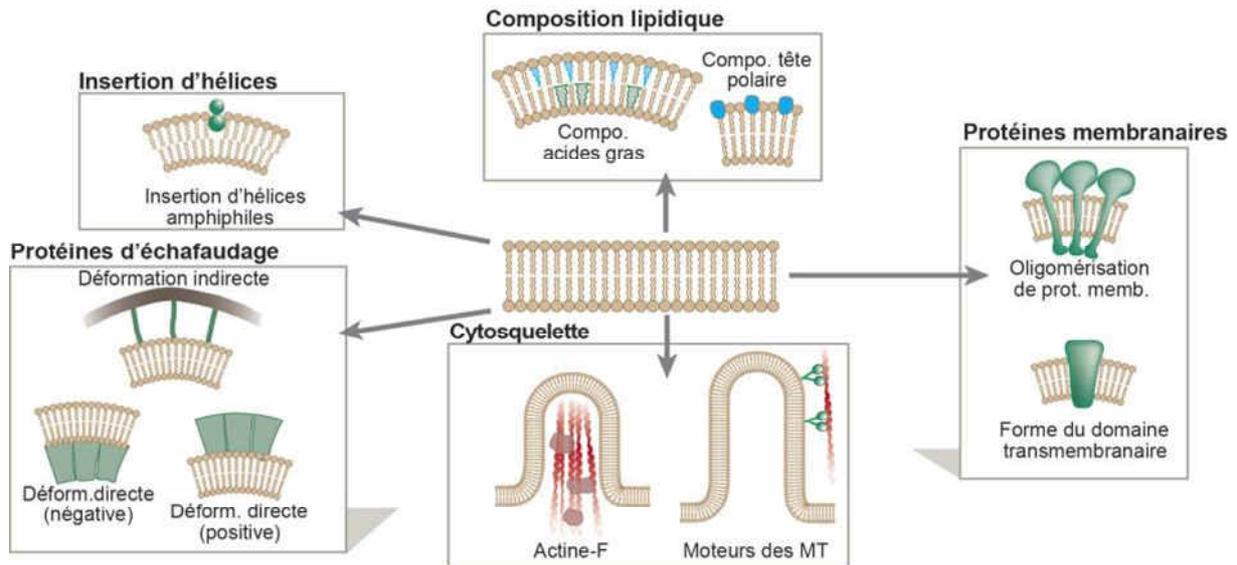
(A) Représentation schématique d'une surface membranaire en 3D. La déformation en un point donné est caractérisée par deux courbures ( $c_1$  et  $c_2$ ) dont les valeurs respectives correspondent à l'inverse des rayons de courbure en ce point ( $1/R_1$  et  $1/R_2$ ). Adapté de (Zimmerberg and Kozlov, 2006).

(B) Représentation tridimensionnelle d'une épine dendritique de type champignon. La courbure d'une épine est très complexe avec un enchainement de courbures négatives (concaves) et positives (convexes). Adapté de (McMahon and Gallop, 2005).

### 2.1.3. Grands mécanismes de remodelage membranaire

Le but de cette partie n'est pas de faire une liste exhaustive de tous les acteurs moléculaires capables de courber les membranes, mais d'appréhender les 5 grands moyens utilisés par la cellule pour induire ou détecter des courbures membranaires. Ces mécanismes sont représentés dans la Figure 22. Ils ne sont pas spécifiques des neurones, mais s'appliquent à tous les types cellulaires et tous les substrats membranaires.

**1 :** Des changements de la composition de la bicouche lipidique peuvent influencer localement la courbure membranaire. L'encombrement stérique et les propriétés physiques des têtes polaires et des queues aliphatiques peuvent varier en fonction de la classe de phospholipide. Un enchainement de certains phospholipides peut créer une asymétrie entre les faces de la bicouche et donc conduire à une courbure membranaire. La position et les propriétés des phospholipides sont régulées par des enzymes (flipases, sphingomyélinases...). Ces inhomogénéités peuvent suffire à faire bourgeonner la membrane localement (Bacia et al., 2005), mais il est peu probable que les lipides suffisent à déformer la membrane sur de longues distances et de manière stable (Zimmerberg and Kozlov, 2006)



**Figure 22. Grands mécanismes de déformation membranaire**

Les bicouches phospholipidiques peuvent être déformées par 5 grands types de mécanismes : modification de la composition lipidique ; insertion de protéines transmembranaires ; assemblage du cytosquelette ; déformation directe par l'association de protéines membranaires ; insertion d'hélices protéiques amphiphiles. Adapté de (McMahon and Gallop, 2005).

Les autres mécanismes de courbure de la membrane passent par l'intervention de protéines ou de complexes protéiques.

**2 :** Les protéines membranaires possèdent un ou plusieurs domaines qui traversent la bicouche phospholipidique. Certaines protéines, comme par exemple le canal potassique voltage dépendant ont une structure asymétrique s'insérant préférentiellement au sein de membranes courbées et finissent par participer à cette courbure. Des récepteurs de surface sont aussi capables de s'oligomériser (récepteur à l'acétylcholine), pour renforcer leur effet morphogénétique sur la membrane (McMahon and Gallop, 2005).

**3 :** Nous avons déjà eu un aperçu de l'importance du cytosquelette d'actine dans la morphogénèse des épines dendritiques (*Partie 1.3.3*). En effet, les éléments du cytosquelette (actine et tubuline) sont capables de se polymériser et d'induire des forces sur les membranes, avec ou sans l'aide de moteurs moléculaires. Nous pouvons citer les exemples des filopodes, formés principalement par une colonne d'actine en polymérisation ou des cils motiles, constitués de microtubules acétylés, associés avec des moteurs moléculaires de type Dynéine.

**4 :** Les protéines dites « d'échafaudage », s'assemblent à la surface membranaire pour induire des courbures. Les Dynamines et complexe ESCRT-III forment des oligomères hélicoïdaux impliqués dans la constriction des membranes des organelles. Les protéines « à manteau » (COPI, COPII, Clathrine...) s'assemblent à distance de la membrane et induisent la courbure via des intermédiaires protéiques. Enfin, les protéines à domaine BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs) sont capables de détecter et d'induire des courbures membranaires via leur conformation tridimensionnelle intrinsèque, en forme de banane (Suetsugu et al., 2010). Les protéines à domaine BAR (Amphiphysine, Endophilines...) se dimérisent et s'associent de manière

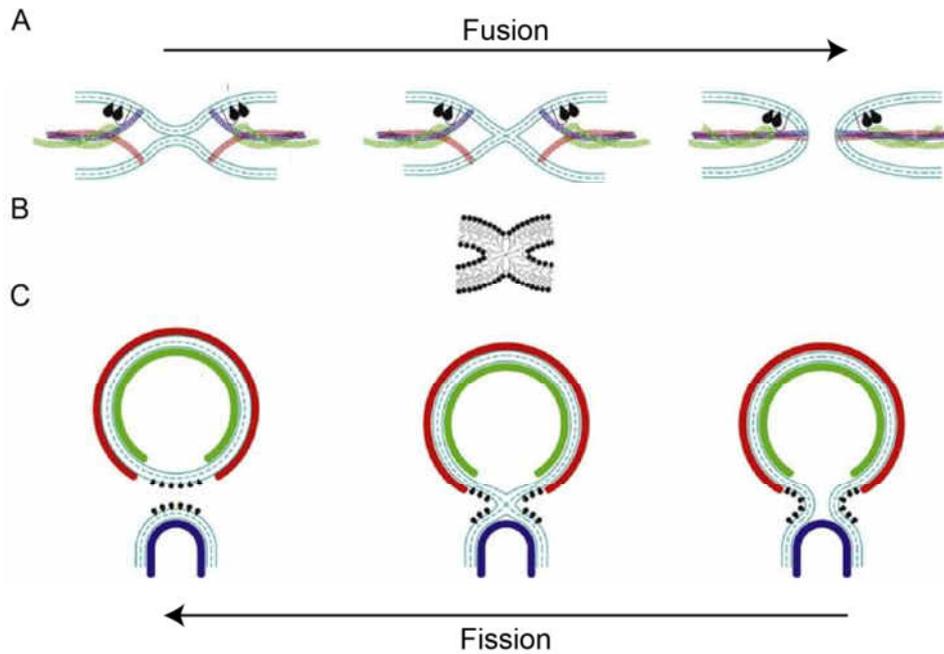
électrostatique avec la surface membranaire. Elles sont capables d'établir des courbures positives (BAR et EFC/F-BAR) ou négatives (I-BAR).

**5 :** Certaines protéines possèdent des hélices- $\alpha$  amphiphiles, c'est à dire qu'une face de l'hélice est polaire (chargée positivement) alors que l'autre face est hydrophobe. Nous retrouvons ce genre de domaine protéique sur les epsines, des protéines G monomériques (Arf, Arl...) et des protéines à domaine BAR. Les hélices amphiphiles sont capables de s'insérer à l'intérieur d'un des feuillet de la bicouche lipidique et d'induire une réorganisation des phospholipides adjacents. L'insertion asymétrique de plusieurs protéines suffit à créer des courbures importantes, comme pour les epsines qui participent à la déformation membranaire lors de l'endocytose clathrine-dépendante (Horvath et al., 2007).

#### *2.1.4. Fusion et fission membranaire*

Fusion et fission sont deux processus de remodelage membranaire topologiquement équivalents. Ils sont intimement liés à la courbure des membranes. La fusion membranaire se produit lorsque deux membranes initialement apposées se mélangent pour n'en faire qu'une seule. Le phénomène le plus caractéristique est peut être celui qui concerne la fusion des vésicules de neurotransmetteurs avec la membrane présynaptique (visible Figure 6). Malgré la diversité des substrats membranaires et des fonctions cellulaires qui impliquent la fusion, il semblerait que le déroulement du phénomène soit conservé dans ses grandes lignes (Kozlov et al., 2010). La fusion passe par le rapprochement des deux membranes sous la dépendance de l'interaction entre des protéines localisées sur les compartiments donneur et receveur (famille des SNARE). Lorsque les membranes sont suffisamment proches, se produit une hémifusion, c'est à dire une fusion des feuillet externes de la membrane (Figure 23A) (Chernomordik and Kozlov, 2005). Ceci forme une structure qu'on appelle « tige membranaire » ou « tige de fusion » (Figure 23B). Les feuillet internes fusionnent à leur tour pour aboutir à un pore de fusion, qui va ensuite s'agrandir. La fission membranaire suit le même principe de base que la fusion (Figure 23C). La courbure membranaire entraîne la formation d'un bourgeon. Au niveau du cou du bourgeon, se produit l'hémifusion et la formation de la tige de fission. Les complexes protéiques de fission sont impliqués dans la formation de la zone du cou du bourgeon. Ils courbent la membrane pour rapprocher les deux feuillet internes. Ces protéines peuvent s'assembler soit à l'intérieur du cou (cas d'ESCRT-III) soit à l'extérieur (cas de la Dynamine) (Figure 23C).

L'énergie nécessaire pour le remodelage provient de la courbure membranaire. En effet, les membranes pliées accumulent une certaine « énergie de courbure ». Cette énergie est relâchée lorsque les feuillet membranaires fusionnent. La fusion et la fission sont donc des phénomènes thermodynamiquement favorables du point de vue purement lipidique. C'est la courbure préalable de la membrane qui coûte de l'énergie (Kozlov et al., 2010). Certains complexes protéiques consomment de l'ATP pour déformer les membranes (Dynamine, qui hydrolyse le GTP), d'autres s'assemblent spontanément, mais nécessitent de l'ATP pour se dépolymériser (cas du complexe ESCRT-III, désassemblé par l'ATPase Vps4).



**Figure 23. Mécanismes de fusion et de fission membranaire**

(A) Fusion membranaire par le complexe SNARE. Le rapprochement des membranes provoque l'hémifusion, la formation d'une « tige de fusion », puis d'un pore de fusion qui finit par s'étendre.

(B) La tige membranaire : structure éphémère commune au processus de fusion et de fission membranaire.

(C) Fission membranaire réalisée par des protéines. La fission résulte de fortes courbures générées au niveau du cou du bourgeon de membrane. La courbure peut être générée de plusieurs manières : bleu (ESCRT-III) ; rouge (COPI et COPII) ; noir (Dynamine).

Adapté de (Kozlov et al., 2010).

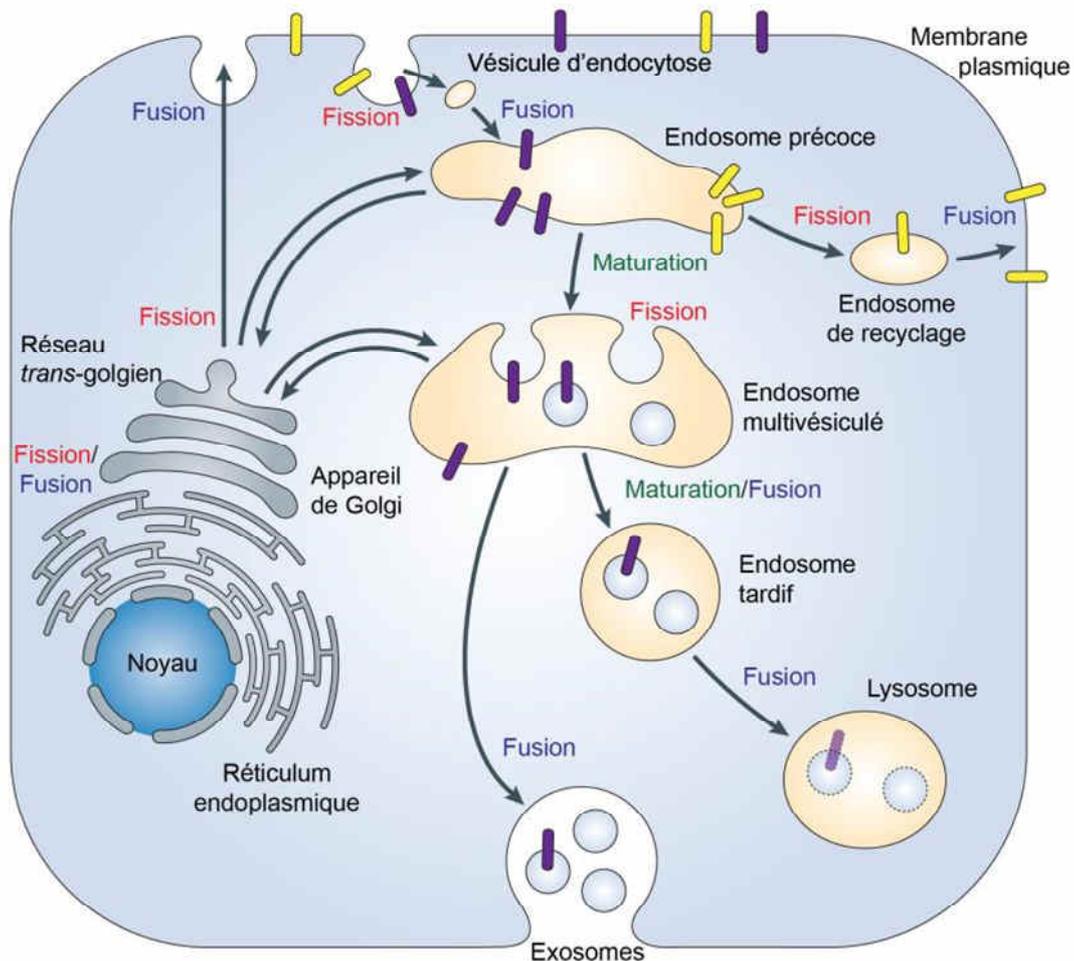
## 2.2. La machinerie ESCRT : un acteur du tri endolysosomal

### 2.2.1. La voie endolysosomale

Pour une cellule, la membrane plasmique est un lieu d'intégration des signaux extérieurs, via la présence de récepteurs transmembranaire, de protéines d'ancrage et de divers canaux ioniques. La composition en protéine de la membrane plasmique est donc un élément déterminant de la physiologie cellulaire. Les cellules eucaryotes disposent d'un système endomembranaire leur permettant de produire des protéines, de les transporter à la surface, de les recycler et de les dégrader. Nous parlons du système de trafic intracellulaire des protéines.

L'homéostasie des récepteurs de surface est maintenue par le système endolysosomal. Il a pour fonction principale d'effectuer un tri, sous l'influence de différents signaux, entre les protéines qui doivent être dégradées et celles qui peuvent être recyclées. Il est constitué par des compartiments membranaires appelés endosomes. Nous retrouvons des endosomes précoces, des endosomes de recyclage, des endosomes tardifs et des lysosomes. Le fonctionnement du système endolysosomal est basé sur un processus de maturation des

endosomes, associé à un enchainement de processus de fusion et de fission des compartiments entre eux (Figure 24). Il faut noter que le système endolysosomal communique de manière étroite avec le système de biosynthèse et de modification des protéines, constitué par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Alberts et al., 2007b).



**Figure 24. Les compartiments de la voie endolysosomale**

La voie endolysosomale est responsable de l'homéostasie des protéines de surface. Elle est composée de 4 grands compartiments endomembranaires, les endosomes : endosomes précoce, de recyclage, tardif et lysosome. Le trafic des endosomes passe par des processus de fission (rouge), de fusion (bleu) et de maturation (verte). Il existe également beaucoup de voies alternatives non mentionnées ici. Les récepteurs sont triés au niveau des endosomes précoces et envoyés, soit vers une voie de dégradation (récepteur violet), soit vers une voie de recyclage (récepteur jaune). Notez la formation de vésicules intraluminales, par fission de la membrane limitante de l'endosome, pour former des endosomes multivésiculés.

Adapté de (Bird et al., 2009).

Les protéines membranaires circulent constamment entre la surface et les endosomes précoces. A la membrane plasmique, les protéines sont endocytées et se retrouvent dans des vésicules d'endocytose qui vont fusionner avec les endosomes précoces. Les endosomes précoces (ou endosomes de tri) constituent la plateforme de triage du système endolysosomal. Les protéines endocytées vont être dirigées soit vers la voie de dégradation, soit vers la voie

de recyclage. Les endosomes précoces peuvent libérer des vésicules qui vont fusionner avec des endosomes de recyclage, qui peuvent à leur tour donner des vésicules ou fusionner directement avec la membrane plasmique. Les endosomes précoces peuvent également subir une étape de maturation. Par un processus particulier de fission membranaire, les protéines à dégrader se retrouvent internalisées dans des petites vésicules internes, d'une cinquantaine de nanomètres de diamètre, appelées vésicules intraluminales. Ces endosomes ont été appelés endosomes multivésiculés ou corps multivésiculés (EMV), du fait de leur aspect caractéristique en microscopie électronique (Palay and Palade, 1955) (Figure 25A). Les EMV mûrissent ensuite en endosomes tardifs. Tandis que les vésicules intraluminales s'accumulent, ils s'acidifient progressivement et migrent en direction de la région périnucléaire, via un transport microtubulaire. La fusion endosomes tardifs avec des lysosomes va entraîner la libération des vésicules intraluminales et la dégradation de leur contenu par des hydrolases acides. Il faut également noter que les EMV peuvent fusionner directement avec la membrane plasmique pour libérer leurs vésicules dans le milieu extérieur. Elles prennent alors le nom d'exosomes (Théry et al., 2002) (Figure 24).

Le destin des protéines nouvellement endocytées dépend de signaux moléculaires à leur surface. La mono-ubiquitination des protéines endocytées (dites « cargo » en anglais) va entraîner leur prise charge par des protéines spécifiques qui vont le partitionner dans certains microdomaines de l'endosome précoce et les emmener vers la voie de dégradation (récepteur violet sur la Figure 24). En l'absence d'un tel signal les cargos sont dirigés vers les extrémités tubulaires des endosomes précoces, qui vont bourgeonner et former des endosomes de recyclage (récepteur jaune sur la Figure 24). Ceci aboutit à la réexpression des protéines à la surface cellulaire (Maxfield and McGraw, 2004).

Comme nous venons de le voir les processus de fusion et de fission membranaire jouent un rôle central dans le trafic intracellulaire des protéines. Ils font intervenir des acteurs moléculaires spécifiques à chaque étape. L'identité des compartiments est donnée principalement par la composition en phosphoinositides de la membrane et par la présence à la surface de protéines appartenant à la famille des petites GTPases (principalement de la famille des Rab, ainsi que des Arf et Arl, pour le transport vésiculaire) (Di Paolo and De Camilli, 2006). Les phosphoinositides permettent le recrutement des facteurs d'échange (GEF) et d'activité GTPase (GAP) ou directement des petites protéines G. Les protéines G, sous leur forme GTP, vont ensuite permettre le recrutement spécifique d'effecteurs protéiques sur les compartiments.

Le système endolysosomal est présent dans tous les types cellulaires. Il joue un rôle particulièrement important dans les neurones (Hanley, 2008, 2010). Nous avons vu que la physiologie neuronale est dépendante de la présence de récepteurs aux neurotransmetteurs au niveau postsynaptique. Les phénomènes de plasticité synaptiques (LTP-LTD) sont directement dépendants du nombre de récepteurs AMPA à la surface. Les phénomènes d'endocytose et d'exocytose sont régulés par l'activité synaptique. L'activation des récepteurs AMPA conduit à leur internalisation et leur routage vers la voie de dégradation. Au contraire, lors de l'activation simultanée des récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA internalisés sont

conduits vers la voie de recyclage et réexprimés à la surface (Ehlers, 2000). La machinerie de recyclage semble donc sous la dépendance de l'activité synaptique et en particulier de la signalisation calcique des récepteurs NMDA. Les endosomes de recyclage serviraient de compartiment de stockage et fourniraient rapidement des récepteurs AMPA lors de la potentialisation (Kennedy and Ehlers, 2006; Park et al., 2004).

### 2.2.2. Découverte des protéines ESCRT

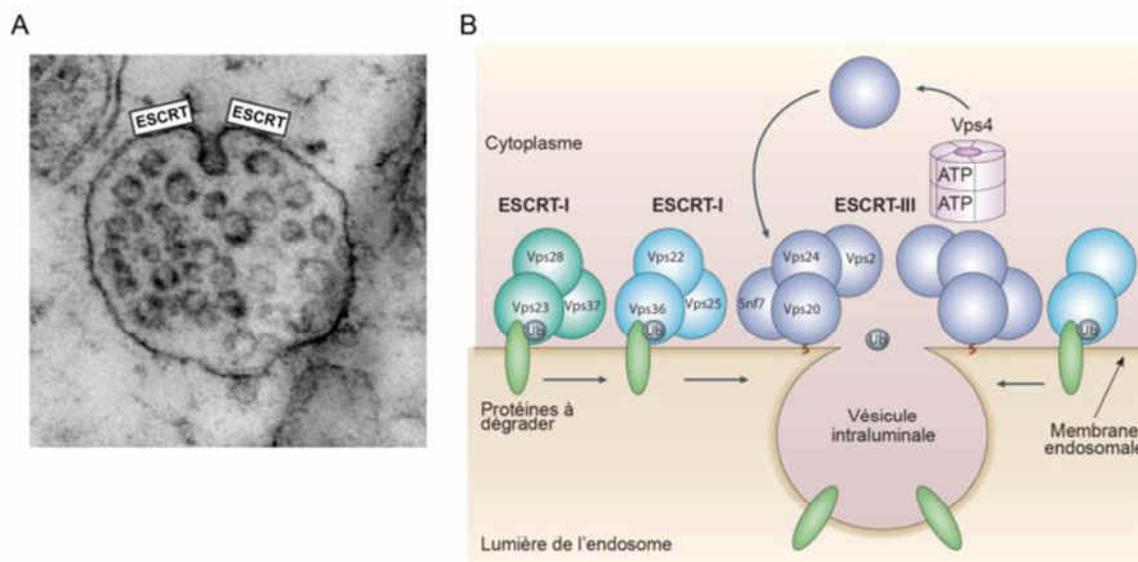
La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un modèle très utilisé pour l'étude du système endolysosomal. Des analyses génétiques ont permis d'identifier les gènes impliqués dans l'adressage des protéines à la vacuole, l'équivalent de fonctionnel du lysosome chez la levure (Bankaitis et al., 1986; Rothman and Stevens, 1986). Cette cinquantaine de mutants, appelés *vps* (vacuolar protein sorting) (Bryant and Stevens, 1998), ont pu être classés en sous-familles. Les caractéristiques morphologiques de leurs différents compartiments endosomaux reflètent quel stade de maturation est altéré (Raymond et al., 1992). Une famille de mutants cause l'accumulation d'endosomes tardifs et EMV aberrants, regroupés sous le terme d'endosomes de classe E. Les protéines associées ont été appelés Vps de classe E et sont au nombre de 17. L'absence de vésicules dans les endosomes de classe E a permis d'établir le lien entre la formation des vésicules intraluminales et la dégradation des cargos. Les Vps de classe E sont impliquées dans le transport des protéines destinées à la vacuole, le long de la voie de dégradation et plus particulièrement dans leur adressage à l'intérieur des vésicules intraluminales des EMV. Elles permettent également la genèse des vésicules elles-mêmes, par fission de la membrane limitante de l'endosome.

Les Vps de classe E sont conservées depuis la levure, jusqu'aux mammifères, ce qui souligne l'importance des voies d'adressage dans les EMV. La majorité de ces protéines appartiennent à la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), appelée ainsi car elle escorte les cargos dans la voie de dégradation. Cette machinerie est un complexe hétéro-polymérique composé de 4 sous-complexes (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III), qui s'assemblent séquentiellement sur la face cytosolique de la membrane endosomale (Figure 25A et B). Ils ont été caractérisés à la même époque, par le groupe de recherche de Scott Emr, et nommés en fonction de leur ordre de recrutement : ESCRT-0 (Katzmann et al., 2003) ; ESCRT-I (Katzmann et al., 2001) ; ESCRT-II (Babst et al., 2002a) et ESCRT-III (Babst et al., 2002b). Comme nous allons le voir, les complexes ESCRT sont présents de manière transitoire à la surface des endosomes. Le désassemblage final dépend de l'activité d'une protéine chaperon, l'AAA ATPase Vps4 (Babst et al., 1997).

Le signal de recrutement de ces complexes provient de l'ubiquitination des récepteurs ou protéines à dégrader au niveau de leur domaine cytoplasmique. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés qui est liée de manière covalente sur des résidus lysines de protéines substrat, par des enzymes spécifiques, les ubiquitine-ligases. L'ubiquitination peut donc s'apparenter à une modification post-traductionnelle réversible des protéines. Cette ubiquitination a lieu en amont de la voie endolysosomale. Le blocage de l'ubiquitination

n'affecte pas l'internalisation des protéines au niveau de la membrane plasmique, mais entraîne des problèmes de routage et de formation des EMV, par défaut de recrutement des ESCRT.

La conservation des ESCRT entre les levures et les mammifères met en avant l'importance de la voie de dégradation endolysosomale chez tous les eucaryotes (Tableau 3). L'assemblage des complexes ESCRT et leur rôle fonctionnel dans le trafic intracellulaire des protéines ont été particulièrement étudiés dans la levure. Nous allons donc d'abord nous intéresser à ESCRT dans le contexte de la formation des EMV, principalement chez *S. cerevisiae*. Nous verrons par la suite de comment ces mécanismes ont été conservés chez les métazoaires, et que les propriétés de la machinerie ESCRT sont aussi impliquées dans d'autres mécanismes cellulaires.



**Figure 25. Formation des endosomes multivésiculés par la machinerie ESCRT**

(A) EMV observé en microscopie électronique à transmission. Les vésicules intraluminales se forment par un processus de fission de la membrane limitante de l'endosome. Diamètre des vésicules : environ 50 nm. Collection F. Hemming (GIN, Grenoble).

(B) Représentation schématisée de l'assemblage séquentiel des complexes ESCRT sur la face cytosolique de la membrane endosomale. Les complexes sont recrutés par un signal ubiquitine sur les protéines à dégrader. ESCRT permet à la fois la prise en charge des protéines à dégrader et leur internalisation dans les vésicules intraluminales. Notez que le complexe ESCRT-0 (qui fonctionne en amont d'ESCRT-I) n'est pas représenté sur ce schéma. Adapté de (Gruenberg and Stenmark, 2004).

### 2.2.3. Assemblage séquentiel du complexe ESCRT « canonique » (contexte de la formation des EMV)

Les composants de la machinerie ESCRT sont listés dans le Tableau 3. Nous nous limiterons dans cette partie à comprendre la mécanistique d'assemblage de la machinerie ESCRT

« canonique », c'est à dire celle impliquée dans la formation des EMV. Nous ne tiendrons pas compte de toutes les isoformes qui existent chez les métazoaires.

**Tableau 3.** Nomenclature des protéines ESCRT chez la levure et le mammifère (humain)

Complexe	Levure	Autre dénom. de levure	Humain	Autre dénomination chez l'humain
<b>ESCRT-0</b>	Vps27		HRS	HGS
	Hse1		STAM1	
			STAM2	
<b>ESCRT-I</b>	Vps23	Stp22	TSG101	VPS23
	Vps37	Srn2	VPS37A	HCRP1, PQBP2
			VPS37B	
			VPS37C	PML39
			VPS37D	WBSCR24
	Vps28		VPS28	
	Mvb12		MVB12A	FAM125A, CFBP
			MVB12B	FAM125B, C9orf28
			UBAP1	
<b>ESCRT-II</b>	Vps36		VPS36	EAP45
	Snf8	Vps22	VPS22	EAP30, SNF8, DOT3
	Vps25		VPS25	EAP20, DERP9, FAP20
<b>ESCRT-III</b>	<b>Vps20</b>	Chm6	<b>CHMP6</b>	VPS20
	<b>Snf7</b>	Vps32, Did1	<b>CHMP4A</b>	VPS32A, SNF7-1, HSPC134, SHAX2
			<b>CHMP4B</b>	VPS32B, SNF7-2, CTPP3, SHAX1
			<b>CHMP4C</b>	VPS32C, SNF7-3, SHAX3
	<b>Vps24</b>	Did3	<b>CHMP3</b>	VPS24, NEDF
	<b>Vps2</b>	Did4, Chm2	<b>CHMP2A</b>	VPS2A, BC-2
			<b>CHMP2B</b>	VPS2B, DMT1
	Did2	Vps46, Chm1	CHMP1A	VPS46A, PCOLN3, PRSM1
			CHMP1B	VPS46B
	Vps60	Chm5	CHMP5	VPS60, PNAS2, HSPC177
	Ist1		IST1	KIAA0174, PM28
Yjl049w		CHMP7		
<b>Complexe Vps4</b>	Vps4	End13	VPS4A	
			VPS4B	SKD1
	Vta1		LIP5	VTA1, SBP1, DRG1, HSPC228
<b>Famille Alix</b>	Bro1	Vps31	ALIX	AIP1, PDCD6IP, DRIP4, HP95
			HDPTP	PTP-TD14
			BROX	BROFTI
	Rim20			

Adapté de (Hanson and Cashikar, 2012).

## ESCRT-0

ESCRT-0 est composé d'un hétérodimère constitutif des protéines Vps27 et Hse (Hrs et STAM chez les métazoaires). L'élimination de l'une des sous-unités empêche la formation des vésicules intraluminales (Razi and Futter, 2006). ESCRT-0 est recruté sur la membrane endosomale par les cargos ubiquitinylés et le PtdIns(3)P (phosphatidyl-inositol-3-phosphate), particulièrement enrichi dans les endosomes précoces (Di Paolo and De Camilli, 2006). L'ubiquitine est reconnue par des motifs UIM (ubiquitin interacting motif) et le



l'assemblage coïncide avec l'association sur la membrane. L'absence de motifs d'interaction avec l'ubiquitine suggère qu'ESCRT-III fonctionne indépendamment de la présence du cargo. ESCRT-III est constitué de sous-unités très semblables sur un plan structural. Il existe 8 sous-unités chez la levure (et 12 chez l'homme). Les 4 sous-unités Vps20, Snf7, Vps24 et Vps2 constituent le « cœur du complexe (Tableau 3). Les sous-unités se polymérisent dans cet ordre, sous forme de filaments (Teis et al., 2008), et avec une stœchiométrie définie, dans le cas de la formation des EMV (Saksena et al., 2009). La structure en Y avec les deux sous-unités de Vps25 semble recruter deux sous-unités de Vps20 qui vont initier la formation de deux filaments ESCRT-III (Henne et al., 2012; Teis et al., 2010). Chaque sous-unité Vps20 recrute Snf7 qui s'oligomérisent à la surface membranaire, puis Vps24 et Vps2 s'associent au filament de Snf7, bloquent la polymérisation et recrutent l'AAA ATPase Vps4 (Figure 26). La stœchiométrie estimée se situe donc autour de 1.15.1.1 pour chaque filament, avec 15 sous-unités pour Snf7. Nous aborderons plus en détail ESCRT-III dans la partie dédiée à la mécanistique d'assemblage de ce complexe (Partie 2.4).

### **Complexe Vps4**

Vps4 est considéré comme une protéine associée aux ESCRT. C'est la première Vps de classe E dont la fonction biochimique ait été définie (Babst et al., 1998). Vps4 fait partie de la famille des AAA ATPases, chaperons impliqués dans le dépliement des protéines ou le désassemblage des complexes protéiques (Ogura and Wilkinson, 2001). L'expression d'un mutant catalytiquement inactif de l'enzyme Vps4 entraîne une accumulation des ESCRT au niveau de la membrane endosomale. Ceci a très vite suggéré que Vps4 utilisait l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour dépolymériser ESCRT. Vps4 fonctionne en dodécamère (12 sous-unités) arrangé sous forme de deux anneaux hexamériques superposés (Figure 26). Il est recruté via ESCRT-III et s'associe à des régulateurs de son activité ATPasique, comme Vta1. Les domaines MIT (microtubule interacting and transport) sur Vps4 interagissent avec les domaines MIM1 ou MIM2 (MIT interacting motif) situés sur la partie C-terminale des sous-unités ESCRT-III (Shestakova et al., 2010). Nous reviendrons également sur le rôle de Vps4 dans la partie consacrée à ESCRT-III (Partie 2.4).

### **La famille Bro1/Alix**

La protéine Bro1 de levure n'est pas une protéine ESCRT en tant que telle. Elle possède trois homologues chez les mammifères (Alix : Alg2 interacting protein X, BROX et HDPTP). La protéine la mieux caractérisée est Alix (Odorizzi, 2006). Elle interagit avec ESCRT-I et ESCRT-III. Elle se lie également à une multitude d'effecteurs protéiques (cytosquelette d'actine, kinases, protéines de la voie apoptotique...). Bro1 de levure semble importante pour la formation des EMV, en régulant l'activité de la sous-unité Snf7 (ESCRT-III) et en reconnaissant les cargos ubiquitinylés (Pashkova et al., 2013; Wemmer et al., 2011). En ce qui concerne Alix son rôle dans le trafic intracellulaire n'est pas encore démontré. Nous verrons plus tard qu'elle semble importante pour le recrutement du complexe ESCRT-III dans d'autres processus cellulaires (Partie 2.3).

### 2.3. La machinerie ESCRT chez les mammifères : diversification des fonctions et des substrats membranaires

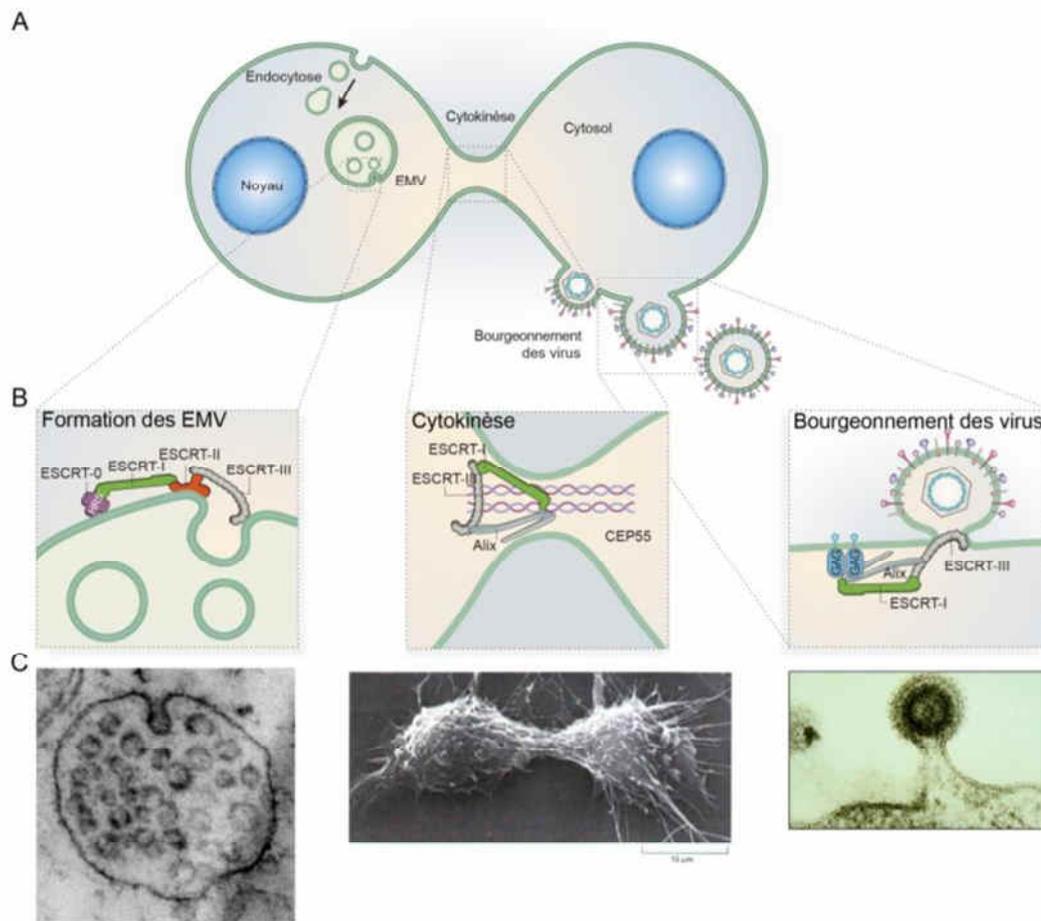
Les premières caractérisations du rôle des sous-complexes ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) concernent la prise en charge des cargos ubiquitinylés et leur intégration dans les vésicules intraluminales des endosomes multivésiculés (EMV). Ces résultats datent d'il y a seulement une dizaine d'année (Babst et al., 2002a, 2002b; Katzmann et al., 2001, 2003). Depuis, les études concernant la compréhension et fonctionnement des complexes ESCRT se sont multipliées (685 articles, depuis le premier en 2001, répondent au mot clé « ESCRT », sur le moteur de recherche Pubmed). Ces études s'étendent dans trois axes principaux. (1) Le contexte de la formation des EMV chez la levure est un système bien calibré qui permet d'étudier le rôle fonctionnel de chaque sous-complexe et sous-unité. La manipulation génétique des levures est aisée et permet d'aborder les problèmes d'ordre d'assemblage ou de stœchiométrie. (2) Le travail *in vitro*, avec l'utilisation de protéines recombinantes purifiées, concerne la caractérisation structurale des sous-unités, les interactions protéines-protéines et la mécanistique d'assemblage. (3) Enfin, les études dans les cellules de mammifères ont mis au jour (et mettent encore au jour) de nouvelles fonctionnalités impliquant la machinerie ESCRT.

Depuis leur découverte, les ESCRT ont évolué du statut de simple machinerie de tri des protéines à dégrader, vers le statut d'une plateforme de déformation et de fission membranaire commune à de nombreux processus cellulaires. Dans cette partie nous allons nous intéresser aux processus impliquant la machinerie ESCRT dans les cellules de mammifères. Nous verrons également que le mécanisme de déformation membranaire catalysé par les ESCRT possède une topologie bien particulière.

#### 2.3.1. Topologie de la déformation membranaire dépendante des ESCRT

Peu après la première caractérisation d'ESCRT-I chez *S. cerevisiae*, il a été montré que Tsg101 (ESCRT-I) et d'autres ESCRT étaient importants pour le bourgeonnement du VIH-1 à partir de la membrane plasmique (Garrus et al., 2001). Tsg101 et la protéine Alix, associée à ESCRT, sont également recrutées au niveau du corps intermédiaire et requises pour l'abscission finale, lors de la cytokinèse. (Carlton and Martin-Serrano, 2007). Ces découvertes ont fait naître l'hypothèse que la machinerie ESCRT pouvait être un effecteur direct de la déformation membranaire. En effet, le type de courbure membranaire requis pour la formation des vésicules intraluminales, pour le bourgeonnement des virus et pour l'abscission finale lors de la cytokinèse, est topologiquement le même (Figure 27 A-C). Il s'agit d'un type de fission non conventionnel, dit « par l'intérieur », par opposition avec les autres types de fission. En effet les protéines comme la Dynamine permettent la fission de vésicules via un phénomène de constriction « par l'extérieur » du cou de la vésicule (Morlot and Roux, 2013). Dans le cas des phénomènes de déformation dépendants d'ESCRT, la topologie est inversée (Figure 28 A

et B). Dans les EMV, les vésicules bourgeonnent vers l'intérieur de l'endosome en s'éloignant du cytoplasme (« away from the cytoplasm »), alors que pour les vésicules d'endocytose, c'est l'inverse car celles-ci rentrent à l'intérieur de la cellule. Les complexes ESCRT s'assemblent sur la face cytosolique des membranes (Figure 24). Un phénomène de bourgeonnement conduit à la formation d'un cou membranaire (« tige de fission ») à l'intérieur duquel les sous-unités d'ESCRT-III vont se polymériser et conduire à la scission (phénomène de fission décrit en Figure 23). La sortie des virus enveloppés ou l'abscission lors de la cytokinèse nécessite le même type de remodelage de la membrane que la formation des EMV, seul le substrat membranaire est différent (membrane plasmique contre membrane endosomale) (Figure 27 A et B). La microscopie électronique met en évidence que l'homologie entre les vésicules intraluminales et les bourgeons viraux est particulièrement frappante (Figure 27C). Dans chacune de ces situations, ESCRT participe à une courbure négative de la surface membranaire (concave sur la face cytosolique, voir Figure 21) et à tendance à rapprocher les feuillettes internes (face cytosolique) des bicouches phospholipidiques (Henne et al., 2011; Hurley and Hanson, 2010).

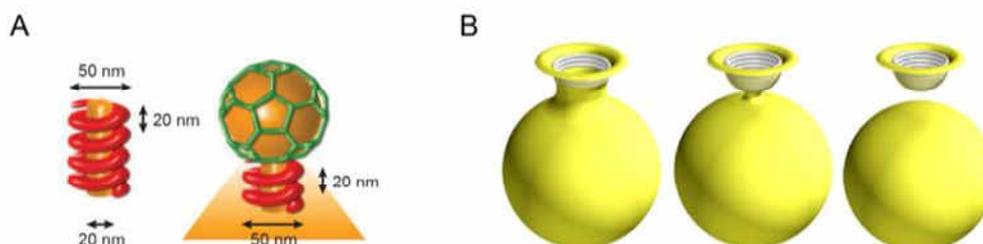


**Figure 27. La machinerie ESCRT est impliquée dans plusieurs processus de fission membranaire de topologie équivalente**

(A) Schéma mettant en évidence les trois principaux processus impliquant la machinerie ESCRT chez les mammifères : formation des EMV, cytokinèse et bourgeonnement des virus.

(B) Grossissement au niveau des zones de fission. La topologie inversée par rapport aux autres machineries de fission, la déformation membranaire est exercée par l'intérieur. Adapté de (Raiborg and Stenmark, 2009).

(C) Images de microscopie électronique correspondantes : EMV (coll. Fiona Hemming) ; cytokinèse (MBOC 5<sup>ème</sup> Ed.) ; virus (H.R Gelderblom).



**Figure 28. Dynamine et ESCRT : deux topologie de fission membranaire inversées**

(A) Scission d'une vésicule à puits de clathrine par la Dynamine. La Dynamine (rouge) forme un filament autour du cou de la vésicule qui entraîne la constriction, puis la scission. Adapté de (Morlot and Roux, 2013).

(B) Scission d'une vésicule intraluminaire par la machinerie ESCRT. ESCRT (filament blanc) s'assemble à l'intérieur du cou de la vésicule, sur la face cytosolique. Adapté de (Peel et al., 2011).

Nous nous intéresserons au processus de scission proprement dit dans la partie dédiée à ESCRT-III (*Partie 2.4*).

### **2.3.2. Processus cellulaires impliquant la machinerie ESCRT**

Par rapport aux levures la principale caractéristique de la machinerie ESCRT des mammifères est la divergence fonctionnelle. Cette divergence s'exprime par la présence de nombreuses isoformes absentes chez la levure (**Tableau 3**), mais aussi au niveau des substrats membranaires et des mécanismes de déformation membranaire. Nous allons voir que les ESCRT sont impliqués dans beaucoup de processus, au-delà des trois que nous avons listées plus haut. Cette partie a pour but de donner un aperçu de chacun des mécanismes et de ses spécificités au niveau de l'assemblage de la machinerie ESCRT.

#### **Trafic intracellulaire**

Bien que les mammifères disposent d'autres systèmes de formation des endosomes multivésiculés (EMV) (**Woodman and Futter, 2008**), ce rôle de la machinerie ESCRT est néanmoins conservé. Il a été plus particulièrement étudié dans le contexte de dégradation du récepteur à l'EGF, qui est envoyé vers la voie de dégradation lorsqu'il est fixé par l'EGF. La mécanistique d'assemblage est probablement similaire à celle de la machinerie ESCRT « canonique », qui a été décrite chez la levure (*partie 2.2.3*). Le signal de prise en charge par la machinerie ESCRT est également l'ubiquitine. La présence de multiples isoformes autorise à penser qu'il puisse y avoir des régulations différentielles de l'assemblage en fonction des récepteurs pris en charge.

Certaines données suggèrent que la machinerie ESCRT peut également prendre en charge des cargos destinés à être recyclés (**Baldys and Raymond, 2009**). C'est le cas du récepteur à l'EGF quand il est fixé par certains ligands, comme l'amphiréguline. De manière intéressante, le recyclage ne nécessite que ESCRT-I et ESCRT-III. Un travail récent suggère que le rôle d'ESCRT dans la voie de recyclage passe par le recrutement de la Spastine, une protéine de coupure des microtubules qui possède un domaine MIT (comme Vps4) et qui est donc recrutée par ESCRT-III (**Allison et al., 2013**). La Spastine serait impliquée dans la fission des tubules des endosomes précoces, un phénomène important dans les voies de recyclage.

#### **Bourgeoisement des virus enveloppés**

Les virus piratent les machineries moléculaires de la cellule hôte pour répliquer leur matériel génétique et produire les protéines nécessaires à leur multiplication. Après assemblage, les virions doivent sortir de la cellule hôte pour pouvoir en infecter de nouvelles. Il a été montré que certains virus enveloppés, comme le virus du SIDA (VIH-1), utilisaient les propriétés de la machinerie ESCRT pour bourgeonner à partir de la surface cellulaire (**von Schwedler et al., 2003**). Les ESCRT sont recrutés au niveau du site de bourgeoisement viral par la protéine virale Gag. Les domaines L (« Late domains ») PTAP et XPxL, de la protéine Gag du VIH-1, sont capables de recruter respectivement les protéines Tsg101 (ESCRT-I) et Alix (**Garrus et al.,**

2001; Strack et al., 2003). Outre la différence de substrat membranaire, la principale différence avec la formation des EMV provient du fait que le bourgeonnement viral ne requiert pas tous les sous-complexes ESCRT. La déplétion en ESCRT-0, ESCRT-II ou Vps20 (ESCRT-III) n'affecte pas la sortie des particules virales (Langelier et al., 2006). L'ubiquitination de Gag semble aussi jouer un rôle important en favorisant le recrutement de Tsg101 au site de fission (Sette et al., 2013). Le recrutement différentiel de certains sous-complexes a amené l'hypothèse que la protéine Alix pouvait jouer un rôle dans le recrutement de ESCRT-III sans passer par ESCRT-II. En effet, cette protéine est capable d'interagir avec Tsg101 (ESCRT-I) et CHMP4 (ESCRT-III) (Katoh et al., 2003, 2004). Elle est recrutée au site de fission juste après la mise en place de la protéine Gag, dans le cas du virus EIAV (Jouvenet et al., 2011). Alix pourrait servir à faire un pont entre ESCRT-I et ESCRT-III ou, alternativement, directement recruter ESCRT-III (notez la présence d'Alix dans les schémas des Figures 26 et 27).

### **Abscission finale lors de la cytokinèse**

C'est clairement après la découverte de l'implication d'ESCRT dans les étapes finales de la division cellulaire que ce complexe a commencé à être considéré comme une machinerie spécialisée dans la scission membranaire. En effet, dans les cellules animales, la mitose se termine par l'étape de cytokinèse qui consiste en la scission du fin pont membranaire qui relie les deux cellules filles, de part et d'autre du corps intermédiaire (Figure 27C). Les sous-unités Tsg101 et Alix (les mêmes que pour le bourgeonnement) sont les premières à avoir été montrées comme requises pour le déroulement de l'abscission (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007). Elles sont recrutées au niveau du site d'abscission par la protéine Cep55 (Centrosomal protein of 55 kDa). Les sous-unités d'ESCRT-III recrutent également la Spastine, via son domaine MIT (Reid et al., 2005). Cette protéine est essentielle durant la cytokinèse et a pour fonction de couper les microtubules polaires qui relient les deux cellules filles pour permettre la rupture du pont intercellulaire. Cette fonction des ESCRT est conservée depuis les archéobactéries, qui utilisent des homologues d'ESCRT-III et de Vps4 pour réaliser leur division cellulaire (Lindas et al., 2008; Samson et al., 2008). La cytokinèse reste, à ce jour le seul processus endogène qui ait permis l'identification, en conditions physiologiques, des filaments circulaires formés par ESCRT-III, dont nous reparlerons par la suite (Elia et al., 2011; Guizetti et al., 2011). ESCRT-III forme des anneaux protéiques sur la membrane plasmique, latéralement par rapport au site de fission. Ces oligomères sont considérés comme les catalyseurs de la constriction membranaire et de l'abscission, même s'il manque encore à l'heure actuelle le lien fonctionnel entre filament ESCRT-III et constriction membranaire.

Il est important de noter que l'abscission fait intervenir de nombreuses autres protéines et de nombreux mécanismes cellulaires. Il a été montré que la cytokinèse s'accompagne d'un intense trafic vésiculaire. Ces vésicules, provenant d'endosomes de recyclage, auraient pour double fonction présumée, de délivrer des protéines d'intérêt, mais également de favoriser le remodelage membranaire au niveau des sites de fission (Neto et al., 2011). Ce modèle « vésiculaire » est actuellement un peu en perte de vitesse, mais comme nous l'avons vu plus

haut, la formation de vésicules provenant d'endosomes de recyclage pourrait également être dépendante de la machinerie ESCRT. Le rôle d'ESCRT dans la cytokinèse pourrait donc être double. L'étude du rôle des ESCRT dans la cytokinèse est maintenant un champ de recherche très actif, qui devrait permettre d'éclaircir rapidement leur(s) rôle(s) exact(s) dans l'abscission.

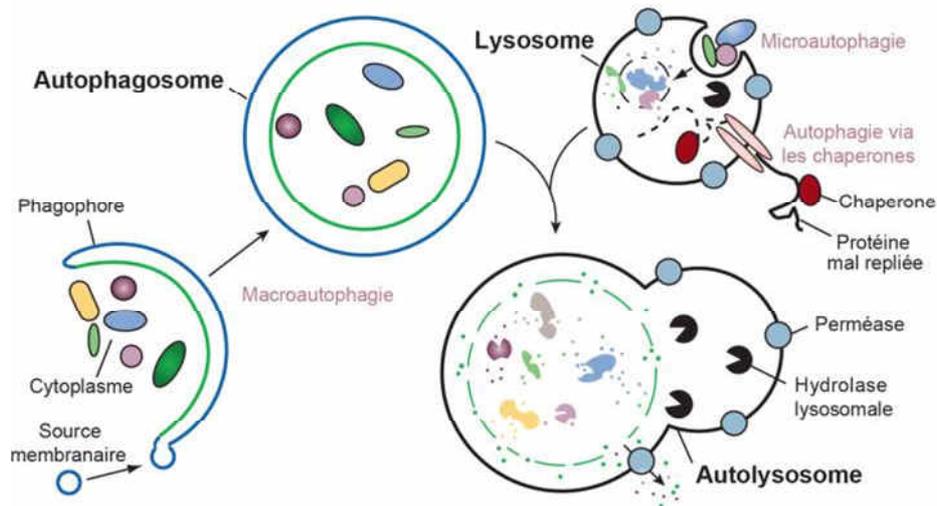
### **Autres processus cellulaires impliquant la machinerie ESCRT**

Le complexe ESCRT, ou plutôt devrait-on dire les complexes ESCRT, tant la divergence d'assemblage semble importante, ont été montrés comme impliqués dans de nombreux autres processus cellulaires. Certains de ces processus semblent bien éloignés du remodelage membranaire, ce qui suggère que la machinerie ESCRT pourrait avoir un rôle en dehors de l'établissement de courbures membranaires

Nous venons de voir que les ESCRT sont requis pour l'achèvement de la cytokinèse, l'étape finale de la division. Une étude intéressante a également montré que les composants d'ESCRT-III, ainsi que Vps4 étaient impliqués beaucoup plus tôt durant la mitose, dans des phénomènes de **remodelage des centrosomes et du fuseau mitotique** (Morita et al., 2010). La déplétion de Vps4B entraîne par exemple une multiplication aberrante du nombre de centrosomes, qui constituent le centre organisateur des microtubules, et joue un rôle fondamental dans la répartition du matériel génétique en mitose. Il s'agit d'une étude de plus qui met en relation ESCRT avec les microtubules, bien que les mécanismes soient encore flous à l'heure actuelle. Nous pouvons imaginer que les ESCRT jouent un rôle global dans la division cellulaire, régulant à la fois le remodelage de la chromatine et le remodelage membranaire.

L'**autophagie** est un processus cellulaire qui permet la dégradation du contenu cytoplasmique (cytosol, protéines et organites). Elle regroupe plusieurs types d'autophagie (macroautophagie, microautophagie, autophagie par les chaperons...), mais l'appellation autophagie fait généralement référence à la macroautophagie. L'autophagie est un moyen d'éliminer des protéines mal repliées ou des organites endommagés, mais aussi de recycler des constituants cellulaires, en conditions de stress, par exemple. Elle passe par la formation d'une vacuole (phagophore) à double membrane qui englobe le matériel à dégrader, et qui peut aboutir à un autophagosome, via des phénomènes de fusion et fission membranaire (Mizushima et al., 2008). L'autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome et prend le nom d'autolysosome (Figure 29). La perturbation de la machinerie ESCRT entraîne une accumulation d'autophagosomes. C'est le cas avec la déplétion des quatre sous-complexes, ainsi que de Vps4 (Filimonenko et al., 2007; Rusten et al., 2007; Tamai et al., 2007). Quatre hypothèses ont été avancées pour expliquer l'implication des ESCRT dans le processus autophagique (Rusten and Stenmark, 2009) : (1) La déplétion en ESCRT entrainerait un stress cellulaire qui stimulerait l'autophagie. (2) La fermeture du phagophore est un mécanisme de fission membranaire qui ressemble topologiquement à la formation des vésicules intraluminales des EMV. (3) Les ESCRT pourraient intervenir dans la fusion des

autophagosomes avec les lysosomes (Urwin et al., 2010), ainsi que, (4) la formation des lysosomes eux-mêmes, deux hypothèses possibles, bien que moins faciles à appréhender sur le plan topologique. Nous verrons par la suite que ce rôle de la machinerie ESCRT est suivi avec beaucoup d'intérêt, à cause de l'implication des dérégulations de l'autophagie dans de nombreuses pathologies, notamment les maladies neurodégénératives.



**Figure 29. L'autophagie est responsable de la dégradation du contenu cytoplasmique via les lysosomes**

Il existe plusieurs types d'autophagie qui passent toutes par une étape de fusion avec le lysosome qui permet la dégradation de leur contenu. La macroautophagie est la forme la plus courante. Elle débute par la formation d'une vacuole à double membrane qui englobe les éléments du cytoplasme et va finir par donner un autophagosome en se refermant sur elle-même. Adapté de (Mizushima et al., 2008)

Les cellules peuvent produire et relarguer différents types de **microvésicules** dans le milieu extracellulaire. Ces microvésicules ont une fonction présumée dans la communication intercellulaire. De manière assez logique, la machinerie ESCRT est impliquée dans la production des exosomes qui sont des vésicules formées par la fusion de certains EMV avec la membrane plasmique. Les exosomes sont donc en réalité des vésicules intraluminales libérées dans le milieu extracellulaire. De manière surprenante au niveau topologique, certaines sous-unités ESCRT sont associées aux vésicules (Mathivanan and Simpson, 2009). Alix est même le marqueur de référence des exosomes, alors que le rôle exact de cette protéine dans leur formation n'est pas encore connu (Baietti et al., 2012). Les ESCRT semblent aussi impliqués dans le bourgeonnement de vésicules directement à partir de la membrane plasmique. La protéine ARRDC1 utilise un motif PSAP pour recruter Tsg101 (ESCRT-I) à la membrane plasmique (Nabhan et al., 2012). Même s'il n'existe pas d'évidence à l'heure actuelle, ceci suggère que le reste de la machinerie ESCRT est recrutée en aval et participe au processus de fission à la membrane plasmique.

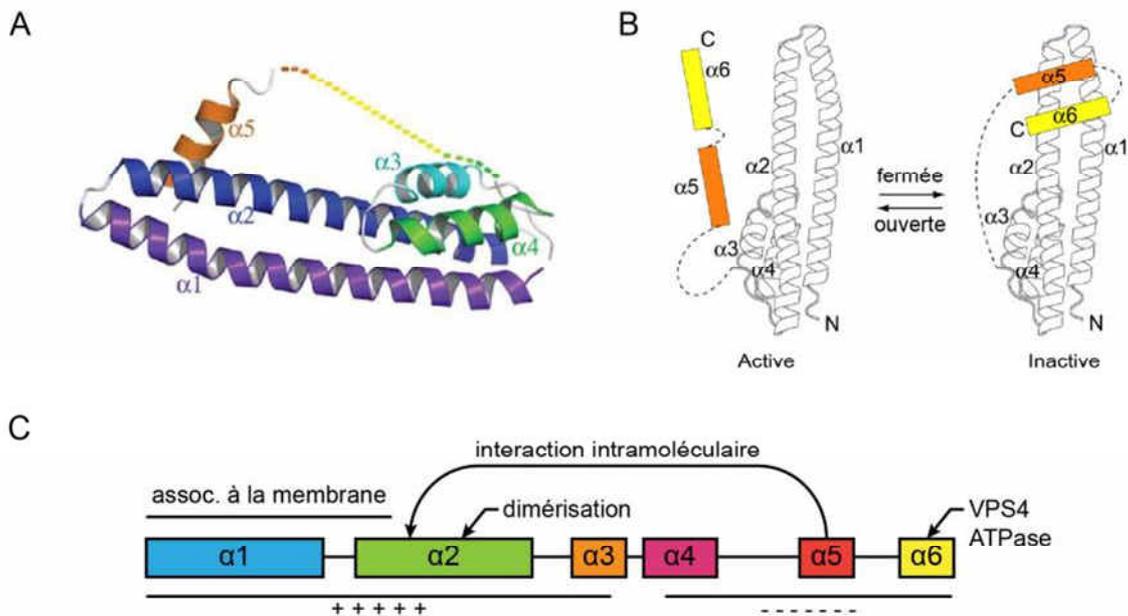
## 2.4. ESCRT-III : le catalyseur de la courbure membranaire

Nous avons pu nous apercevoir que, chez les mammifères, la machinerie ESCRT est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, la plupart concernant directement un remodelage des membranes plasmique et endosomale (Figure 27). Ces différents mécanismes montrent une divergence par rapport à la machinerie ESCRT « canonique » que nous avons présentée plus haut. Nous pouvons maintenant parler « des » complexes ESCRT. En effet les différents sous-complexes semblent pouvoir être utilisés de manière alternative, selon les processus cellulaires. Nous pouvons également imaginer que les cellules de mammifères puissent tirer profit de la présence d'isoformes pour réguler finement l'assemblage des complexes.

Le seul sous-complexe requis pour tous les processus cellulaires décrits est le complexe ESCRT-III. Il est paradoxalement le moins connu des sous-complexes ESCRT, alors qu'il est maintenant le plus étudié. Ses propriétés d'assemblage à la surface membranaire, son indépendance vis-à-vis des cargos ubiquitinylés, ainsi que le fait qu'il soit recruté en dernier, ont très vite laissé penser qu'ESCRT-III était l'assemblage moléculaire idéal pour déformer les membranes. Nous allons nous intéresser aux capacités de déformation membranaire d'ESCRT-III et à la manière dont les sous-unités qui le composent s'assemblent pour réaliser cette fonction.

### 2.4.1. Structure des protéines ESCRT-III

Contrairement aux autres ESCRT, qui se préassemblent dans le cytosol, pour former des complexes stables, ESCRT-III s'assemble à la surface membranaire, et vraisemblablement de manière très transitoire (Babst et al., 2002b). Les sous-unités ESCRT-III sont au nombre de 8 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et de 12 chez l'homme, qui possède plusieurs isoformes pour un certain nombre d'homologues (Tableau 3). Les protéines ESCRT-III ont une nomenclature spécifique chez les mammifères, à l'exception de IST-1, elles prennent le nom de CHMP (charged multivesicular body proteins ou alternativement chromatin modifying proteins). Les sous-unités ESCRT-III sont extrêmement conservées entre espèces et sont les plus conservées parmi la grande famille ESCRT. La protéine CHMP4B humaine présente, par exemple, 60% d'identité de séquence avec son homologue chez la drosophile, appelé Shrub et 99% avec la protéine CHMP4B de souris. Certains homologues ont même été identifiés chez des espèces d'archéobactéries, où ils sont impliqués dans la division cellulaire (Lindas et al., 2008; Samson et al., 2008). Cette conservation des protéines au cours de l'évolution suggère que le ou les rôle(s) joué(s) par ESCRT-III sont fondamentaux pour le fonctionnement cellulaire en général.



**Figure 30. Les sous-unités du complexe ESCRT-III présentent toutes la même structure secondaire**

(A) Structure de CHMP3 (8-183). Les sous-unités ESCRT-III présentent toutes la même structure secondaire avec 2 hélices repliées en épingle à cheveux associées à deux autres pour former le cœur de la protéine. Un linker flexible relie les hélices  $\alpha5$  et  $\alpha6$  au cœur de la protéine ( $\alpha6$  n'est pas visible sur cette représentation) Adapté de (Bajorek et al., 2009).

(B) Modèle du cycle fonctionnel des protéines ESCRT-III. La conformation fermée est inactive. Elle résulte d'une interaction intermoléculaire qui fait intervenir principalement les hélices  $\alpha2$  et  $\alpha5$ . L'ouverture de la protéine libère les interfaces de dimérisation et d'interaction avec la membrane. Adapté de (Xiao et al., 2009).

(C) Hélices et interfaces d'interaction des sous-unités ESCRT-III. La partie N-ter est majoritairement basique alors que la partie C-ter est majoritairement acide.

Les sous-unités ESCRT-III sont des petites protéines de 25 kDa environ (exception faite de CHMP7). Au sein de chaque espèce, elles présentent des différences importantes au niveau de leur séquence primaire en acides aminés (seulement 24 % d'identité entre CHMP4B et CHMP2B chez l'homme, par exemple). En revanche, l'organisation globale des protéines semble conservée. Elles sont caractérisées par une partie N-terminale basique (chargée positivement) et une partie C-terminale plutôt acide (chargée négativement) (Figure 30C). Les structures cristallographiques de CHMP3 et Ist1 ont pu être décrites (Figure 30A et B) (Bajorek et al., 2009; Muziol et al., 2006; Xiao et al., 2009). Ces deux protéines ont une structure secondaire similaire et les prédictions de structures pour les autres sous-unités suggèrent un repliement identique pour la plupart des composants d'ESCRT-III. La structure secondaire est formée de six hélices. Le « cœur » de protéine est constitué des hélices  $\alpha1$  à  $\alpha4$  (environ 150 acides aminés sur 220 au total). Les hélices  $\alpha1$  et  $\alpha2$  forment une structure en épingle à cheveux sur laquelle viennent se replier les hélices  $\alpha3$  et  $\alpha4$ . Enfin, un linker flexible relie l'hélice  $\alpha4$  avec les hélices  $\alpha5$  et  $\alpha6$ . La « taille » de ces protéines est de 7 nm environ et correspond à la longueur de l'épingle formée par  $\alpha1$  et  $\alpha2$ .

Les sous-unités ESCRT-III présentent deux conformations, une conformation dite « ouverte » et une conformation dite « fermée » (Figure 30B). Dans la conformation fermée, la partie C-

terminale vient se replier sur le cœur de la protéine. Il semblerait que cette interaction intramoléculaire fasse intervenir principalement les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 2$  (Figure 30C) (Bajorek et al., 2009; Henne et al., 2012). La conformation fermée est considérée comme inactive. Elle correspond aux protéines sous forme monomérique, qui restent solubles dans le cytosol. L'expression de mutants tronqués dans la partie C-terminale entraîne une accumulation non spécifique des protéines ESCRT-III sur la membrane plasmique (Lin et al., 2005b; Shim et al., 2007). Ces formes tronquées sont également des inhibiteurs puissants du bourgeonnement des virus (Zamborlini et al., 2006). Ces observations ont conduit à un modèle d'activation des sous-unités, dans lequel la partie C-terminale exerce une action auto-inhibitrice en se repliant sur le cœur de la protéine.

Les protéines CHMP s'associent aux membranes via des interactions électrostatiques entre les acides aminés basiques des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et les phospholipides acides de la membrane. Seule CHMP6 est modifiée par myristoylation pour faciliter son adressage à la membrane (Yorikawa et al., 2005). On pense que les sous-unités s'oligomérisent de manière transitoire à la surface des membranes (Babst et al., 2002b). Chaque CHMP semble être capable de s'associer avec lui-même ou alternativement avec d'autres sous-unités (Tsang et al., 2006). En revanche les régions exactes impliquées dans la dimérisation font encore débat. De nombreux mutants de dimérisation ont été identifiés et indiquent qu'elle fait principalement intervenir des interactions  $\alpha 2$ - $\alpha 2$ , avec la contribution probable des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 5$  (Muziol et al., 2006). L'ouverture des protéines CHMP rendrait ces interfaces disponibles et permettrait à la fois l'association à la membrane et la polymérisation. Les signaux qui permettent d'activer les sous-unités ne sont pas connus. Est-ce l'association à la membrane qui permet de déplacer la queue C-terminale ou est-ce l'interaction avec un activateur protéique ? Il est encore difficile de dire quel évènement se produit en premier, mais une étude récente a montré, avec un mutant ponctuel, que le déplacement de l'hélice  $\alpha 5$  de Snf7 était suffisant pour entraîner son association avec la membrane et son oligomérisation (Henne et al., 2012). Ce résultat suggère que l'activation des sous-unités se produit préalablement à l'association aux membranes. Comme nous l'avons détaillé plus haut, dans le contexte de la formation des EMV, le meilleur candidat pour activer les protéines ESCRT-III est Vps25, protéine du complexe ESCRT-II qui est capable d'interagir avec Vps20 (CHMP6) (Saksena et al., 2009). Dans le contexte physiologique, nous pouvons imaginer un scénario en deux étapes. Tout d'abord l'homo ou hétéro-dimérisation des sous-unités dans le cytosol entraînerait leur activation (ouverture des protéines par compétition entre l'interaction intermoléculaire et l'interaction intramoléculaire). Le dimère « activé » aurait la capacité de se fixer aux membranes, qui constitueraient un substrat nécessaire à une oligomérisation à plus grande échelle.

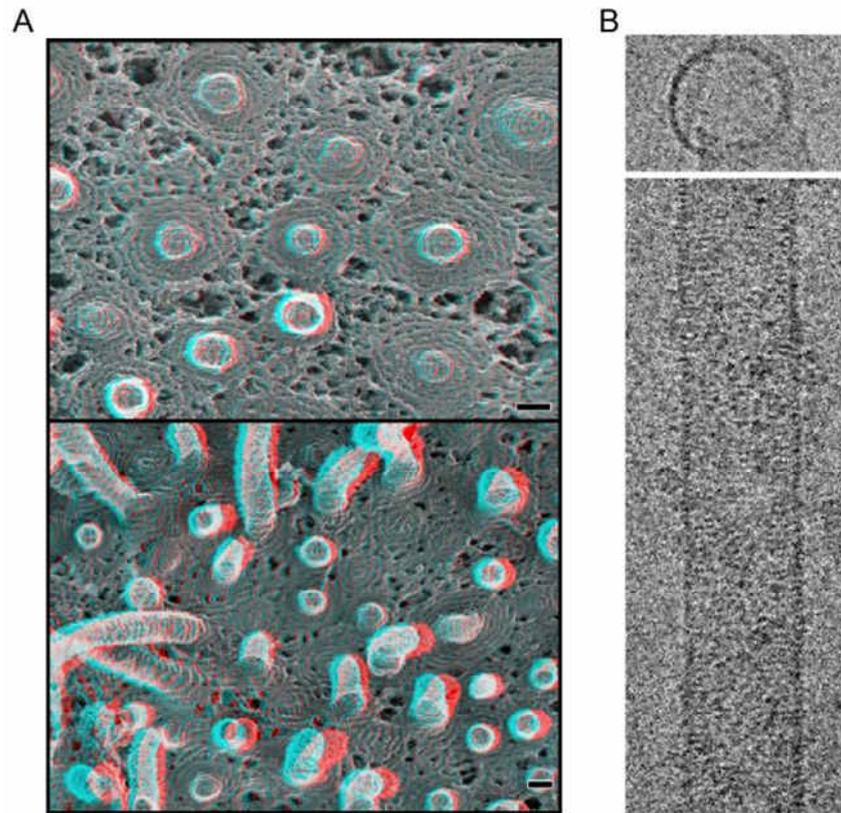
Peu d'interacteurs et d'effecteurs des CHMPs (en dehors des protéines de la famille ESCRT) sont connus à ce jour. Les sous-unités possèdent un domaine très conservé appelé MIM (MIT interacting motif) situé au niveau de l'hélice  $\alpha 6$ . Ce domaine permet de recruter des protéines à domaines MIT comme l'ATPase Vps4, la Spastine, protéine de coupure des microtubules ou AMSH et UBPY, des déubiquitinasés (Stuchell-Brereton et al., 2007; Tsang et al., 2006; Yang et al., 2008). CHMP4 interagit avec la protéine Alix et la protéine CC2D1A. Alix

pourrait être responsable du recrutement du complexe ESCRT-III aux sites de bourgeonnement viral (Fisher et al., 2007). CC2D1A agirait au contraire comme un inhibiteur d'ESCRT-III capable de séquestrer CHMP4 dans le cytosol (Martinelli et al., 2012; Usami et al., 2012).

#### *2.4.2. Les filaments ESCRT-III déforment les membranes*

Les premiers indices de la capacité des sous-unités ESCRT à s'assembler sur la surface membranaire proviennent de travaux réalisés dans des levures déficientes en Vps4 et dans des cellules de mammifères exprimant un dominant négatif de cette protéine (Babst et al., 2002b; Lin et al., 2005b). En l'absence de Vps4, les sous-unités ESCRT-III s'accumulent massivement à la membrane (des endosomes principalement) dans de grosses structures protéiques, insolubles dans des détergents non-ioniques. Ces résultats indiquent que ces protéines forment des structures polymériques à la surface membranaire et que Vps4 est capable de les dépolymériser, via son activité ATPasique.

Le lien direct entre ESCRT-III et courbure membranaire est apparu après la mise en évidence que certaines sous-unités sont capables de se polymériser et de déformer les membranes. Lorsqu'elles sont surexprimées, les sous-unités CHMP4A et CHMP4B (homologues de Snf7) forment des amas protéiques au niveau des membranes intracellulaires et de la membrane plasmique (Lin et al., 2005b; Shim et al., 2007). L'utilisation d'une technique particulière de microscopie électronique (quick-freeze deep-etch electron microscopy : DEEM) a permis d'observer la structure de ces assemblages protéiques à haute résolution, au niveau de la membrane plasmique. Les sous-unités de CHMP4 surexprimées forment des filaments de 5 nm qui s'assemblent de manière circulaire, à la surface membranaire (visibles sur la **Figure 31A**). Dans les cellules qui coexpriment CHMP4 et un dominant négatif de Vps4B (Vps4B E235Q, incapable d'hydrolyser l'ATP), l'organisation des filaments change et des projections membranaires se forment à partir des plateformes de CHMP4. Ce sont de véritables tubes qui déforment la membrane plasmique (**Figure 31A**) (Hanson et al., 2008). Malgré le caractère artefactuel des structures observées dans cette étude, il semblerait que la polymérisation en filaments circulaires représente une caractéristique physiologique du complexe ESCRT-III et de la sous-unité Snf7 (CHMP4) en particulier (Elia et al., 2011; Henne et al., 2012).

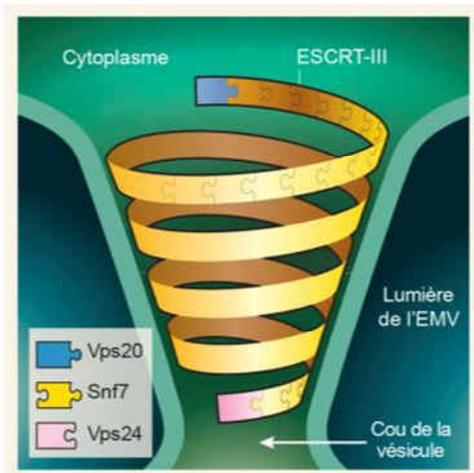


**Figure 31. Les protéines CHMP se polymérisent sous forme de filaments circulaires *in vitro* et *in vivo***

(A) Cellules COS-7 transfectées avec CHMP4B et Vps4B dominant-négatif (E235Q) et observées en microscopie électronique DEEM. CHMP4B forme des filaments circulaires justes sous la surface de la membrane plasmique (visibles en haut). Des tubes partent du centre de ces filaments et déforment la membrane plasmique. Les protrusions font plusieurs  $\mu\text{m}$  de longueur et environ 100 nm de diamètre. Barres d'échelle : 100 nm. Adapté de (Hanson et al., 2008)

(B) Copolymères formés par les protéines CHMP3 $\Delta\text{C}$  et CHMP2A $\Delta\text{C}$  recombinantes observés en cryo-microscopie électronique. Le filament prend la forme d'un tube hélicoïdal creux de 50 nm de diamètre environ. Chaque strie représente un tour d'hélice (pas de l'hélice 32 Å). Barre d'échelle 100 nm. Adapté de (Lata et al., 2008).

L'analyse de polymères formés *in vitro*, par des protéines recombinantes, a permis de caractériser l'organisation tridimensionnelle des filaments ESCRT-III. Les protéines CHMP2A (Vps2) et CHMP3 (Vps24) autoactivées s'assemblent pour former de long tubes creux de 50 nm de diamètre environ (Bajorek et al., 2009; Lata et al., 2008). L'observation de ces tubes en cryo-microscopie électronique a permis de révéler des striations perpendiculaires à l'axe longitudinal du tube. Ces stries représentent une organisation hélicoïdale des filaments de CHMP2A et CHMP3 (Figure 31B). Les tubes nous renseignent sur la manière dont les sous-unités s'organisent au sein des filaments ESCRT-III. Les protéines exposent leurs domaines de fixation aux membranes vers l'extérieur et les domaines MIM, qui permettent le recrutement de Vps4, vers l'intérieur. Les filaments sont capables de recruter des membranes lipidiques via leur surface externe. L'analyse à haute résolution et leur reconstruction en 3D révèle que chaque hélice est construite par un enchainement d'unités de base composées de dimères tête-queue de CHMP2A et CHMP3 (Effantin et al., 2013).

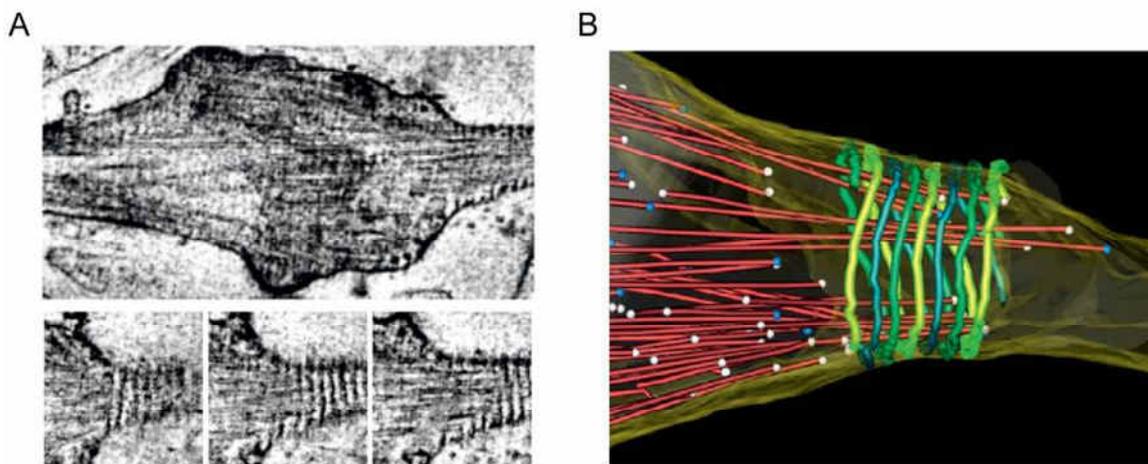


**Figure 32. Les filaments ESCRT-III ont les caractéristiques idéales pour catalyser les mécanismes de fission membranaire**

Représentation schématique d'un filament polymérique constitué de sous-unité ESCRT-III, au niveau de la zone de scission d'une vésicule intraluminaire.

Adapté de (Barelli and Antony, 2009).

A l'heure actuelle, les filaments ESCRT-III endogènes n'ont pas pu être reliés, avec certitude, à des phénomènes physiologiques dépendants des ESCRT. Cependant, de nombreux indices suggèrent que ces filaments existent et sont compatibles avec des phénomènes de déformation et de fission de fins sous membranaires (Figure 32). Des structures ressemblant à des filaments ont été observés au niveau du cou des bourgeons viraux, bloqués à la surface membranaire par l'expression d'un dominant négatif de Vps4 (von Schwedler et al., 2003). Cet assemblage est probablement relativement transitoire et il n'a pas été possible de purifier biochimiquement un complexe ESCRT ou d'analyser ces structures à plus haute résolution, en microscopie électronique.

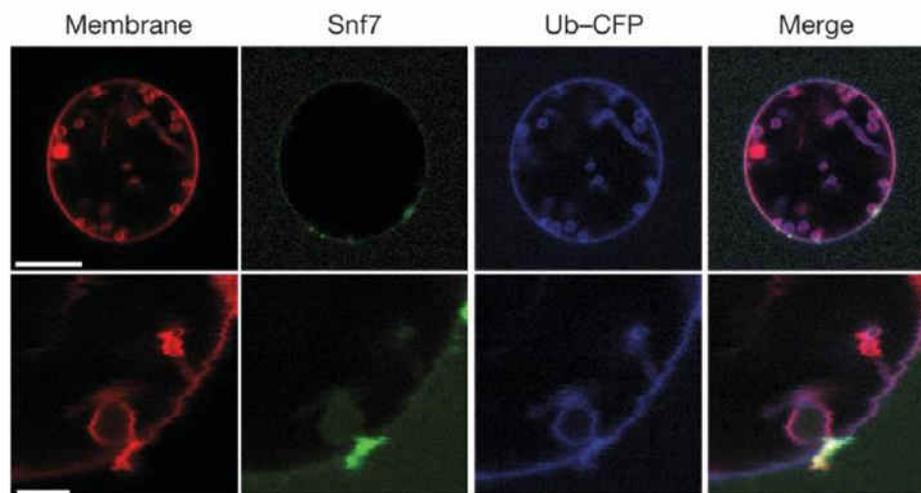


**Figure 33. Des filaments hélicoïdaux se forment au niveau des zones de fission lors de la cytokinèse**

(A) Observation en cryo-microscopie électronique de la zone de fission au niveau du pont intercellulaire qui relie les deux cellules filles en fin de cytokinèse. L'analyse tomographique (en bas) révèle la présence de filaments circulaires de 17 nm d'épaisseur associés à la membrane plasmique et ressemblant aux filaments hélicoïdaux d'ESCRT-III.

(B) Reconstruction tridimensionnelle à partir d'images semblables à (A). En rouge, les microtubules polaires, en vert-jaune les filaments supposés d'ESCRT-III. Adapté de (Guizetti et al., 2011).

La preuve la plus marquante de l'existence physiologique de filaments ESCRT-III provient de travaux concernant la cytokinèse, dans des cellules eucaryotes. Il a été montré que les protéines ESCRT-III sont massivement recrutées au niveau des deux sites où se produit l'abscission membranaire. Ce recrutement est corrélé au niveau spatio-temporel au moment où se produit la fission membranaire. La microscopie optique super-résolutive a montré que les sous-unités s'organisaient en anneaux de part et d'autre du corps intermédiaire (Elia et al., 2011). La microscopie électronique et l'analyse tomographique ont mis en évidence des filaments hélicoïdaux au niveau de la zone de constriction (Guizetti and Gerlich, 2012; Guizetti et al., 2011). Ils mesurent 17 nm de large et semblent en lien intime avec la membrane plasmique (Figure 33A et B). La formation de ces filaments est dépendante de CHMP2A. Bien que nous n'en ayons pas la certitude pour le moment, nous pouvons raisonnablement penser qu'ils correspondent à des polymères ESCRT-III et qu'ils sont impliqués dans l'abscission membranaire lors de la cytokinèse.



**Figure 34. Les sous-unités ESCRT-III se concentrent au niveau du cou des vésicules en formation et Snf7 est requis pour la vésiculation**

Vésicules membranaires géantes incubées avec des protéines recombinantes purifiées (ESCRT-0, I, II, Vps20 et Snf7 marqué avec de l'Alexa-488). Snf7 se localise au niveau du cou des bourgeons membranaires formés par ESCRT-I et ESCRT-II. Vps20 recrute Snf7 à la membrane et la polymérisation ce dernier est requise pour induire la fission et la libération des vésicules internes. Adapté de (Wollert and Hurley, 2010).

Des expériences réalisées *in vitro*, sur des vésicules membranaires géantes (GUV : giant unilamellar vesicles) ont permis d'étudier le complexe ESCRT-III en tant que catalyseur de la déformation membranaire. Le phénomène d'assemblage des ESCRT est probablement très labile et la taille des vésicules intraluminales (50 nm de diamètre) trop petite pour observer des phénomènes de vésiculation sur des EMV. Les GUV ont permis de voir que le complexe ESCRT-III conduisait à la formation de vésicules à l'intérieur des GUV (Figure 34) (Wollert et al., 2009). La taille des vésicules internes des GUV (plusieurs centaines de nm) n'a évidemment rien à voir avec celle des vésicules intraluminales des EMV, mais il s'agit de la première preuve que le complexe ESCRT, par son assemblage aux membranes catalyse directement des phénomènes de déformation membranaire. Des études ultérieures ont permis

de montrer que les sous-unités se concentraient au niveau du cou des vésicules en formation, ce qui va dans le sens d'une machinerie de fission qui s'assemble de manière spécifique et transitoire à la membrane (Figure 34) (Wollert and Hurley, 2010).

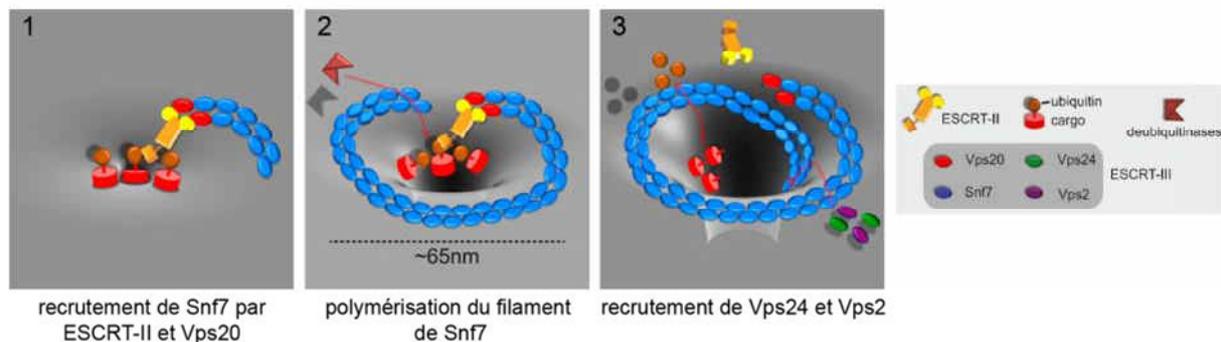
Comme nous avons pu le voir, bien que les capacités de déformation et de fission membranaires des filaments protéiques formés par le complexe ESCRT-III soient une évidence, il manque encore la démonstration de l'existence d'un tel phénomène *in vivo*.

### 2.4.3. Modèles d'assemblage du complexe ESCRT-III

Toutes les sous-unités ne sont pas impliquées de la même manière dans la déformation des membranes. La majorité des travaux concernent 4 sous-unités, considérées comme formant le « cœur » du complexe ESCRT-III. Elles correspondent aux protéines absolument nécessaires pour la formation des EMV, chez la levure. Il s'agit des protéines Vps20, Snf7, Vps24 et Vps2 (respectivement CHMP6, CHMP4, CHMP3 et CHMP2, chez les mammifères). L'assemblage des sous-unités sur les endosomes est séquentiel et l'ordre de recrutement a pu être déterminé. Vps20-Snf7 et Vps24-Vps2 forment deux sous-complexes distincts (Babst et al., 2002b). Vps20 entraîne le recrutement de Snf7 (CHMP4), puis arrivent Vps24 (CHMP3) et Vps2 (CHMP2). L'interaction entre Vps20 (CHMP6) et la sous unité Vps25 de ESCRT-II entraîne un changement conformationnel de Vps20 (Teis et al., 2010). Vps20 recrute et stabilise Snf7 au niveau de la membrane endosomale (Saksena et al., 2009). Elle agit comme un nucléateur de Snf7, qui est capable de s'oligomériser sous forme de filament, à la surface membranaire. La sous-unité Snf7 est considérée comme le composant central du complexe ESCRT-III. Elle est largement majoritaire au niveau stœchiométrique (Teis et al., 2008). La double fonction du sous-complexe Vps24-Vps2 est de stopper la polymérisation de Snf7 et de recruter l'ATPase Vps4, via leur domaine MIM (Figure 35). Grâce à l'hydrolyse d'ATP, Vps4 dépolymérise le complexe ESCRT-III membranaire et permet le recyclage des sous-unités dans le cytosol. La taille du complexe ESCRT-III « cœur » responsable de la scission des vésicules intraluminales a été estimé à 450 kDa, ce qui impliquerait environ 20 sous-unités dont 10-15 de Snf7 (Teis et al., 2008).

Des expériences *in vitro*, ont permis de confirmer ces résultats et de faire le lien entre l'assemblage séquentiel du complexe et la formation de vésicules internes. Les travaux sur les vésicules membranaires géantes (GUV) ont montré que seul un complexe comprenant Vps20, Snf7 et Vps24 était requis pour la vésiculation et pas Vps2 ni Vps4 (Wollert and Hurley, 2010; Wollert et al., 2009). Vps2 étant nécessaire pour le recrutement de Vps4 et donc le recyclage des sous-unités. Le recyclage augmenterait simplement l'efficacité de la machinerie. Il faut noter cependant que le rôle exact de Vps4 et de la libération d'énergie qu'elle catalyse dans la scission de la membrane est elle-même discuté. Les GUV ont aussi apporté des réponses quant au rôle des facteurs situés en amont d'ESCRT-III. ESCRT-I et ESCRT-II auraient aussi un rôle dans la déformation membranaire en formant un bourgeon capable de recruter ESCRT-III au niveau du cou (Figure 34). Le rôle d'ESCRT-III pourrait donc se limiter à la fission membranaire lorsqu'il est recruté par ESCRT-II (Wollert and

Hurley, 2010). Ces données ont été complétées récemment avec un travail sur des monocouches membranaires (Henne et al., 2012). Snf7 serait l'élément central au niveau stoechiométrique et mécanistique, mais sa capacité à déformer les membranes serait dépendante de son association avec le sous-complexe Vps24-Vps2. Snf7 forme des oligomères circulaires en 2D à la surface des membranes. Le rôle de Vps24-Vps2 ne serait pas uniquement l'arrêt de la polymérisation de Snf7, mais aussi son changement de conformation pour passer à une hélice en 3D capable d'induire une vésiculation.



**Figure 35. Modèle d'assemblage du filament ESCRT-III dans le contexte de la formation des vésicules intraluminales chez la levure**

Les complexes ESCRT sont recrutés séquentiellement sur la membrane endosomale. ESCRT-II via deux sous-unités de Vps25 recrute Vps20 et qui entraîne la nucléation de l'oligomérisation de Snf7. Vps24 et Vps2 stoppent la polymérisation de Snf7, favorisent un changement conformationnel du polymère et recrutent l'ATPase Vps4 responsable de la dépolymérisation du complexe ESCRT-III. Adapté de (Henne et al., 2012).

Les dernières données expérimentales suggèrent que les filaments ESCRT-III agissent par paires, ou forment une double hélice (Figure 35). En effet, ESCRT-II contient deux sous-unités de Vps25 qui sont donc capables de nucléer deux protofilaments de Snf7 qui peuvent s'assembler latéralement pour former un filament de 9 nm d'épaisseur (Henne et al., 2012).

Le modèle d'assemblage du complexe ESCRT, dans le contexte de la formation des EMV chez la levure, commence à être assez solide. Il est presque exclusivement le fruit du travail d'une seule équipe de recherche (Scott Emr, USA). Faute de caractérisation équivalente dans les autres processus cellulaires, il est souvent considéré comme « le » modèle d'assemblage du complexe ESCRT-III.

Le système est probablement assez différent chez les mammifères. D'une part à cause de la diversité des fonctions dépendantes d'ESCRT-III et donc des diamètres des bourgeons membranaires et des effecteurs extrinsèques impliqués. D'autre part à cause de la présence de multiples isoformes pour certaines sous-unités, qui pourraient donner corps à des complexes ESCRT-III alternatifs en fonction des processus cellulaires. Il a par exemple été montré que CHMP4C agit préférentiellement durant la cytokinèse alors que CHMP4B serait plutôt impliqué dans le bourgeonnement viral (Carlton et al., 2008). Le bourgeonnement des virus et la cytokinèse ne font vraisemblablement pas intervenir ni ESCRT-0, ni ESCRT-II, ni la sous-unité Vps20 (CHMP6) d'ESCRT-III. Le mode de recrutement d'ESCRT-III à la membrane et

la séquence d'évènement qui s'en suit sont donc probablement très différents. Un autre degré de complexité peut-être apporté par la molécule Alix qui est capable d'interagir avec le complexe ESCRT-I (via Tsg101) et ESCRT-III (via CHMP4) et qui est requise pour le bourgeonnement viral et la cytokinèse. Alix est un candidat idéal pour le recrutement du complexe ESCRT-III à la membrane en faisant un pont entre ESCRT-I et ESCRT-III (Figure 26 et Figure 27). Les études chez la levure et *in vitro* font de Vps2 une sous-unité presque accessoire dans la formation des EMV (Wollert et al., 2009). En revanche, CHMP2A et CHMP2B, ses homologues chez les mammifères, ainsi que CHMP4 sont les seules sous-unités absolument requises pour le bourgeonnement des virus (Morita et al., 2011). CHMP2 et CHMP4 forment un sous-complexe alternatif, par interaction directe, sans passer par l'intermédiaire de CHMP3, qui pourrait jouer un rôle particulièrement important dans les phénomènes de déformation membranaire à la membrane plasmique.

Le seul point sur lequel reposent tous les modèles d'assemblage et dans tous les contextes cellulaires, c'est le rôle central joué par Snf7 ou ses homologues chez le mammifère, CHMP4A, CHMP4B et CHMP4C. Il semble évident que cette sous-unité joue un rôle crucial car c'est celle qui a le plus tendance à s'oligomériser et celle dont la déficience cause le plus de défauts fonctionnels.

#### 2.4.4. Modèles de déformation et de fission membranaire par ESCRT-III

Bien que les données expérimentales dont nous disposons pour le moment soient relativement limitées, elles ont pu aboutir à l'établissement de modèles représentant la fission membranaire par le complexe ESCRT-III. Au niveau biophysique, la question est de comprendre comment un polymère d'ESCRT-III peut engendrer des forces capables de rapprocher des bicouches membranaires et de les faire fissionner. Ce travail s'inscrit dans le même cadre que la description très complète qui a pu être faite pour les mécanismes de fission dépendants de la Dynamine (Morlot and Roux, 2013).

Les modèles de fission membranaire par les polymères ESCRT-III sont basés sur l'extrapolation des données sur l'ordre d'assemblage, la stœchiométrie, l'organisation fine des filaments hélicoïdaux, la topologie de la fission et l'estimation des forces requises pour déformer la membrane.

Comme pour les modèles d'assemblage, les modèles de fission sont probablement différents d'un processus cellulaire à l'autre. Trois grands modèles sont retenus à l'heure actuelle. (1) Le premier propose que le filament ESCRT-III rapproche progressivement les membranes les unes des autres (Figure 36). On l'appelle le **modèle du dôme**, pour la forme que prend le filament hélicoïdal au niveau de la zone de fission. Ce type de conformation implique un décalage des interactions protéine-protéine entre chaque tour d'hélice, pour diminuer le diamètre du filament. Ce type de structures a été observé *in vitro*, avec les co-polymères de CHMP2A et CHMP3 (Lata et al., 2008; Peel et al., 2011). L'analyse computationnelle a montré que ce type structure était compatible avec la fission d'un point de vue biophysique

(Fabrikant et al., 2009; Lenz et al., 2009). Plus récemment il a été observé en microscopie électronique, chez l'archéobactérie *Sulfolobus*, des sillons de division en forme de sablier, topologiquement en accord avec la présence de deux dômes symétriques (Dobro et al., 2013). Au niveau des sous-unités, ces structures en dôme seraient donc la conséquence du recrutement des sous-unités les plus en aval, soit CHMP3 (Vps24) et CHMP2 (Vps2). Nous pouvons imaginer deux scénarios, basés sur les données expérimentales actuelles. Soit CHMP3-CHMP2 sont recrutés au niveau des bourgeons formés par le polymère de CHMP4. Soit CHMP3 et CHMP2 sont capables d'induire des changements conformationnels du filament de CHMP4, en s'associant latéralement, ou au milieu du filament (Henne et al., 2012). Le modèle du dôme est intéressant car il peut s'adapter à tous les diamètres de constriction membranaire (25 nm pour les vésicules intraluminales, 50 nm pour les virus et 1 µm pour le pont intercellulaire lors de la cytokinèse). Il est seulement difficile de concevoir comment peuvent se produire les décalages dans les interfaces d'interaction protéine-protéine, au sein du filament. Le rôle potentiel de l'ATPase Vps4, dans le remodelage du filament, restera à déterminer.

(2) Le **modèle de la rupture du filament** est une variante du modèle du dôme, basé principalement sur les données expérimentales concernant l'abscission lors de la cytokinèse. Il a été observé que les anneaux d'ESCRT-III étaient localisés à deux endroits distincts au niveau du pont intercellulaire (Elia et al., 2011, 2012). Des anneaux de grand diamètre à proximité du corps intermédiaire et des anneaux plus petits et plus concentrés, au niveau de la zone de fission. Ce modèle propose que les filaments de grand diamètre formés par ESCRT-III sont instables et peuvent se briser spontanément ou sous l'action d'un effecteur comme Vps4. Les filaments adopteraient ensuite une conformation plus stable (de plus basse énergie), avec un diamètre réduit et conduiraient à la fission en adoptant une conformation en dôme (Figure 36). Une étude récente suggère que la tension membranaire pourrait jouer un rôle dans le recrutement et fonctionnement de la machinerie ESCRT-III (Lafaurie-Janvore et al., 2013). Nous pouvons imaginer que cette tension au niveau du pont intercellulaire puisse jouer un rôle dans la conformation du filament ESCRT-III et sa capacité à déformer les membranes.

(3) Le **modèle de la rosace** provient des analyses de la structure du super-complexe ESCRT-I/ESCRT-II (Boura et al., 2012). Il propose que le cou des vésicules intraluminales des EMV contienne 6 à 10 copies du super-complexe ESCRT-I/ESCRT-II. Chacun serait capable de nucléer un filament ESCRT-III qui partirait en direction du sommet du bourgeon membranaire (Figure 36). Le rôle du complexe Vps4 pourrait être d'organiser le point de rencontre de ces différents filaments grâce à ses multiples sites d'interaction avec les sous-unités ESCRT-III. Ce modèle semble compatible avec les données concernant la formation des EMV, mais il est difficile d'imaginer que de tels filaments puissent se projeter sur des longueurs de 500 nm, dans le cas de la cytokinèse.

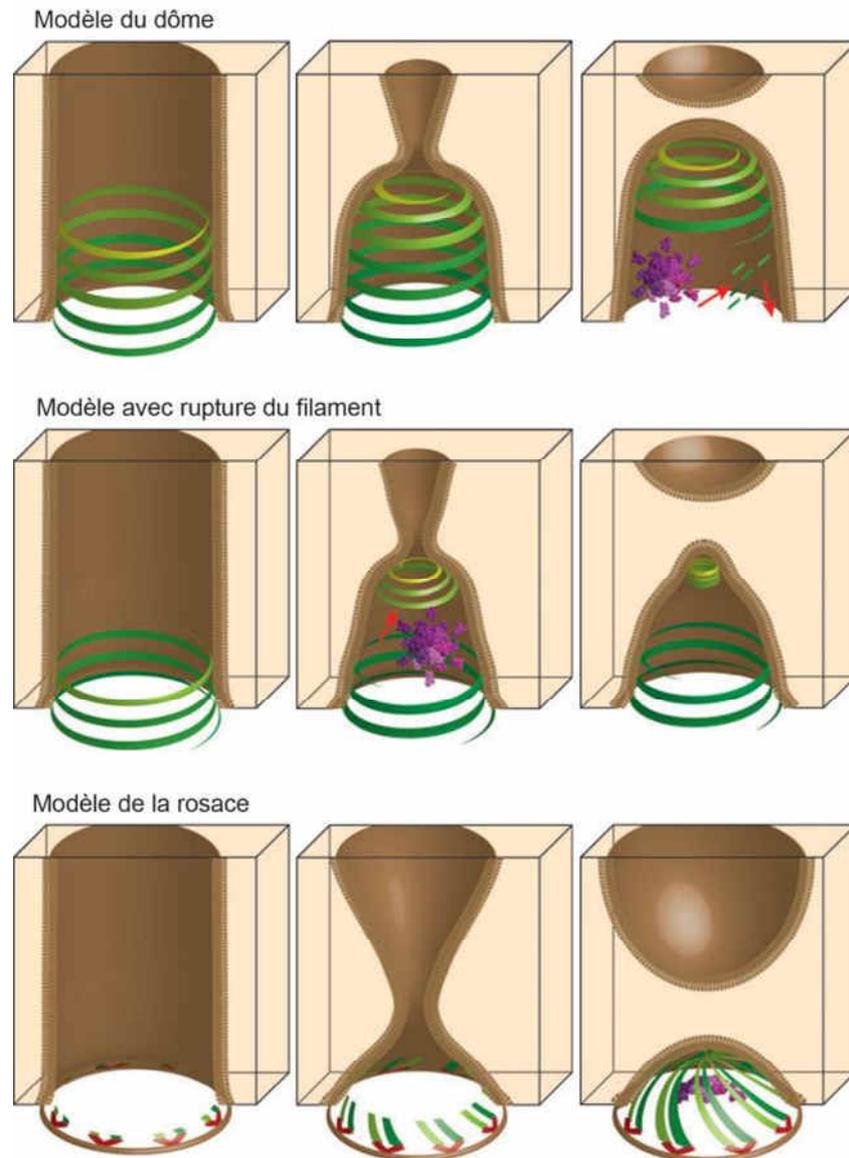


Figure 36. Modèles de déformation et de fission membranaire par les filaments ESCRT-III  
Adapté de (McCullough et al., 2013).

## Conclusion sur les ESCRT

Le rôle de la machinerie ESCRT dans la courbure et la fission membranaire ne fait maintenant plus aucun doute. Les filaments ESCRT-III constituent un véritable cytosquelette membranaire impliqué dans de nombreux processus de déformations membranaires de topologie équivalente. Nous commençons seulement à comprendre comment les sous-unités s'assemblent entre-elles pour former le complexe. Beaucoup de question restent en suspens :

- **D'où provient l'énergie nécessaire à la fission membranaire ?** Il semble clair que l'assemblage des sous-unités ESCRT-III est thermodynamiquement favorable, mais il restera à comprendre quelle est la contribution du complexe formé par Vps4. Cette ATPase assemblée en dodécamère n'est vraisemblablement pas là uniquement pour dépolymériser le complexe et il est possible que l'hydrolyse d'ATP soit une source d'énergie pour le remodelage de la membrane.
- **CHMP4 (Snf7) est-elle l'unique machinerie de fission ?** Dans les modèles actuels CHMP4 est la sous-unité centrale du complexe ESCRT-III, celle qui se polymérise et qui est responsable de la fission. Toutes les sous-unités étant théoriquement capables de s'oligomériser, il est possible que ce constat ne soit pas vrai dans tous les complexes ESCRT-III. De plus, chez le mammifère en particulier, de nombreuses sous-unités ont probablement des rôles accessoires ou alternatifs, qui resteront à déterminer.
- **Comment se produit la constriction membranaire ?** Nous avons vu que nous n'en sommes qu'au stade des modèles d'assemblage. Le manque de données expérimentales et fonctionnelles ne nous permet pas, à l'heure actuelle de privilégier un modèle plus qu'un autre.
- **Quels sont les recruteurs et les effecteurs extrinsèques de la machinerie ESCRT ?** Nous ne savons finalement pas grand-chose des signaux, ou des interactions moléculaires, responsables du recrutement spécifique de cette machinerie, dans tel ou tel processus cellulaire. Le rôle fondamental de la machinerie ESCRT dans la division cellulaire, par exemple, suggère qu'elle est en lien avec des effecteurs et des régulateurs de sa polymérisation. Deux des grands enjeux sont maintenant de déterminer quelles sont ses partenaires extrinsèques et d'étudier la possibilité que ESCRT-III puissent agir en concert avec le cytosquelette d'actine et de microtubules.

### 3. Machinerie ESCRT et maladies neurodégénératives : des mutations de CHMP2B sont responsables de la démence fronto-temporale

#### 3.1. ESCRT et maladies neurodégénératives

Les protéines de la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) sont impliquées directement ou indirectement dans un grand nombre de pathologies (Saksena and Emr, 2009; Stuffers et al., 2009). Nous pouvons citer en premier lieu les cancers. En effet les complexes ESCRT sont impliqués dans la dégradation des récepteurs de surface et jouent donc un rôle évident dans l'atténuation du signal. Un certain nombre de protéines ESCRT, comme Tsg101 sont considérées comme des suppresseurs de tumeur (Li and Cohen, 1996). Les virus piratent la machinerie ESCRT pour bourgeonner à partir de la surface. Elle est donc impliquée de manière indirecte dans l'infection virale, en particulier pour le virus du SIDA. Certaines sous-unités sont aussi reliées à des maladies neurodégénératives (Tableau 4). Il est intéressant de noter que la seule protéine qui peut être considérée comme une cause directe de pathologie neurodégénérative est CHMP2B, un composant du complexe ESCRT-III. Des mutations de CHMP2B (charged multivesicular protein 2B) sont en effet retrouvées chez des patients atteints de démence frontotemporale (Skibinski et al., 2005) et de sclérose latérale amyotrophique (Parkinson et al., 2006). Ce sont deux maladies du système nerveux central et du cerveau en particulier. Nous allons nous intéresser à la démence fronto-temporale causée par les mutations de CHMP2B et aux rôles qu'elle joue dans la physiopathologie de cette maladie. Nous verrons que l'effet des mutants peut nous renseigner sur le rôle physiologique de cette protéine, dans les neurones.

**Tableau 4.** Protéines ESCRT reliées directement ou indirectement à des maladies neurodégénératives

Maladie	Protéine impliquée	Références
Démence frontotemporale	UBAP1	(Rollinson et al., 2009)
	<b>CHMP2B</b>	(Skibinski et al., 2005)
Maladie d'Alzheimer	<b>CHMP2B</b>	(Yamazaki et al., 2010)
Sclérose latérale amyotrophique	<b>CHMP2B</b>	(Parkinson et al., 2006)
Maladie à corps de Lewy	<b>CHMP2B</b>	(Tanikawa et al., 2012)
Maladie de Huntington	CHMP3	(Filimonenko et al., 2007)
Paraplégie spastique familiale	CHMP1B	(Reid et al., 2005)
Maladie de Charcot-Marie-Tooth	Tsg101	(Shirk et al., 2005)
	Hrs	(Lee et al., 2012)
Dégénérescence spongiforme	Tsg101	(Kim et al., 2007)

(Rollinson et al., 2009)(Skibinski et al., 2005)(Parkinson et al., 2006)(Tanikawa et al., 2012) (Kim et al., 2007)(Shirk et al., 2005)(Lee et al., 2012)(Reid et al., 2005)(Yamazaki et al., 2010)(Filimonenko et al., 2007)

## 3.2. CHMP2B et démence frontotemporale (FTD)

### 3.2.1. La démence fronto-temporale

La démence fronto-temporale (FTD : *frontotemporal dementia*) est une maladie neurodégénérative qui touche principalement le lobes frontal et le lobe temporal du cerveau. Elle appartient au grand spectre des démences lobaires fronto-temporales (FTLD), qui inclut également la démence sémantique (SD) et l'aphasie primaire progressive (PNFA) (Sleegers et al., 2010). La FTD est la deuxième démence présénile, en termes de prévalence, juste derrière la maladie d'Alzheimer. Cette maladie est caractérisée par sa précocité. Les premiers symptômes apparaissant en général autour de 55 ans. Les personnes atteintes de FTD présentent des changements comportementaux importants, qui incluent une désinhibition, de l'impulsivité et des comportements rituels. La FTD est donc souvent définie comme le variant « comportemental » de la FTLD.

Une des caractéristiques de la FTLD est son hétérogénéité, tant au niveau des signes cliniques qu'aux niveaux neuropathologique et génétique. Plus de 30% des cas de FTLD ont une cause génétique. Contrairement à la maladie d'Alzheimer, la FTLD ne semble pas non plus suivre un profil physiopathologique commun et défini (la maladie d'Alzheimer est brièvement présentée en *Partie 1.4.2* de ce manuscrit). Les gènes *MAPT* et *GRN* sont mutés chacun dans près de 10% des cas de FTLD (Tableau 5). *MAPT* code la protéine Tau et cause la FTLD-Tau, caractérisée par des agrégats de Tau hyperphosphorylée. *GRN* code la Progranuline et entraîne une FTLD-TDP, caractérisée par des agrégats riches en Ubiquitine et TDP-43. Les mutations du gène *CHMP2B* sont beaucoup plus rares (estimation à 1%, peut-être plus si la protéine est également impliquée dans des formes sporadiques). Elles entraînent une FTLD-UPS, qui est caractérisée par l'absence d'agrégats de Tau ou de TDP-43, mais par des inclusions immunoréactives aux protéines du complexe ubiquitine-protéasome. Nous verrons que la majorité des mutations de *CHMP2B* sont retrouvées dans des formes familiales de FTD. Nous parlons de FTD-3 pour FTD liée au chromosome 3.

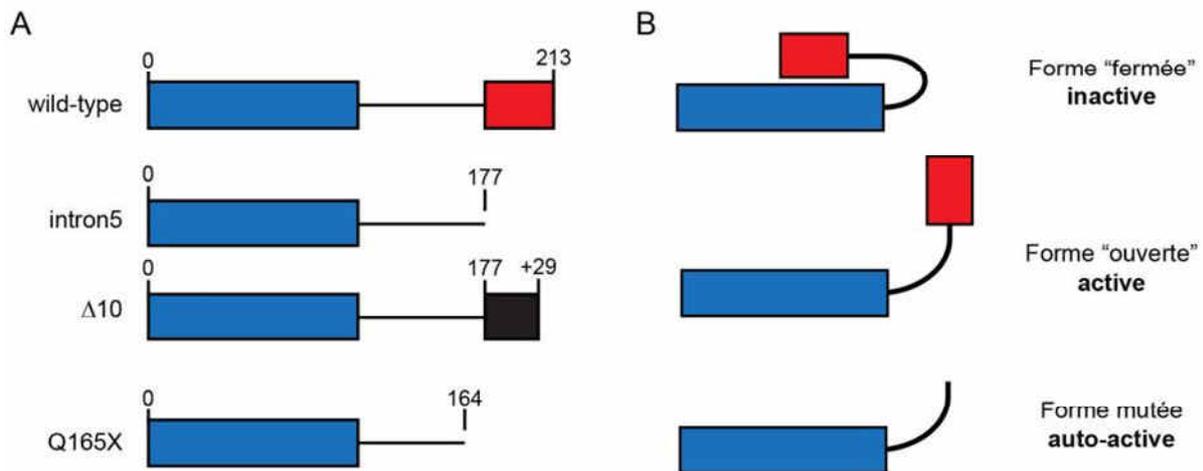
**Tableau 5.** Hétérogénéité génétique de la FTD

Locus	Gène	Fréquence des mutations	Type de mutation	Phénotype	Pathologie	Références
3p11	CHMP2B	< 1%	épissage, non-sens	FTLD	FTLD-UPS	(Skibinski et al. 2005)
9p13	VCP	< 1%	faux-sens, non-sens	IBMPFD	FTLD-TDP	(Watts et al. 2004)
9p	?	?	?	FTLD + MND	FTLD-TDP	(Morita et al. 2006)
17q21	MAPT	5–10%	faux-sens, délétion, silencieuse, épissage	FTLD	FTLD-tau	(Hutton et al. 1998)
17q21	GRN	5–10%	délétion, non-sens, cadre de lecture, faux-sens, épissage	FTLD	FTLD-TDP	(Baker et al. 2006), (Cruts et al. 2006)

Adapté de (Sleegers et al., 2010)

### 3.2.2. Mutations de CHMP2B

La première mutation de CHMP2B a été identifiée comme étant la cause de la FTD-3, une forme autosomique dominante de FTD qui touche plusieurs familles au Danemark (Skibinski et al., 2005). La mutation est une substitution G-C au niveau du site accepteur d'épissage du sixième et dernier exon de CHMP2B. Elle se traduit par un épissage aberrant qui conduit à la production de deux transcrits aberrants, CHMP2B<sup>intron5</sup> et CHMP2B<sup>Δ10</sup>. Les deux transcrits ainsi que la protéine sauvage sont présents dans le cerveau des patients. CHMP2B<sup>intron5</sup> représente ≈35% et CHMP2B<sup>Δ10</sup> ≈10% de la protéine sauvage (Urwin et al., 2010). Les deux protéines qui en résultent ont une partie C-terminale tronquée et aberrante (Figure 37A). Il manque les 36 derniers acides aminés de l'exon 6 à CHMP2B<sup>intron5</sup> et CHMP2B<sup>Δ10</sup> possède un fragment d'intron aberrant de 29 acides aminés à la place de l'exon 6. Une seconde mutation a été identifiée par la suite dans une famille Belge (van der Zee et al., 2008). C'est une mutation non-sens C-T sur le nucléotide 493, qui entraîne la production d'une protéine CHMP2B tronquée en position 164, par insertion d'un codon stop.



**Figure 37. Les mutants de CHMP2B associés à la DFT sont tronqués dans leur partie C-ter**

(A) Une mutation sur un site accepteur d'épissage donne les transcrits aberrants intron5 (à qui il manque un exon) et Δ10 (qui possède un fragment d'intron transcrit de manière aberrante). La mutation non-sens Q165X substitue une glutamine par un codon stop.

(B) Modèle d'activation des protéines CHMP. Une interaction intramoléculaire entre la partie C-ter et le cœur de la protéine inactive. Les mutants étant tronqués dans leur partie C-ter, l'autoinhibition n'est plus possible et les protéines peuvent donc être considérées comme auto-activées.

La structure commune de ces mutations a très vite suggéré que la perte d'une extrémité C-terminale fonctionnelle sur CHMP2B pouvait être la cause de l'apparition de la FTD. En effet, cette région C-terminale joue un rôle fondamental dans le cycle d'activation-inactivation de cette famille de protéines et comporte un domaine MIM, capable de recruter des effecteurs à domaine MIT, comme l'ATPase Vps4 (voir *Partie 2.4.1* pour plus de détails sur la structure des sous-unités ESCRT-III). Sur un plan purement structural, nous pouvons supposer que ces protéines sont constitutivement sous forme « ouverte », c'est à dire auto-activée (Figure 37B). De plus, la perte de l'interaction avec Vps4 peut empêcher la dépolymérisation des complexes membranaires contenant CHMP2B et d'autres protéines du

complexe ESCRT-III. Cette hypothèse est confirmée par le fait que les mutants de CHMP2B ont tendance à s'associer aux membranes (intracellulaires et membrane plasmique) et à former des agrégats d'ESCRT insolubles dans les détergents (van der Zee et al., 2008), au même titre que d'autres protéines ESCRT-III tronquées (Shim et al., 2007).

De nombreuses autres mutations ont été récemment identifiées pour CHMP2B dans le grand spectre regroupant la FTLD et les maladies des motoneurones (qui inclut aussi la sclérose latérale amyotrophique) (van Blitterswijk et al., 2012; Isaacs et al., 2011; Parkinson et al., 2006). Il s'agit de mutations faux-sens pour la plupart, reliées pour certaines à des formes héréditaires des pathologies. Des agrégats de CHMP2B ont été mis en évidence dans des neurones de l'hippocampe de malades d'Alzheimer (Yamazaki et al., 2010). Une étude a également montré récemment que la perte d'un allèle de CHMP2B était associée à une forme familiale précoce de la maladie d'Alzheimer (Hooli et al., 2013). Il semblerait donc que CHMP2B joue un rôle particulièrement important dans le tissu nerveux. Son implication dans plusieurs pathologies suggère également que des perturbations de CHMP2B et du complexe ESCRT-III doivent jouer un rôle important dans le processus neurodégénératif.

### ***3.2.3. Physiopathologie de la DFT causée par les mutations de CHMP2B***

#### **Défauts de trafic endosomal**

La voie endolysosomale joue un rôle particulièrement important dans la physiologie neuronale. Elle régule notamment l'expression en surface des récepteurs aux neurotransmetteurs et des récepteurs aux facteurs de croissance (Hanley, 2010). L'expression des mutants CHMP2B<sup>intron5</sup>, CHMP2B<sup>Δ10</sup> et CHMP2B<sup>Q165X</sup> dans des cellules en culture entraîne l'accumulation d'endosomes tardifs aberrants, immunoréactifs pour le marqueur CD63 (Skibinski et al., 2005; van der Zee et al., 2008). Des fibroblastes ont pu être isolés à partir de patients FTD-3 et mis en culture. Ces cellules reflètent donc bien les trois formes de CHMP2B co-exprimées chez les malades (Urwin et al., 2010). Ces cellules montrent un ralentissement de la dégradation du récepteur à l'EGF, d'une manière similaire à ce qui a été observé pour des déplétions de protéines ESCRT (Bache et al., 2006). Le problème de trafic du récepteur ne viendrait pas d'un défaut dans la formation des vésicules intraluminales des endosomes multivésiculés, mais plutôt d'un défaut de fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes. Les auteurs proposent que l'accumulation des mutants de CHMP2B à la membrane endosomale empêche le recrutement de la petite protéine G, Rab7, nécessaire pour le phénomène de fusion entre endosome et lysosome (Urwin et al., 2010). Plus récemment une souris transgénique pour CHMP2B<sup>intron5</sup> a été développée par la même équipe de recherche. Cette souris semble être un bon modèle d'étude de la FTD-3 puisqu'elle présente des signes précoces de dégénérescence au niveau tissulaire et que son taux s'écroule à partir d'un an et demi, en comparaison avec une souris contrôle, surexprimant la protéine CHMP2B non mutée (Ghazi-Noori et al., 2012).

## Dérèglement de l'autophagie

Des dérèglements de l'autophagie sont associés à de nombreuses maladies neurodégénératives. La maladie d'Alzheimer est par exemple caractérisée par une activation du processus autophagique aux stades précoces de la maladie, et cette activation se poursuit au cours de la maladie (Boland et al., 2008). L'autophagie a pour fonction d'éliminer les protéines mal repliées ou agrégées. Beaucoup imaginent aussi que l'accumulation d'agrégats que nous observons dans un grand nombre de pathologies, et la toxicité qui y est associée, viendraient en partie de défauts d'élimination par les autophagosomes. Dans la FTD, les agrégats sont majoritairement constitués par les protéines Tau, TDP-43, Fus, p62 et d'ubiquitine (Sleegers et al., 2010).

L'expression de CHMP2B<sup>intron5</sup>, dans des neurones corticaux en culture, provoque l'accumulation d'autophagosomes et conduit à une mort neuronale massive en quelques jours (Lee et al., 2007). Cette accumulation d'autophagosomes est supposée toxique. En effet, un blocage de l'autophagie a tendance à diminuer la mort neuronale causée par l'expression des mutants de CHMP2B (Lee and Gao, 2009). Ceci suggère un effet délétère de l'autophagie dans le cas de la dégénérescence causée par CHMP2B. D'autre part, l'expression de CHMP2B<sup>intron5</sup>, tout comme la déplétion en CHMP3, suffit à entraîner l'accumulation de p62 à la surface membranaire (Filimonenko et al., 2007). L'implication du processus autophagique dans la FTD-3 pourrait donc être double. D'une part l'accumulation d'autophagosomes pourrait être vue comme un stress en soi pour les neurones. D'autre part les problèmes de dégradation entraineraient une accumulation d'agrégats toxiques. Pour preuve, la souris transgénique CHMP2B<sup>intron5</sup> présente une accumulation progressive d'inclusions neuronales positives pour p62 et l'ubiquitine (Ghazi-Noori et al., 2012).

L'implication du mutant pathogène se ferait autour d'un effet dominat-négatif sur un processus autophagique. Il n'est pas exclu que les théories endosomales et autophagiques soient distinctes. Nous pouvons imaginer que l'accumulation de CHMP2B à la membrane des autophagosomes puisse empêcher leur fusion avec les lysosomes, au même titre que pour la fusion entre endosomes tardifs et lysosomes (Urwin et al., 2010).

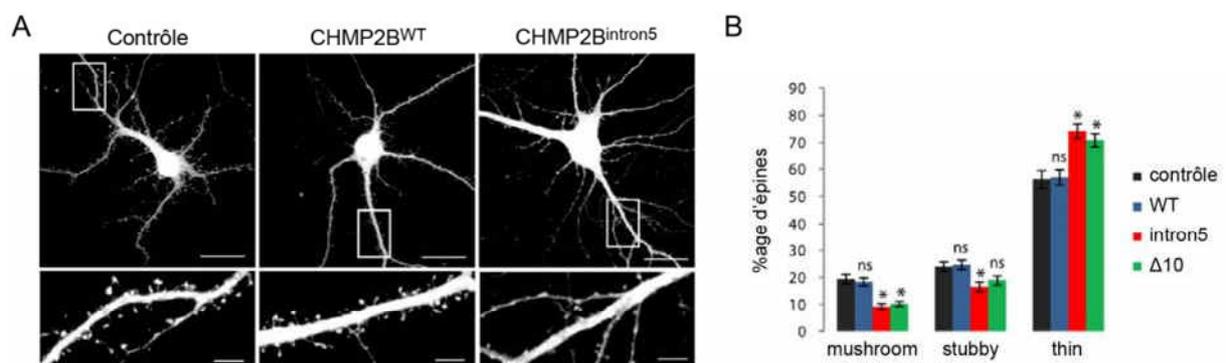
## Problèmes de maturation des épines dendritiques

Nous avons vu, que dans les expériences du laboratoire de Gao, l'expression du mutant CHMP2B<sup>intron5</sup> tue massivement les neurones en seulement trois jours (Lee et al., 2007). Ce genre de toxicité ne reflète pas, semble-t-il, ce qui se passe dans le cerveau des personnes porteuses de la mutation. Il faut aussi noter que ni la déficience en CHMP2B normale, ni l'expression du mutant CHMP2B<sup>Δ10</sup>, n'ont d'effet sur la viabilité neuronale, alors qu'elles ont tendance à perturber le processus autophagique de la même manière que le mutant CHMP2B<sup>intron5</sup>. Ceci qui suggère que la dérégulation de l'autophagie n'est pas le seul mécanisme pouvant expliquer la dégénérescence dans la FTD-3. En effet, cette protéine s'exprime dans toutes les cellules de l'organisme, or des pathologies non cérébrales n'ont pas

été décrites chez les porteurs de la mutation. D'autre part, la perte de tissu neuronal n'apparaît que très progressivement, juste avant l'arrivée des premiers symptômes (Rohrer et al., 2009). Dans le contexte pathologique de la FTD-3, la mort neuronale est probablement un effet tardif, précédé par des perturbations plus fines du fonctionnement neuronal.

Comme nous l'avons détaillé, plus tôt dans ce manuscrit, des altérations du fonctionnement des synapses, et des épines dendritiques en particulier, sont retrouvées dans de nombreuses maladies neurodégénératives, dont la FTD (Ferrer, 1999). Ces altérations fonctionnelles sont associées à des altérations de la morphologie des épines dendritiques (voir *Partie 1.4*).

Des expériences menées au laboratoire, par Agnès Belly, ont cherché à exprimer plus modérément les mutants pathogènes. Dans des neurones d'hippocampe en culture, les mutants CHMP2B<sup>intron5</sup> et CHMP2B<sup>Δ10</sup> empêchent la maturation normale des épines dendritiques, sans avoir d'effet apparent sur la viabilité neuronale (Figure 38A) (Belly et al., 2010). Au cours du développement neuronal, les épines apparaissent progressivement puis le diamètre de la tête a tendance à augmenter. L'expression des mutants pathogènes entraîne une diminution de la proportion d'épines à grosse tête de type champignon, au profit des épines dites fines (Figure 38B). Ces altérations morphologiques ont été corrélées à des altérations fonctionnelles du fonctionnement des synapses, révélée par la diminution de la fréquence et de l'amplitude des mini-courants postsynaptiques excitateurs. De manière intéressante, aucune perturbation morphologique des endosomes ou autophagosomes n'a pu être détecté en parallèle de l'expression des mutants pathogènes.



**Figure 38. Les mutants pathogènes de CHMP2B empêchent la maturation des épines dendritiques**

(A) Neurones d'hippocampe transfectés à 10 DIV avec les constructions indiquées et observés en microscopie confocale, après fixation à 15 DIV. L'architecture des dendrites et des épines dendritiques est reconstituée grâce à la fluorescence de la mCherry.

(B) Les épines ont été comptées et classées en fonction de leur taille et de leur morphologie dans les trois grandes catégories (mushroom, stubby et thin). Adapté de (Belly et al., 2010).

La déplétion en CHMP2B endogène a entraîné un effet similaire aux mutants sur la morphologie des épines dendritiques (Belly et al., 2010). Ce résultat suggère donc à nouveau un effet dominant-négatif des mutants et suggère que la protéine endogène puisse être impliquée dans un processus fonctionnel en lien avec la maturation des épines dendritiques ou la plasticité des synapses.

## 4. But de l'étude

CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B) est une sous-unité du complexe ESCRT-III. Elle est reliée directement ou indirectement à plusieurs pathologies neurodégénératives (démence frontotemporale, sclérose latérale amyotrophique, maladie d'Alzheimer). Ce lien avec les pathologies indique que CHMP2B joue probablement un rôle important dans la physiologie neuronale et que des perturbations de cette fonction peuvent conduire à la mort neuronale.

La mort neuronale dans la FTD, comme dans les autres maladies neurodégénératives, semble être un évènement tardif, précédé par des perturbations fines du fonctionnement des synapses (*Partie 1.4*). Nous avons montré au laboratoire, que l'expression des mutants pathogènes de CHMP2B associés à la FTD-3, ou la déplétion de la protéine endogène, entraînaient des perturbations spécifiques de la morphologie des épines dendritiques (Belly et al., 2010). Ces observations nous ont amené à penser que CHMP2B pouvait jouer un rôle fonctionnel dans le développement ou la stabilisation des épines dendritiques.

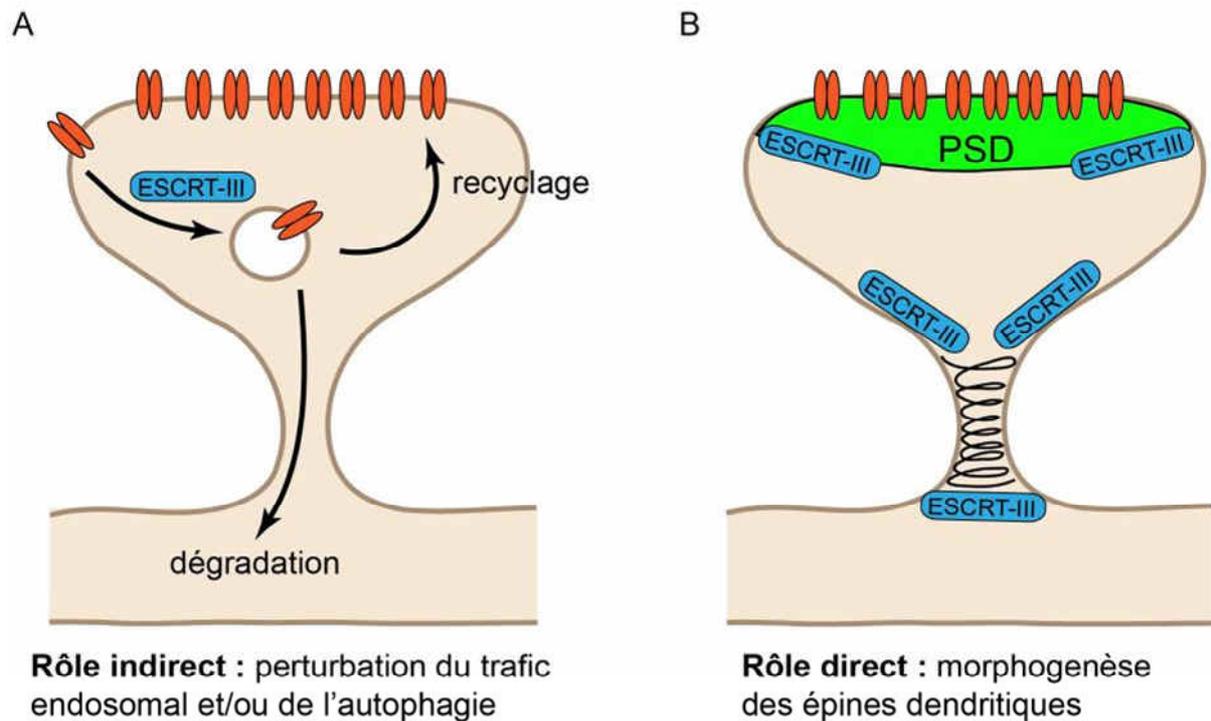
CHMP2B exerce son activité dans les cellules en s'associant à un complexe protéique appelé ESCRT-III (endosomal sorting complex required for transport), qui catalyse des réactions particulières de déformation et de fission membranaire (*Partie 2.4*). ESCRT-III fait partie du macro-complexe ESCRT impliqué dans de nombreux processus cellulaires (*Partie 2.3.2*). Le rôle de la machinerie ESCRT n'a jamais été exploré en détail dans les neurones. Nous allons pourtant voir qu'ESCRT est un bon candidat pour jouer un rôle important dans la physiologie des neurones et des épines dendritiques en particulier.

Nous pouvons émettre deux hypothèses (non mutuellement exclusives) quant au rôle de CHMP2B et de la machinerie ESCRT dans les neurones (Figure 39).

- **Rôle dans le trafic des récepteurs aux neurotransmetteurs**

La machinerie ESCRT est impliquée dans le trafic intracellulaire des protéines de surface. Elle prend en charge les protéines destinées à la dégradation à partir des endosomes précoces jusqu'aux lysosomes. Nous pouvons imaginer que les ESCRT jouent un rôle particulièrement important dans les neurones, au niveau de la balance recyclage/dégradation de protéines membranaires cruciales telles que des récepteurs aux neurotransmetteurs (Figure 39A). Les mutants pathogènes de CHMP2B, en s'accumulant au niveau des membranes endosomales (Skibinski et al., 2005; van der Zee et al., 2008) pourraient perturber le trafic intracellulaire des récepteurs AMPA (Urwin et al., 2010). Ce phénomène est au cœur des processus de maturation et de plasticité des épines dendritiques (Kennedy and Ehlers, 2006). Il existe une corrélation directe entre le nombre de récepteurs AMPA, la taille de la tête des épines et l'efficacité de la transmission synaptique. Nous pouvons donc imaginer que les mutants pathogènes diminuent l'expression à la surface des récepteurs AMPA et entraînent en conséquence des anomalies morphologiques et fonctionnelles des épines dendritiques. Les voies de dégradation endosomale et autophagique étant intimement liées, nous pouvons

envisager que les mutants pathogènes puissent perturber ces deux systèmes, avec les mêmes conséquences fonctionnelles.



**Figure 39. Hypothèses du rôle de CHMP2B et de la machinerie ESCRT dans le fonctionnement et la structure des épines dendritiques.**

(A) Hypothèse d'un rôle fondamental de la protéine dans le trafic endolysosomal. La perturbation de la balance recyclage/dégradation des récepteurs AMPA pourrait entraîner secondairement des problèmes fonctionnels et morphologiques sur les épines.

(B) Hypothèse d'un rôle direct sur la membrane plasmique de l'épine dendritique, via l'action morphogénétique du complexe ESCRT-III. Nous pouvons envisager un rôle des filaments ESCRT-III au niveau du maintien de la structure du cou ou dans l'expansion de la tête, à la manière des protéines à domaine I-BAR.

- **Rôle morphogénétique direct des filaments ESCRT-III**

Les sous-unités du complexe ESCRT-III ont la capacité de s'assembler en filaments à la surface des membranes biologiques, dont la membrane plasmique. L'assemblage de ces filaments catalyse la déformation des membranes avec une topologie particulière, dite « par l'intérieur ». Si nous analysons les épines dendritiques en terme morphologique, nous pouvons nous apercevoir que la topologie de déformation membranaire nécessaire pour maintenir la structure du cou, ainsi que son diamètre (100 - 200 nm), sont compatibles avec les caractéristiques du complexe ESCRT-III. Nous pouvons imaginer que des filaments ESCRT-III puissent jouer un rôle morphogénétique, directement au niveau de la membrane plasmique des épines dendritiques (Figure 39B). Ils pourraient maintenir la structure du cou, élément fondamental dans la compartimentalisation des épines dendritiques ou jouer un rôle dans le gonflement des épines, au même titre que les protéines à domaine I-BAR.

L'objectif de mon travail de thèse est d'explorer ces deux hypothèses et de déterminer le rôle physiologique de la protéine CHMP2B dans le fonctionnement neuronal. Cette grande question peut être divisée en plusieurs parties, qui correspondent aux différents points qui vont être abordés dans la *partie Résultats*.

- Est-ce que CHMP2B a des propriétés particulières au sein du complexe ESCRT-III (dans son association aux membranes, sa polymérisation), qui pourrait expliquer son rôle central dans les pathologies ?
- Où CHMP2B est-il localisé dans les neurones ? Membranes intracellulaire ou membrane plasmique ? La protéine est-elle recrutée dans les épines dendritiques ?
- CHMP2B est-il associé au complexe ESCRT-III et exerce-t-il son activité biologique au travers de ce complexe ? S'il s'agit d'un rôle dans le trafic endosomal, nous pouvons nous attendre à un complexe labile. S'il s'agit d'un rôle structural, nous pouvons nous attendre à un complexe beaucoup plus stable.
- Poursuite des travaux d'Agnès Belly : l'altération morphologique des épines est-elle une conséquence d'un problème de développement ou de stabilisation des épines dendritiques ?
- CHMP2B est-il impliqué dans l'établissement de processus de plasticité synaptique ?
- Peut-on généraliser le rôle de CHMP2B à d'autres processus de morphogénèse neuronale, comme l'arborisation dendritique ?
- Poursuite du travail de Gilles Bodon : Quels sont les partenaires neuronaux de CHMP2B et quelles interactions sont éventuellement perdues ou gagnées par les mutants pathogènes.

Ma thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet ANR (MALZ 2011 : *MAD CHMP2B*), qui reprend la plupart de ces points.

Lien : [http://www.agence-nationale-recherche.fr/suivi-bilan/biologie-sante/maladie-dalzheimer-malz/resume-de-projet-2011/?tx\\_lwmsuivibilan\\_pi2%5BCODE%5D=ANR-11-MALZ-0002](http://www.agence-nationale-recherche.fr/suivi-bilan/biologie-sante/maladie-dalzheimer-malz/resume-de-projet-2011/?tx_lwmsuivibilan_pi2%5BCODE%5D=ANR-11-MALZ-0002).

L'objectif global de ce travail est de mieux comprendre comment des altérations du fonctionnement des synapses peuvent conduire aux troubles cognitifs et moteurs et à la mort neuronale, dans les maladies neurodégénératives.



# Matériel et Méthodes



Cette partie présente les protocoles généraux employés durant cette étude. Pour ce qui concerne les expériences des articles 1 et 2, veuillez-vous référer aux paragraphes «Materials and methods » inclus dans le corps des articles.

## 1. Plasmides et anticorps

### Anticorps

**Tableau 6.** Liste des anticorps utilisés dans cette étude

Anticorps	Espèces	Société (ref)	Dilution	
			IF	WB
anti-CHMP2B	rabbit poly	Abcam (ab33174)	500	10000
anti-CHMP2B	mouse mono	Covalab	100	2000
anti-CHMP4A	rabbit poly	Santa Cruz (67229)	200	2000
anti-CHMP4B	rabbit poly	Abcam (ab105767)	500	2000
anti-CHMP4B	rabbit poly	Santa Cruz (82556)	200	
anti-CHMP4B	mouse mono	Covalab	100	1000
anti-Alix	rabbit poly	Covalab (ab0204)		6000
anti-PSD95	mouse mono	NeuroMab (73-028)	200	4000
anti-GluN1	mouse mono	Synaptic Systems (114011)	200	4000
anti-Synaptophysin	mouse mono	Merck Millipore (MAB5258)		10000
anti-HA	mouse mono	Cell Signaling (2367)	200	5000
anti-HA	rabbit poly	Sigma-Aldrich (H6908)		5000
anti-Flag	mouse mono	Sigma-Aldrich (F3165)	1000	10000
anti-Flag	rabbit poly	Sigma-Aldrich (F7425)	1000	5000
anti-Vps25	rabbit poly	Abcam (ab76210)		2000
anti-Tsg101	mouse mono	Covalab		1000
anti-Actin	mouse mono	Millipore (MAB1501R)		20000
anti-Pan MAGUK	mouse mono	NeuroMab (75-029)		4000
anti-GluN2B	mouse mono	NeuroMab (75-097)		4000
anti-GluR2	mouse mono	Millipore (MABN71)		5000
anti-Spectrin $\alpha$ 2	mouse mono	Santa Cruz (48382)		1000
anti-ShankIII	rabbit poly	Santa Cruz (30193)		1000
anti-Homer	mouse mono	Santa Cruz (17842)		2000
anti-mouse HRP	goat polyclonal	Jackson (115-035-166)		20000
anti-rabbit HRP	goat polyclonal	Jackson (115-035-044)		20000
anti-mouse Alexa488	goat polyclonal	Molecular Probes (A-11029)	1500	
anti-mouse Alexa594	goat polyclonal	Molecular Probes (A-11032)	1500	
anti-mouse cya5	goat polyclonal	Jackson (115-175-146)	1000	
anti-rabbit Alexa488	goat polyclonal	Molecular Probes (A-11034)	1500	
anti-rabbit Alexa594	goat polyclonal	Molecular Probes (A-11037)	1500	
anti-rabbit cya5	goat polyclonal	Jackson (111-175-144)	1000	

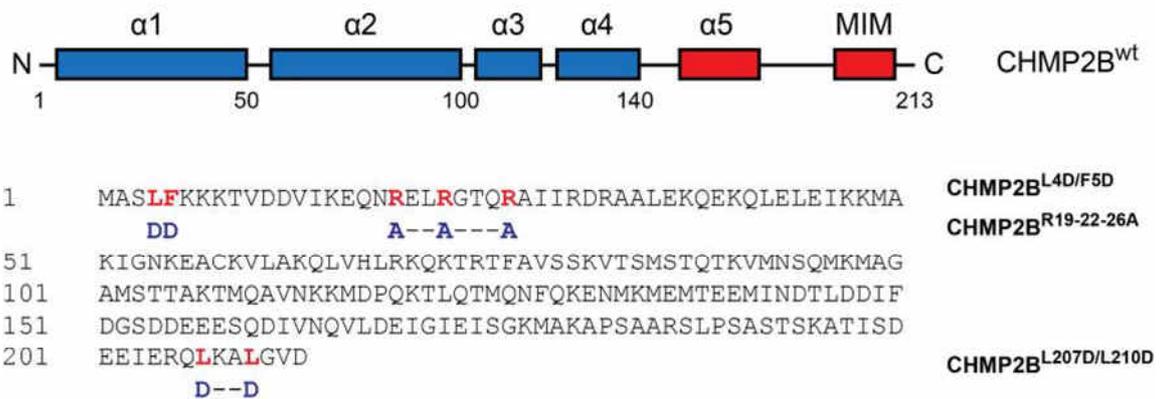
En grisé les anticorps actuellement en cours de développement (collaboration avec la société Covalab).

## Plasmides

**Tableau 7.** Liste des plasmides utilisés dans cette étude

Nom du plasmide	Technique	Cloning sites	Caractéristique	Etiquette	Source
pIRES2-EGFP					
pIRES2-EGFP-CHMP2B WT	In-Fusion (Clontech)	XhoI, XhoI	RNAi res.	C-term FLAG	
pIRES2-EGFP-CHMP2B R19/22/26A	In-Fusion (Clontech)	XhoI, XhoI	RNAi res.	C-term FLAG	
pIRES2-EGFP-CHMP2B intron5	In-Fusion (Clontech)	XhoI, XhoI	RNAi res.	C-term FLAG	
pBI-CMV3					Clontech
pBI-CMV3-CHMP2B WT	In-Fusion (Clontech)	BamHI, HindIII	RNAi res.		
pBI-CMV3-CHMP2B R19/22/26A	In-Fusion (Clontech)	BamHI, HindIII	RNAi res.		
pBI-CMV3-CHMP2B L4D/F5D	In-Fusion (Clontech)	BamHI, HindIII	RNAi res.		
pBI-CMV3-CHMP2B L207D/L210D	In-Fusion (Clontech)	BamHI, HindIII	RNAi res.		
pBI-CMV3-CHMP2B intron5	In-Fusion (Clontech)	BamHI, HindIII	RNAi res.		
pSuper-mCherry					(Belly et al., 2010)
pSuper-mCherry shRNA-CHMP2B		HindIII, BglII			(Belly et al., 2010)
pSuper-mCherry shRNA-GFP		HindIII, BglII			
pCDNA3.1-CHMP2B WT	Topo (Life Technologies)			C-term HA	(Bodon et al., 2011)
pCDNA3.1-CHMP2B R19/22/26A	Quick-Change (Clontech)			C-term HA	
pCDNA3.1-CHMP2A	Topo (Life Technologies)			C-term FLAG	(Bodon et al., 2011)
pCDNA3.1-CHMP3	Topo (Life Technologies)			C-term FLAG	(Bodon et al., 2011)
pCDNA3.1-CHMP4A	Topo (Life Technologies)			C-term FLAG	(Bodon et al., 2011)
pCDNA3.1-CHMP4B	Topo (Life Technologies)			C-term FLAG	(Bodon et al., 2011)
pETM13					W. Weissenhorn
pETM13-CHMP2B-His WT	Topo (Life Technologies)				
pETM13-CHMP2B-His 1-153	Quick-Change (Clontech)				
pETM13-CHMP2B-His WT	Quick-Change (Clontech)				

## Mutations de CHMP2B



**Figure 40.** Mutants de CHMP2B utilisés dans cette étude

CHMP2B est une petite protéine de 213 acides aminés. Nous avons développé 3 mutants de CHMP2B : L4D/F5D ; R19-22-26A ; L207D/L210D.

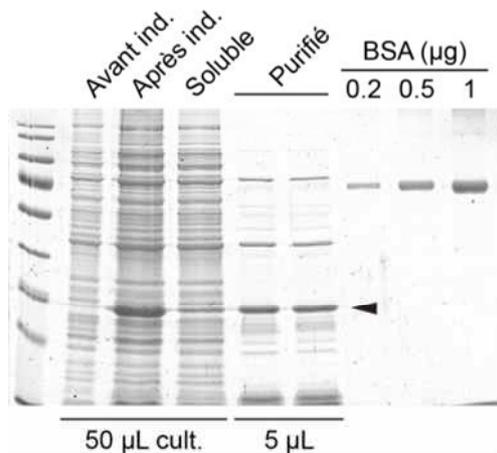
## 2. Biologie moléculaire

### Clonages

Nous avons utilisé le kit de clonage par recombinaison In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech). Les vecteurs de destination sont linéarisés par une ou deux enzymes de restriction. Le gène d'intérêt est amplifié par PCR en utilisant la polymérase Phusion Hot Start II (Thermo) et des amorces contenant chacune 15 paires de bases homologues aux deux extrémités de part et d'autre de la zone d'ouverture du vecteur (Sigma-Aldrich). Le fragment amplifié est purifié sur colonne NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). La réaction de recombinaison est réalisée en utilisant 50 ng d'insert et 100 ng de vecteur et 2 µL de réactif InFusion. Le mélange est transformé dans des bactéries chimiocompétentes Stellar. Les plasmides sont ensuite purifiés par mini-prep et séquencés. Ils sont transformés à nouveau dans les bactéries DH5α, pour production d'ADN plasmidique ou BL21, pour production de protéines recombinantes. Les plasmides destinés à la transfection eucaryote sont purifiés à l'aide d'un kit de Maxi-Prep (Macherey-Nagel).

### Production et purification de CHMP2B-His recombinant

Des bactéries BL21 sont transformées par électroporation et étalées sur boîte de Pétri. Une colonie estensemencée en culture liquide sur la nuit. La pré-culture est diluée dans un volume de 250 à 500 mL, à une DO de départ de 0,2. L'induction est effectuée à une DO de 0,6, avec 500 µM d'IPTG. La production est effectuée pendant 4 h à 25°C. Les bactéries sont centrifugées 30 min à 5000 x g et resuspendues dans un tampon 50 mM phosphate de sodium, pH 7,4 ; 300 mM NaCl (contenant ou non 8 M d'urée, pour une lyse en condition dénaturantes). Les bactéries sont lysées par congélation-décongélation (3 x), puis soniquées (3 x 30 sec). L'extrait soluble est récupéré après centrifugation à 20 000 x g. Les protéines étiquetées sont incubées en batch avec une résine Talon Metal Affinity (Clontech), en suivant les recommandations du fournisseur. Les billes sont lavées 5 fois et la protéine purifiée est éluée, alternativement, soit avec le tampon de couplage contenant 150 mM d'imidazole, soit avec le tampon de couplage tamponné à pH 3,0. Le dosage de la quantité de protéine produite, est effectué sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu Coomassie (Figure 41).



**Figure 41.** Production de CHMP2B-His recombinant

Gel SDS-PAGE coloré au bleu Coomassie indiquant le rendement d'une expérience de production et de purification de CHMP2B recombinant dans des conditions non dénaturantes. Notez que dans ce cas, approximativement 95% de la protéine reste insoluble. CHMP2B est représenté par la tête de flèche.

### 3. Biochimie

#### Préparation de synaptosomes à partir de cerveaux de rat

Le protocole est largement inspiré du protocole de référence de préparation des synaptosomes sur gradient de sucrose (Carlin et al., 1980). Les synaptosomes sont préparés à partir de cerveaux de rats adultes de lignée OFA. Nous avons utilisé des animaux des deux sexes âgés de 2 à 4 mois. Les animaux sont sacrifiés par décapitation après anesthésie par inhalation d'Isoflurane. Le cerveau est rapidement isolé et placé dans du tampon d'homogénéisation (sucrose 0,32 M ; HEPES 4 mM, pH 7,4 ; NaF 15 mM ;  $\beta$ -glycérophosphate 15 mM ; cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche)). Après rinçage, le cerveau est grossièrement haché et broyé dans du tampon d'homogénéisation (1 mL / 100 mg de tissu) à l'aide d'un potter (15 aller-retours, 500 rpm). L'homogénat est centrifugé 10 min à 1 400 x g. Le surnageant est conservé et le culot repris dans 8 mL de tampon d'homogénéisation puis centrifugé à 10 min à 800 x g. Les deux surnageants sont poolés (S1) et centrifugés à 10 min à 13 800 x g pour obtenir un culot de membranes totales (P2) et du cytosol (S2). Le P2 est repris dans 4 mL de tampon d'homogénéisation et 4 x 1 mL sont déposés sur 4 gradients discontinus de sucrose (0,85 M ; 1 M ; 1,2M : 3,5 mL de chaque). Le gradient est centrifugé 2 h à 82 500 x g (27 000 rpm, rotor Beckmann SW 41). Les synaptosomes (SYN) sont récupérés à l'interface 1-1,2 M, dilués dans du tampon d'homogénéisation et centrifugés à nouveau à 100 000 x g. Les synaptosomes sont utilisés dans la foulée ou repris dans du tampon d'homogénéisation et stockés à -80°C.

#### Purification de densité post-synaptique

Le culot de synaptosomes (500  $\mu$ g) est repris dans, pH 7,4 contenant 0,5% de TritonX-100 et incubé sur roue 30 min à 4°C. Après centrifugation 20 min à 32 000 x g, le culot (PSDI) est divisé en deux. La première moitié est solubilisée dans les mêmes conditions et centrifugé 20 min à 200 000 x g (culot PSDII). La deuxième moitié est solubilisée dans 1 mL de tampon HEPES 50 mM pH 7,4 contenant 3% de sarkosyl et centrifugée 1 h à 200 000 x g. Les culots sont repris dans 0,1% de SDS, dosés avec un réactif BCA (Pierce), puis déposés sur gel SDS-PAGE en équivalence de masse.

#### Test de solubilisation du CHMP2B synaptique par différents détergents

Des culots de synaptosomes (200  $\mu$ g) sont repris dans 500  $\mu$ L de de tampon HEPES 50 mM pH 7,4 (ou 9,0 pour le DOC) contenant 1% de digitonine, de TritonX-100, de n-Dodecyl-beta-D-Maltoside, de DOC ou de SDS. Les échantillons sont incubés sur roue, 30 min à 4°C, et centrifugés 20 min à 20 000 x g. Les culots sont déposés en équivalence de volume sur gel SDS-PAGE.

### **Couplage covalent des IgG sur des billes de protéine A magnétiques**

50 µL de Dynabeads Protéine A (Invitrogen) sont lavées deux fois dans du PBS contenant 0,1% de TritonX-100 puis incubées pendant 1 h minimum, sur une roue et à température ambiante (TA), avec 15 µg d'anticorps dilués dans 1 mL du même tampon. Les billes sont lavées deux fois dans du tampon borate 0,2 M, pH 9,0. Le couplage covalent est effectué par une incubation de 30 min à TA dans 20 mM de diméthyl-pimélimidate (DMP) dilué dans du tampon Borate. Les billes sont ensuite incubées dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 pendant 15 min. Les IgG non couplées sont éliminées par un rapide lavage un tampon Glycine 100 mM, pH 2,5. Les billes sont lavées en PBS et stockées dans 100 µL de PBS contenant 0,02% d'azide de sodium.

### **Immunoprécipitation de CHMP2B synaptique**

Les synaptosomes purifiés (500 µg) sont solubilisés dans 1 mL de tampon Tris 20 mM pH 9,0 ; 150 mM NaCl ; 15 mM NaF ; 1% sodium deoxycholate (DOC) et inhibiteurs de protéases, pendant 30 min sur roue à 4°C. Après 20 min de centrifugation à 100 000 x g, le surnageant est dilué dans trois volumes de tampon Tris 50 mM pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 15 mM NaF et 1% TritonX-100 et inhibiteurs de protéases. Le mélange est préadsorbé 30 min sur des billes de protéine A magnétiques couplées avec des IgG de lapin non spécifiques. Le surnageant correspond à l'input et est soumis à l'IP pendant 2 h à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 5 fois dans un tampon identique, mais contenant 0,75% TritonX-100 et 0,25% DOC. Un sixième lavage est effectué dans un tampon contenant 0,1% de Triton. Les protéines sont éluées dans 200 µL de tampon Laemmli 1,5X et mises à bouillir pendant 10 min. Les billes sont éliminées et 40 µL sont déposés sur gel SDS-PAGE en vue d'une coloration au nitrate d'argent (20 µL pour une analyse en Western-Blot).

### **Pull-down à partir de CHMP2B-His recombinant**

La protéine recombinante (50 µg) préalablement purifiée en conditions dénaturantes, est diluée 10 fois, goutte à goutte, dans un tampon 50 mM phosphate de sodium, pH 7,4 ; 300 mM NaCl ; 0,1% TritonX-100 et laissée à renaturer sur roue, à température ambiante, pendant 10 min. La protéine est immobilisée à nouveau sur des billes Talon Metal Affinity (Clontech). Les billes sont lavées rapidement et équilibrées avec un tampon Tris 50 mM pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 15 mM NaF et 0,75% TritonX-100 et 0,25% DOC. Les synaptosomes sont préparés de la même manière que pour les IP, à l'exception que le pH du tampon de solubilisation est fixé à 11,0 au lieu de 9,0. La fraction soluble est diluée, ramenée à pH physiologique et incubée pendant 2 h sur les billes. L'éluion est identique à l'IP.

## **Immunoprécipitation à partir de lysats de cellules HEK**

Les cellules HEK sont lysées mécaniquement dans un tampon d'homogénéisation (sucrose 0,32 M ; HEPES 4 mM, pH 7,4 ; NaF 15 mM ;  $\beta$ -glycérophosphate 15 mM ; cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche)), à l'aide d'un potter. Après 10 min de centrifugation à 800 x g, le surnageant est centrifugé à 10 min à 15 000 x g, pour isoler un culot de membranes totales. Les membranes sont solubilisées dans un tampon Tris 20 mM pH 9,0 ; 150 mM NaCl ; 15 mM NaF ; 1% sodium deoxycholate (DOC) et inhibiteurs de protéases, pendant 30 min sur roue à 4°C. Après 20 min de centrifugation à 20 000 x g, le surnageant est dilué dans trois volumes de tampon Tris 50 mM pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 15 mM NaF et 1% TritonX-100 et inhibiteurs de protéases.

## **Analyse protéomique en spectrométrie de masse**

Ces analyses sont effectuées au CEA de Grenoble (Y. Couté, plateforme EDyP). Lors des expériences destinées à la spectrométrie de masse, un maximum de précautions sont prises pour éviter la contamination des échantillons par des protéines bactériennes ou des kératines humaines. Le protocole d'analyse détaillé se trouve dans la partie Materials and Methods de l'article 2.

## **Chromatographie d'exclusion de taille**

La colonne Sephacryl S-300 HR est pré-équilibrée avec 3 volumes de tampon de colonne Tris 20 mM pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 15 mM NaF ; 15 mM  $\beta$ -glycérophosphate ; 0,5% TritonX-100 et inhibiteurs de protéases. Les synaptosomes fraîchement purifiés (10 mg) sont solubilisés dans 3 mL de tampon Tris 20 mM pH 9,0 ; 150 mM NaCl ; 15 mM NaF ; 1% sodium deoxycholate (DOC) et inhibiteurs de protéases, pendant 30 min sur roue à 4°C. Après 20 min de centrifugation à 100 000 x g le surnageant est filtré à 0,2  $\mu$ m. 2,5 mL d'échantillon sont injectés et la séparation est poursuivie avec du tampon de colonne (120 mL, 0,5 mL/min). 60 fractions de 2 mL sont récupérées. Lors des analyses en Western-Blot, 25  $\mu$ L des fractions 15 à 47 sont déposées (elles recouvrent l'intégralité du volume utile de la colonne). Pour les séparations en vue des immunoprécipitations, les fractions 18 à 21 (complexe contenant CHMP2B) d'une part, et 33 à 37 (monomère) d'autre part, sont poolées et soumises à l'IP.

## **SDS-PAGE et Western-Blot**

Les protéines sont reprise dans du tampon Laemmli (60 mM Tris-Cl pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,01% bleu de bromophénol) et déposées sur un gel d'acrylamide de concentration adaptée. Le gel est mis à migrer pendant environ 90 min à 25

mA par gel (surface 10 x 8 cm). Il est ensuite transféré sur une membrane de PVDF par électrotransfert semi-sec (de 45 min à 1h15 par surface de gel en fonction de la taille des protéines à transférer : 20 V, 400 mA). La membrane est lavée à l'eau distillée, puis incubée 1h dans du tampon TBS-TL (Tris 20 mM, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,1 % de Tween20 et 5 % de lait), sous agitation. L'anticorps primaire est incubé 1 h à température dans du TBS-TL ou alternativement la nuit à 4°C. La membrane est lavée 6 fois sur 30 min dans du TBS-T puis incubée 30 min avec l'anticorps secondaire, couplé à la HRP (Horseradish peroxydase), dilué dans du TBS-T. La membrane est lavée à nouveau 5 fois dans du TBS-T et une dernière fois dans du TBS sans détergent. Elle est incubée dans un réactif ECL maison ou commercial (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore), pour plus de sensibilité. Les bandes sont révélées en chambre noire sur des films photographiques (BioMax MR Film Carestream).

## 4. Biologie cellulaire

### Culture cellulaire

Les lignées cellulaires utilisées sont les lignées humaines HeLa et HEK 293T ainsi que la lignée de souris N2A. Les cellules HeLa sont cultivées dans du milieu DMEM « low glucose » (Gibco), supplémenté avec 2 mM de L-Glutamine (Gibco) et 10% de sérum de veau fœtal (Gibco). Les cellules HEK et N2A sont cultivées dans du milieu DMEM « high glucose » (Gibco), supplémenté avec 2 mM de L-Glutamine (Gibco), 10 U/mL d'un mélange Pénicilline/Streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (Gibco). Les cellules sont incubées dans une étuve humide à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

### Transfection des lignées cellulaires

Les cellules HEK sont transfectées au phosphate de calcium. Pour des boîtes 10 cm de diamètre, 300 µL d'un mélange de 15 µg de plasmide et 220 mM de CaCl<sub>2</sub> est préparé et incubé 10 min à température ambiante. Ensuite 300 µL de tampon HBS 2X (Fluka) est ajouté et le tube est incubé 2 min à 37°. Le mélange est ajouté goutte à goutte sur les cellules. Les cellules HeLa et N2A sont transfectées avec du JetPei (Polyplus) en suivant les recommandations du fournisseur. Idéalement, le milieu de culture est changé 4 h après la transfection.

## 5. Neurones

### Culture primaire de neurones d'embryons de rat

Les lamelles sont préparées au préalable par une incubation de 72 h dans de l'acide nitrique à 70%, pour les rendre hydrophiles. Les boîtes (contenant ou non des lamelles) sont incubées 4 h à 37°C avec de la poly-D-lysine 50 µg/mL (Sigma, n°P7280) dissoute dans du tampon borate (50 mM acide borique, 13 mM borax, pH 8,5). Les boîtes sont ensuite lavées abondamment rincées à l'eau distillée stérile et placées dans le milieu d'ensemencement, constitué de DMEM (Gibco, n°41966029) supplémenté avec 10% de sérum de cheval (Gibco, n°26050).

Les neurones d'hippocampe sont prélevés sur des embryons de rat OFA au 18ème jour de vie embryonnaire, conformément à la Directive n°86/609 du Conseil de la Communauté Européenne. La femelle gestante est anesthésiée à l'isoflurane avant la décapitation. L'utérus contenant les embryons est prélevé par laparotomie, puis placé dans une boîte contenant du HBSS chaud (5 mM glucose, 10 mM HEPES, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 440 µM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 270 µM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 U.mL<sup>-1</sup> Pénicilline/Streptomycine, pH 7,4). Les embryons sont transférés dans une nouvelle boîte avec du HBSS chaud, où ils sont décapités. Les cerveaux sont extraits des boîtes crâniennes. Par observation sous loupe binoculaire, les hémisphères cérébraux sont séparés puis les méninges soigneusement enlevées ; les hippocampes peuvent alors être prélevés. Ils sont placés au fur et à mesure dans du HBSS chaud. Après trois rinçages à l'HBSS chaud, les hippocampes sont traités avec 0,25% trypsine-EDTA (Gibco, n°25200) supplémenté avec 15 mM HÉPÈS et 33 mM glucose pendant 15 min à 37°C. Ils sont ensuite lavés deux fois à l'HBSS chaud. Pendant 2 minutes à 37°C, la trypsine est ensuite stoppée avec 2 mg/mL d'inhibiteur de trypsine (Sigma, n°T9003), auquel est ajouté 150 U/mL de DNase (10 µg/L ou, Sigma, n°D5025) afin de digérer l'ADN des cellules lysées pendant la dissection, et faciliter la dissociation mécanique. Les hippocampes sont ensuite lavés deux fois à l'HBSS chaud et triturés dans 1 mL de HBSS chaud, avec une pipette 1000 µL et un cône avec un filtre. Les neurones sont comptés sur lame de Malassez et semés à la densité de 12000 cellules par centimètre carré, sur les lamelles préalablement préparées. Le milieu d'ensemencement est constitué de DMEM (Gibco, n°41966029) supplémenté avec 10% de sérum de cheval (Gibco, n°26050). Deux heures plus tard ce milieu est remplacé par le milieu de culture, constitué de Neurobasal (Gibco, n°21103049) supplémenté avec du B27 (Gibco, n°17504044) concentré 1 fois, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate de sodium, et 10 U/mL Pénicilline/Streptomycine. Une fois par semaine environ un cinquième de milieu frais est ajouté dans les boîtes, pour compenser l'évaporation.

### Transfection des neurones

Les neurones sont transfectés avec une version modifiée d'un protocole de transfection au phosphate de calcium adapté aux cultures matures ([Jiang and Chen, 2006](#)). Pour des boîtes de

35 mm, 2 µg d'ADN sont dilués dans 45 µL d'H<sub>2</sub>O. Nous ajoutons 5 µL de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M goutte à goutte. 50 µl de tampons BES est ajouté (goutte à goutte en faisant buller) puis le mélange est incubé 15 min à température ambiante. Pendant ce temps, les lamelles sont transférées dans 1 mL de milieu MEM et incubées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Le mélange est ajouté sur les boîtes qui sont incubées 1 h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Les lamelles sont ensuite transférées dans une autre boîte contenant 2 mL de MEM et préalablement incubée dans une étuve à 10% CO<sub>2</sub>. La boîte est mise à rééquilibrer à 5% CO<sub>2</sub> pendant 10 min, puis les lamelles sont finalement transférées dans leur milieu Neurobasal d'origine.

### **Fixation et immunomarquages (valable également pour les cellules en culture)**

Les cellules sont lavées dans du PBS, puis fixées pendant 15 min avec de la PFA-sucrose (4%-4%) dans du PBS. Les cellules sont rincées 4 fois dans du PBS-glycine 0,1% puis perméabilisées immédiatement avec du PBS-TritonX-100 0,25%. Les cellules sont rincées à nouveau dans du PBS. Les lamelles sont mises à bloquer 30 min dans du PBS contenant 5% de GPI. Les anticorps primaires et secondaires sont incubés 1 h dans du PBS-GPI. Nous effectuons 3 lavages en PBS après chaque incubation. Les lamelles sont ensuite rincées à l'eau puis plongées dans de l'éthanol pur et séchées. Le montage sur lame s'effectue avec du Mowiol.

## **6. Microscopie**

### **Microscopes**

Nous avons utilisé principalement le microscope à épifluorescence Axiovert 200 et le microscope confocal LSM710 (Zeiss). Les objectifs à huile 63x (ON : 1,2) et 100x (ON : 1,3) ont été utilisés sur l'Axiovert. Les objectifs à huile 40x (ON : 1,3) et 63x (ON : 1,4) ont été utilisés sur le LSM 710. Les images ont été prises respectivement avec les logiciels Metamorph et Zen. Les traitement et analyses d'images ont été effectués sous ImageJ.

### **Arborisation dendritique et analyse de Sholl**

Les neurones d'hippocampe sont co-transfectés à 10 DIV avec 1 µg de plasmide pSuper-mCherry et 1 µg de plasmide pBi-CMV3. Le plasmide pSuper-mCherry code les shRNA spécifique des protéines d'intérêt ou un shRNA spécifique de la GFP, en contrôle. Le plasmide pBi-CMV3 code la protéine fluorescente ZsGreen et permet de co-exprimer des versions de CHMP2B résistantes aux RNAi, pour les expériences de restauration. Les neurones sont fixés à 14 DIV et analysés en aveugle, en microscopie confocale (4 plans, 350\*350 µm, 40x). Les neurones qui co-expriment de manière modérée la protéine fluorescente rouge mCherry et la protéine fluorescente verte ZsGreen sont choisis pour

l'analyse. L'arborisation neuronale a été reconstruite à partir de la fluorescence de la mCherry. Après la binarisation des images la complexité de l'arbre dendritique a été mesurée automatiquement avec le plugin «Sholl Analysis» du logiciel ImageJ (20 cercles concentriques tous les 5  $\mu\text{m}$ , en partant du corps cellulaire).

# Résultats



## 1. Déformation de la membrane plasmique par la sous-unité CHMP2B

**Article 1 : 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**

Gilles Bodon\*, **Romain Chassefeyre**\*, Karin Pernet-Gallay, Nicolas Martinelli, Grégory Effantin, David Lutje Hulsik, Agnès Belly, Yves Goldberg, Christine Chatellard-Causse, Béatrice Blot, Guy Schoehn, Winfried Weissenhorn et Rémy Sadoul

\* : les auteurs ont contribué à égalité

**The Journal of Biological Chemistry** (18 Novembre 2011; 286, 40276-40286)

Lien : <http://www.jbc.org/content/286/46/40276.full?sid=7c7a2f36-9868-4464-b7a5-f98a487574b7>

## Contexte de l'étude

La machinerie ESCRT est requise pour de nombreux processus cellulaires : formation de compartiments intracellulaires comme les endosomes multivésiculés (EMV), cytokinèse des cellules eucaryotes, bourgeonnement de certains virus enveloppés. Ces mécanismes nécessitent la déformation, puis la fission de membranes avec une topologie bien particulière. On parle de déformation « par l'intérieur ».

Des études chez la levure et *in vitro* ont montré que le remodelage de la membrane est principalement catalysé par le complexe ESCRT-III (Wollert et al., 2009). Les sous-unités du complexe ESCRT-III s'assemblent de manière séquentielle et transitoire sur la face cytosolique des membranes. Elles se polymérisent *in vitro* pour former des filaments hélicoïdaux (Lata et al., 2008). Bien que de nombreux groupes se penchent activement sur la question, le mécanisme par lequel ESCRT-III déforme les membranes n'est pas complètement élucidé à ce jour. Plusieurs modèles coexistent et suggèrent que les sous-unités ESCRT-III s'assemblent au niveau de bourgeons membranaires préexistants (Wollert and Hurley, 2010). Les filaments hélicoïdaux formés induiraient des contraintes sur la bicouche phospholipidique, jusqu'à aboutir à la fission membranaire. Ces modèles mécanistiques attendent toujours une confirmation dans un contexte cellulaire.

Des mutants de la sous-unité CHMP2B sont associés à la démence frontotemporale (FTD), une maladie neurodégénérative associée à la maladie d'Alzheimer. Vps2, l'homologue de CHMP2B chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ne semble pas requise pour la fission membranaire (Wollert and Hurley, 2010; Wollert et al., 2009). Le rôle de Vps2 semble se limiter au recrutement de l'ATPase Vps4, en charge de la dépolymérisation d'ESCRT-III.

La présence de multiples isoformes et la diversité des substrats membranaires, en particulier chez les mammifères, suggère qu'il n'existe non pas un, mais une multitude d'assemblages ESCRT-III. Une étude a montré récemment que les isoformes des sous-unités CHMP2 (CHMP2A, B) et CHMP4 (CHMP4A, B, C) sont les seules absolument requises pour le bourgeonnement de particules virales du VIH (Morita et al., 2011). Au contraire, dans le cas de la cytokinèse, la présence de toutes les sous-unités semble requise (Morita et al., 2010).

Cet article est l'aboutissement d'une étude concernant la sous-unité CHMP2B. Dans le but de mieux comprendre comment les mutants de cette protéine conduisent à la mort neuronale dans la FTD, nous nous sommes intéressés au comportement de la protéine sauvage en termes de localisation et de polymérisation. Pour cela, nous avons utilisé des modèles de lignées cellulaires humaines (HEK293T et HeLa), plus adaptés que les neurones pour ce genre d'étude.

Ce travail a été mené en collaboration avec les équipes du Pr. Winfried Weissenhorn et du Dr. Guy Schoehn, à Grenoble. Ma contribution a concerné l'élaboration et la réalisation de la plupart des expériences et le montage des figures.

## Résultats

L'analyse de la distribution des composants ESCRT-III, en immunofluorescence, a montré que les protéines étaient exprimées de manière diffuse dans le cytoplasme de la cellule. L'AAA ATPase Vps4 est responsable de la dépolymérisation d'ESCRT-III. La déplétion conjointe de Vps4A et Vps4B par des siRNA, a entraîné une relocalisation des sous-unités. CHMP4A et CHMP4B endogènes étaient relocalisées et concentrées dans des patches intracellulaires. De manière surprenante, suite à la déplétion de Vps4, la sous-unité CHMP2B se concentrait à la membrane plasmique. Ces données suggèrent que les ATPases Vps4A et Vps4B dépolymérisent des assemblages ESCRT-III contenant CHMP2B au niveau de la membrane plasmique (Figure 1).

CHMP2B sauvage surexprimé se comportait comme la protéine endogène et était distribuée de manière diffuse dans le cytoplasme. Cependant, dans 10% des cellules environ, la protéine surexprimée se concentrait à la membrane plasmique et formait de longues et fines protrusions. Ce phénotype était fonction du taux d'expression de CHMP2B. Les protrusions étaient la plupart du temps détachées du substrat et pouvaient mesurer jusqu'à plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$ . L'analyse des cellules en microscopie immuno-électronique, a montré que les protrusions qui contenaient du CHMP2B avaient un aspect tubulaire et étaient recouvertes par la membrane plasmique. L'anticorps anti-CHMP2B décorait toute la longueur de ces tubes. La formation des protrusions était strictement dépendante de la capacité de CHMP2B à s'associer aux phospholipides. La présence d'une mutation L4D/F5D, qui abolit l'interaction avec la bicouche phospholipidique, suffisait à empêcher la formation de tubes (Figure 2). L'addition d'une étiquette en C-ter ou l'expression du mutant pathogène tronqué (CHMP2B<sup>intron5</sup>) avaient tendance à augmenter la propension des cellules à induire la formation de ce genre de protrusions.

Nous nous sommes intéressés aux capacités de déformation de la membrane plasmique par les autres composants de la famille ESCRT-III. Les protéines CHMP4A et CHMP4B surexprimées se concentraient dans des agrégats intracellulaires venant piéger toutes les autres sous-unités. CHMP2A et CHMP3 restent exprimées de manière relativement diffuse dans le cytoplasme. Ces observations sont cohérentes avec ce qui a déjà pu être observé par d'autres équipes (Shim et al., 2007). Ces données montrent que CHMP2B dispose d'une spécificité, au sein de la famille ESCRT-III, dans sa capacité à se concentrer à la membrane plasmique et à former des protrusions membranaires à ce niveau (Figure 3).

En immunofluorescence, aucune autre sous-unité n'a pu être détectée dans les tubes formés par CHMP2B. Seules CHMP4A et CHMP4B se concentraient en patches à la base des protrusions. Les protrusions ne contenaient pas non plus d'éléments du cytosquelette d'actine ou de microtubule. Cette indépendance, vis à vis du cytosquelette d'actine, a été confirmée par la persistance de telles structures membranaires suite à un traitement des cellules par la latrunculine A (Figure 5). Nous avons montré que la formation des tubes était en revanche régulée par l'ATPase Vps4B. En effet Vps4B était recrutée dans les tubes et la coexpression de CHMP2B et avec un mutant dominant négatif de Vps4B (E235Q) avait tendance à augmenter considérablement la proportion de cellules capables de faire des tubes (Figure 4). De plus, les cellules surexprimant un mutant de CHMP2B incapable de se lier à Vps4B (CHMP2B<sup>L207D/L210D</sup>), ne formaient pas de tubes membranaires.

Les tubes formés par CHMP2B se détachaient parfois des cellules ont pu être purifiés à partir du milieu de culture. Leur observation en cryo-microscopie électronique à haute résolution a révélé que les tubes faisaient de 100 à 400 nm de diamètre. Ils étaient recouverts par la bicouche phospholipidique et creux. Des stries perpendiculaires à l'axe longitudinal ont été observées. Elles correspondaient à un filament hélicoïdal d'un pas régulier de 32 Å qui tapissait la paroi intérieure du tube. Ces données montrent que CHMP2B s'assemble en polymère hélicoïdal pour déformer la membrane plasmique (Figure 6).

### **Lien avec la problématique de la thèse**

Ce travail amène de nouveaux éclaircissements en ce qui concerne les mécanismes par lesquels les mutants de CHMP2B conduisent à la mort neuronale dans la DFT. Certaines études ont montré que le pouvoir pathogène des mutants provenait d'une dérégulation de l'autophagie (Filimonenko et al., 2007; Lee et al., 2007). Un autre groupe a montré que les cellules mutantes présentaient des endosomes tardifs élargis et que ces derniers étaient incapables de fusionner avec les lysosomes (Urwin et al., 2010). Les résultats de notre travail suggèrent que le rôle de CHMP2B n'est pas cantonné aux compartiments membranaires intracellulaires, mais s'étend également à la membrane plasmique. Sans remettre totalement en question les études précédentes, nous pouvons imaginer que les dérégulations de l'autophagie et du système endolysosomal ne sont probablement pas les seules explications possibles pour la mort neuronale. Si nous nous replaçons dans le contexte des résultats d'Agnès Belly (Belly et al., 2010), nous pouvons émettre l'hypothèse que l'effet des mutants sur la morphologie des épines dendritiques reflète un rôle morphogénétique de CHMP2B au niveau de la membrane plasmique de l'épine. La vérification de cette hypothèse constitue la suite de mon travail de thèse.

# 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<sup>\*,§</sup>

Received for publication, July 18, 2011, and in revised form, August 29, 2011. Published, JBC Papers in Press, September 16, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.283671

Gilles Bodon<sup>‡§1,2</sup>, Romain Chassefeyre<sup>‡§1</sup>, Karin Pernet-Gallay<sup>§\*</sup>, Nicolas Martinelli<sup>||3</sup>, Grégory Effantin<sup>||4</sup>, David Lutje Hulshof<sup>||</sup>, Agnès Belly<sup>‡§2</sup>, Yves Goldberg<sup>‡§</sup>, Christine Chatellard-Causse<sup>‡§</sup>, Béatrice Blot<sup>‡§</sup>, Guy Schoehn<sup>||\*\*††§5</sup>, Winfried Weissenhorn<sup>||</sup>, and Rémy Sadoul<sup>††§5</sup>

From <sup>†</sup>INSERM, U836, Equipe 2, Neurodégénérescence et Plasticité, Grenoble F-38042, France, <sup>‡</sup>INSERM, U836, Plateforme de Microscopie, Grenoble F-38042, France, <sup>§</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble F-38042, France, <sup>||</sup>Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI) UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, Grenoble F-38042, France, <sup>\*\*</sup>Commissariat à l'Energie Atomique-Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075, Grenoble F-38027, France, <sup>††</sup>CNRS Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075, Grenoble F-38027, France, and the <sup>§5</sup>Université Joseph Fourier Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075, Grenoble F-38027, France

**Background:** ESCRT proteins catalyze membrane budding and fission away from the cytosol.

**Results:** The ESCRT-III protein CHMP2B polymerizes into tubular helical structures deforming the plasma membrane.

**Conclusion:** CHMP2B, not only mediates recruitment of the ESCRT-dissociating ATPase VPS4, as proposed previously, but also molds membranes.

**Significance:** ESCRT-III polymerize into a novel kind of membrane deforming filament distinct of actin and tubulin.

The endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT-0-III) allow membrane budding and fission away from the cytosol. This machinery is used during multivesicular endosome biogenesis, cytokinesis, and budding of some enveloped viruses. Membrane fission is catalyzed by ESCRT-III complexes made of polymers of charged multivesicular body proteins (CHMPs) and by the AAA-type ATPase VPS4. How and which of the ESCRT-III subunits sustain membrane fission from the cytoplasmic surface remain uncertain. *In vitro*, CHMP2 and CHMP3 recombinant proteins polymerize into tubular helical structures, which were hypothesized to drive vesicle fission. However, this model awaits the demonstration that such structures exist and can deform membranes *in cellulo*. Here, we show that depletion of VPS4 induces specific accumulation of endogenous CHMP2B at the plasma membrane. Unlike other CHMPs, overexpressed full-length CHMP2B polymerizes into long, rigid tubes that protrude out of the cell. CHMP4s relocate at the base of the tubes, the formation of which depends on VPS4. Cryo-EM of the CHMP2B membrane tubes demonstrates that CHMP2B polymerizes into a tightly packed helical lattice, in

close association with the inner leaflet of the membrane tube. This association is tight enough to deform the lipid bilayer in cases where the tubular CHMP2B helix varies in diameter or is closed by domes. Thus, our observation that CHMP2B polymerization scaffolds membranes *in vivo* represents a first step toward demonstrating its structural role during outward membrane deformation.

Studies in yeast have revealed that protein complexes called ESCRTs (endosome-sorting complexes required for transport) play a pivotal role in intraluminal vesicle budding inside endosomes, an essential step for the sorting of receptors toward degradation (1–3). The particularity of ESCRT complexes is to induce membrane vesiculation with a topology that is inverted compared with coated vesicles budding from a donor membrane and released into the cytosol. Four ESCRT complexes have been characterized so far: ESCRT-0, -I, -II, and -III. ESCRTs 0, I, and II are recruited to membranes as complexes (4). In contrast, ESCRT-III assembles sequentially and transiently at membranes, and requires VPS4 for disassembly (5). Yeast ESCRT-III is composed of seven highly related proteins. Each of them has one to three homologs in mammals, which are grouped into eight families designated CHMP1–7 (charged multivesicular body proteins) and IST1 (increased sodium tolerance-1). In yeast, four ESCRT-III proteins essential for vesicle release have been shown to be recruited on endosomal membranes in the following order: two Vps20p subunits (CHMP6) recruited by ESCRT-II to nucleate the assembly of two Snf7p (CHMP4A–C) spirals, which are capped by Vps24p (CHMP3) and Vps2p (CHMP2A and -B) (6–8). The latter recruits VPS4 (9) (10), to catalyze disassembly of ESCRT-III (11–14). *In vitro*,

\* This work was supported by INSERM, CNRS, Université Joseph Fourier, Fondation France Alzheimer, and ANR (Grant 08-Blanc-0271, to W. W., R. S., and G. S.).

§ The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table S1, Figs. S1–S4, and Movies S1 and S2.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work. Supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

<sup>2</sup> Supported by the Fondation France Alzheimer.

<sup>3</sup> Supported by the Région Rhône-Alpes (Cluster 10 Infectiologie).

<sup>4</sup> Supported by the Agence Nationale de la Recherche.

<sup>5</sup> To whom correspondence should be addressed: Grenoble Institute of Neuroscience, Chemin Fortuné Ferrini, BP 170, F-38042 Grenoble, France. Tel.: 33-456-520-544; Fax: 33-456-520-554; E-mail: remy.sadoul@ujf-grenoble.fr.

yeast ESCRT-I and II are sufficient to form vesicles on giant unilamellar vesicles and ESCRT-III induces membrane fission (15).

In mammalian cells, ESCRT complexes also play a role at the plasma membrane during cytokinesis (16–19) and budding of some enveloped viruses (20–25). Although all ESCRT-III members and VPS4 are required during cell division (17), siRNA knockdown experiments indicate that only one of the two CHMP2, and one of the three CHMP4, isoforms and their direct interaction are absolutely required for virus egress (26).

Little direct evidence exists so far revealing how mammalian ESCRT-III complexes mold membranes *in vivo*. ESCRT-III proteins are small helical assemblies that are auto-inhibited in the cytosol and become activated upon interaction with a membrane (12, 27–31). One common theme between CHMP proteins is their capacity to polymerize *in vitro*. CHMP1A polymerizes into large tubes, IST1 assembles into curled sheets (29), whereas CHMP4B associates into arrays of loose circular filaments (32). In contrast, CHMP3 and CHMP2A polymerize into helical tubular structures (12, 29) that can be closed at one end to form dome-like structures. It has been hypothesized that the tight interaction of the dome with the membrane at the neck of the budding vesicle might lead to the closing of the neck and spontaneous membrane fission (33). In contrast to these structures observed *in vitro*, CHMP4B overexpression in cultured cells led to its assembly into circular filaments at the plasma membrane. Membrane tubes of unknown composition were emanating from the plasma membrane when CHMP4B was overexpressed together with catalytically inactive VPS4 (34). Recent evidence from HIV-1 budding suggests that although CHMP4 isoforms assemble within the neck, they do not suffice to induce membrane fission in the absence of CHMP2A or -B. This suggests that CHMP2 may be the minimal fission machinery (26) requiring VPS4 to catalyze fission and virion release (35), consistent with the sequential recruitment of ESCRTs and VPS4 to the HIV-1 budding site (36).

Here, we report that down-regulating VPS4 leads to accumulation of endogenous CHMP2B at the plasma membrane, indicating its presence in ESCRT-III complexes formed transiently at the plasma membrane. When overexpressed, CHMP2B is recruited to the plasma membrane, where it forms long protrusions, partly depending on its capacity to bind VPS4. The capacity of CHMP2B to make plasma membrane protrusions is not shared by other CHMPs, and neither CHMP2A, CHMP3, nor CHMP4 isoforms colocalize with CHMP2B inside tubes. However, CHMP4A and -B tend to relocalize at the base of CHMP2B tubes. Cryo-electron microscopy of membrane tubes shed into the cell culture supernatant demonstrates that CHMP2B polymerizes into a tightly packed helical polymer intimately associated with the inner leaflet of the bilayer. Our results show for the first time that CHMP proteins can form tightly packed helical structures *in vivo* that associate with cellular membranes. Second, such structures vary in diameter to induce membrane constriction, which indirectly supports the dome model for membrane fission (33). Finally, our data demonstrate that in mammalian cells, CHMP2B is not only an adaptor protein for the recruitment of VPS4 as demonstrated in

yeast but also directly plays a structural role in membrane scaffolding.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### DNA Construct

The wild-type human CHMPs (2A, 3, 4A, 4B, and 4C) cDNAs were cloned from HeLa cells by RT-PCR, in frame with a C-terminal FLAG inserted into reverse primers (supplemental Table S1). CHMP2B, CHMP2B<sup>mutant</sup>-FLAG, and CHMP2B-FLAG, CHMP2B<sup>L207D/L210D</sup>-FLAG and CHMP2B<sup>L4D/F5D</sup>-FLAG were generated by PCR using plasmids containing HA-CHMP2B or GFP-VPS4B as templates, introducing Stop codon or point mutations inside primers where needed. (All PCR primers used in this study are described in supplemental Table S1.) PCR fragments were inserted into the pcDNA3.1 vector using a TOPO directional cloning kit (Invitrogen).

For expression in bacteria, cDNA fragments derived from human full-length CHMP2B (wt CHMP2B and mutant L4D/F5D), were subcloned in frame with a C-terminal His<sub>6</sub> tag into the expression vector pETM-13, using NcoI and XhoI. Proteins were produced in *Escherichia coli* strain BL21 codon plus (Invitrogen).

GPF-AMSH was a generous gift from Sylvie Urbé. pCaggs GFP-VPS4B and pCaggs GFP-VPS4<sup>E235Q</sup> were described previously (37).

### Reagents and Antibodies

Polyclonal antibodies against the C-terminal part of CHMP2B were purchased from Abcam (ab33174). Polyclonal anti-CHMP4A (H-52) and CHMP4B (C-12) were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Polyclonal anti-CHMP4B (ab105767) was from Abcam. Polyclonal antibodies against VPS4A and B were a kind gift from W. I. Sundquist (University of Utah). Monoclonal and polyclonal anti-FLAG antibodies were obtained from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal antibody against  $\beta$ -tubulin was a generous gift from A. Andrieux (Inserm U836, Grenoble, France). Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, Alexa 594-WGA, and Texas Red-X-phalloidin were obtained from Molecular Probe.

### Cell Cultures and Transfections

For immunofluorescence, HeLa cells were seeded onto sterile glass coverslips in six-well plates ( $10^5$  cells per well) in DMEM (Invitrogen) containing 10% FBS (Sigma), and 2 mM L-glutamine (Sigma). Cells were transfected 24 h later with 1  $\mu$ g of DNA and 6  $\mu$ l of jetPEI transfection reagent (Polyplus) and mixed in a final volume of 200  $\mu$ l of 150 mM NaCl. For cotransfection, 1  $\mu$ g of CHMP2B containing plasmid was mixed with 500 ng of plasmids encoding the other proteins. Cells were fixed and processed for immunostaining 24 or 36 h after transfection. For actin destabilization, cells were incubated 1 h with 1  $\mu$ M cytochalasin D or with 0.2 mg/ml latrunculin A (Sigma).

### siRNA Transfection

HeLa cells transfected with a mixture containing 10 nM of each of the previously described siRNA duplexes (17) (VPS4A, CCGAGAAGCUGAAGGAUUAtt; VPS4B, CCAAAGAAGC-

## Plasma Membrane Deformation by CHMP2B

ACUGAAAGAtt) using Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen). Cells were transfected again after 24 h and fixed 24 h later. Control cells were transfected with 20 nM of siRNA duplexes against LucGL2 (CGUACGCGGAAUACUUCGAtt). The extent of down-regulation was estimated by Western blot analysis of cell lysates.

### Western Immunoblotting

Cells were lysed in radioimmune precipitation assay buffer containing protease inhibitors (Complete, Roche Molecular). Proteins (20  $\mu$ g of total protein per lane) were separated on SDS-polyacrylamide gels (10%) and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

### Immunofluorescence

Cells were fixed and immunostained as described in Ref. 39. In brief, cells were fixed with 4% paraformaldehyde. After three washes in PBS, cells were permeabilized with PBS containing 0.5% Triton X-100 in blocking solution (PBS containing 5% goat pre-immune serum) for 30 min. Primary antibodies diluted in blocking solution were then incubated for 1 h. After washing in PBS, cells were incubated for 1 h with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 594-WGA, or Alexa Fluor 488-phalloidin. After three washes in PBS, coverslips were rinsed in water and mounted in Mowiol.

For staining of F-actin, Texas Red-X phalloidin was incubated together with the secondary antibodies. For delineating cellular membranes, live cells were washed in HBSS, incubated 10 min at 4 °C with Alexa Fluor 494-WGA (5  $\mu$ g/ml in Hank's Buffered salt solution) and washed in PBS before fixation.

### Liposome Flotation Assay

Liposomes were made of synthetic 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine from Avanti Polar Lipids. Lipids were mixed homogeneously in chloroform to achieve a 8:2 molar ratio. Dried thin lipid films were obtained by evaporation. Lipids were hydrated in 20 mM HEPES, pH 7, to a final concentration of 2.5 mg/ml. The translucent solution was then extruded 15 times through a 200-nm polycarbonate membrane (Avanti Polar Lipids). The average diameter of the liposomes was estimated to range between 200 to 400 nm by dynamic light scattering measurement and electron microscopy.

Proteins and large unilamellar vesicles were incubated overnight. The solution was mixed with an equal volume of 80% (w/v) sucrose in 20 mM HEPES, pH 7, resulting in a final sucrose concentration of 40% (w/v) with a final large unilamellar vesicle concentration of 0.625 mg/ml. 300  $\mu$ l of this solution was overlaid with 100  $\mu$ l of 30, 20, and 10% (w/v) sucrose in no-salt buffer. The gradient was then subjected to ultracentrifugation at 190,000  $\times g$  for 6 h at 4 °C. After ultracentrifugation, gradients were separated into seven fractions. Sucrose concentration of each fraction was determined by refractometry; one-third of each fraction was analyzed by SDS-PAGE.

### Confocal Microscopy

Images of fluorescent cells were acquired with a Zeiss LSM-710 laser scanning confocal microscope with a 63 $\times$  Plan-Apo-

chromat objective (numerical aperture 1.4). Laser power was adjusted to maximize the dynamic range of each sample. For dual-color samples, the adjustable spectral window of fluorescence collection was set for each channel with a singly colored control sample, so that cross-contamination between channels was avoided.

Because CHMP2B tubes protrude out of the cell in a large Z range, stacks of optical sections were acquired with the required electronic magnification. Image files were processed with ImageJ software. Except when mentioned, images represent maximum intensity projections.

### CHMP2B Tube Purification

For isolation of CHMP2B tubes, HeLa cells were seeded in 10-cm culture dishes ( $\sim 10^6$  cells/well). The culture medium was the same as mentioned above, except that FBS was previously cleared by 60,000  $\times g$  centrifugation to remove potential contaminants. Cells were transfected 24 h later with 3  $\mu$ g of DNA and 18  $\mu$ l of jetPEI transfection reagent (Polyplus transfection) and mixed in a final volume of 600  $\mu$ l of 150 mM NaCl. Culture media harvested 36 h after transfection were centrifuged twice at 300  $\times g$  for 5 min to remove debris and then at 30,000  $\times g$  (1 h) to pellet membranes. The resulting pellet (P1) was washed once with HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4), resuspended and incubated for 30 min at 4 °C in HBS containing 1 mM AMPpP<sup>6</sup> (Sigma), Complete<sup>TM</sup> protease inhibitor (Roche Applied Science), and 1% Triton X-100. Half of this suspension was centrifuged at 20,000  $\times g$  for 30 min, and the pellet (P2) was resuspended in the same volume as S2. Identical volumes of P1, S2, and P2 were analyzed by Western blot together with the cell lysate (20  $\mu$ g of proteins estimated using BCA protein assay reagent (Pierce)).

### Electron Microscopy

**Immuno-EM Analysis of CHMP2b-expressing Cells**—Cells were fixed with 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, during 2 h. Cells were then gently detached using a cell scraper, centrifuged at 1200 rpm during 5 min and embedded in 10% gelatin. The cell pellet was then cut into 1 mm<sup>3</sup> pieces. These samples were cryoprotected during 4 h in 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Ultrathin cryosections of 40 nm were made at  $-120$  °C using an ultra-cryo-microtome (Leica-Reichert) and retrieved with a 1:1 solution of 2.3 M sucrose and 2% methylcellulose according to the Tokuyasu protocol (40). Cryosections were first incubated with primary polyclonal anti-FLAG antibody (Sigma) and revealed with protein A-gold conjugate (cell microscopy center, Utrecht, The Netherlands). Double immunogold labeling was performed sequentially using 15-nm protein A gold to recognize anti-CHMP4A and 10-nm protein A gold to detect CHMP2B. Labeled cryosections were viewed at 80 kV with a 1200EX JEOL TEM microscope, and images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus).

<sup>6</sup> The abbreviations used are: AMPpP, 5'-adenylyl- $\beta$ , $\gamma$ -imidodiphosphate; MIM, MIT domain-interacting motif; MIT, Microtubule Interacting and Transport domain; VPS4, Vacuolar Protein Sorting homolog 4; AMSH, Associated Molecule with the Src homology domain of STAM; WGA, Wheat Germ Agglutinin.

**Negative Staining**—P1 pellet obtained from the culture media of ten 100-mm dishes of HeLa cells transfected with CHMP2B-FLAG were resuspended in 80  $\mu$ l of HBS. 6  $\mu$ l of this sample was incubated during 10 min on an EM grid coated with Formvar and carbon. Grids were then quickly blotted and washed three times in water before staining with 1% uranyl acetate during 1 min, followed by blotting to remove excess liquid. For immunolabeling, samples were permeabilized with Triton X-100 1% during 20 min, and labeling was performed after extensive washing with water using an anti-CHMP2B antibody against the whole protein. Protein A gold (Cell Microscopy Center, Utrecht, The Netherlands) was used to reveal the antibody. Finally, grids were stained with 1% uranyl acetate, pH 4, during 1 min. Grids were viewed under a transmission electron microscope (JEOL 1200EX), and images were acquired with a digital camera (Veleta, Soft Imaging Solutions, Olympus).

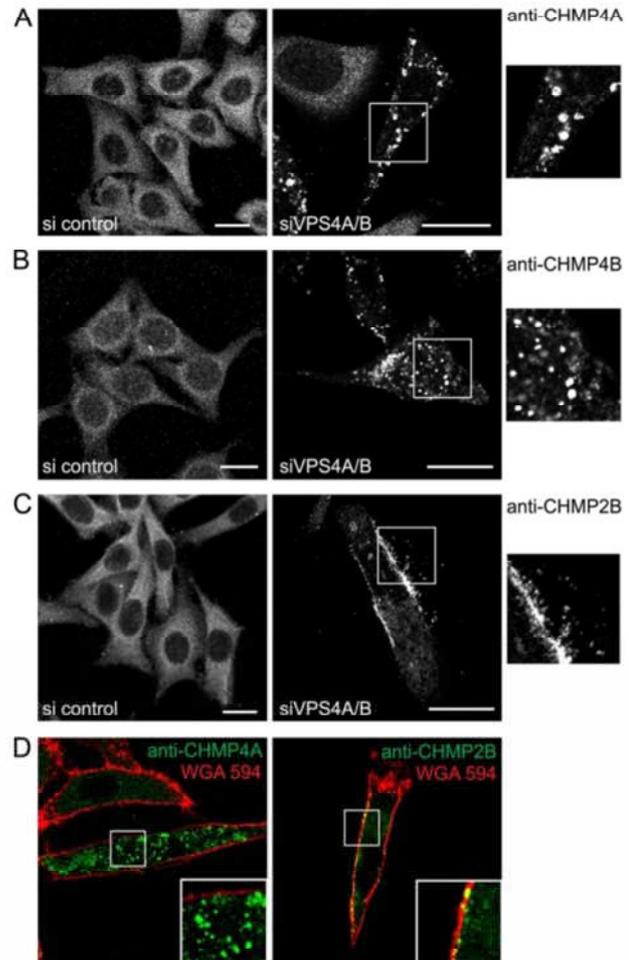
**Cryo-EM**—P1 pellets obtained from the culture medium of thirty 100-mm dishes were resuspended in 40  $\mu$ l of HBS. 4 ml of sample were loaded onto a Quantifoil R2/1 holey grid (Quantifoil Micro Tools GmbH), blotted for 1–2 s to remove the excess liquid, and then rapidly plunged into liquid ethane cooled using liquid nitrogen. The frozen grid was transferred into an FEI Tecnai Polara electron microscope. Images were taken under low dose conditions at 300 kV ( $<10 e^-/\text{\AA}^2$ ) and with a nominal magnification of 45,000 and a defocus between 2 and 3  $\mu$ m using a CCD camera (GATAN Ultrascan 4000).

**Two-dimensional Average**—Two-dimensional averaging of particles was performed by selecting a total of 35 boxes (900  $\times$  900 pixels) equally spaced along one tube using the x3d program (41) and averaging them together after cross-correlation using SPIDER (42).

## RESULTS

**CHMP2B Localizes to Plasma Membrane upon VPS4 Knockdown**—Immunostaining of CHMP4A, -B, and -2B revealed that all endogenous proteins were distributed homogeneously throughout the cytoplasm. siRNA knockdowns of VPS4A and VPS4B (supplemental Fig. S2A) led to a relocalization of cytosolic CHMP4A and CHMP4B to intracellular patches, possibly reflecting their accumulation at the surface of endosomes (Fig. 1, A and B). In contrast, similar depletion of VPS4 led to relocalization of endogenous CHMP2B from the cytoplasm into patches, which were associated with the plasma membrane in some cells (Fig. 1, C and D, and supplemental Fig. S2B). This suggests that VPS4 is required to dissociate plasma membrane-based ESCRT-III complexes containing CHMP2B and thus intimately controls ESCRT-III activity at the plasma membrane.

**Expression of Wild-type CHMP2B Induces Cell Surface Protrusions**—Overexpressed CHMP2B was distributed homogeneously throughout the cytoplasm. However, in 10% of cells, the cytoplasmic staining was partially or entirely lost, and CHMP2B was relocated to the plasma membranes, producing long protrusions pointing out into the culture medium (Fig. 2A). Some protrusions had a length of up to several tens of microns. Fusion of a FLAG peptide to the C-terminal part of CHMP2B increased the capacity of the protein to assemble into

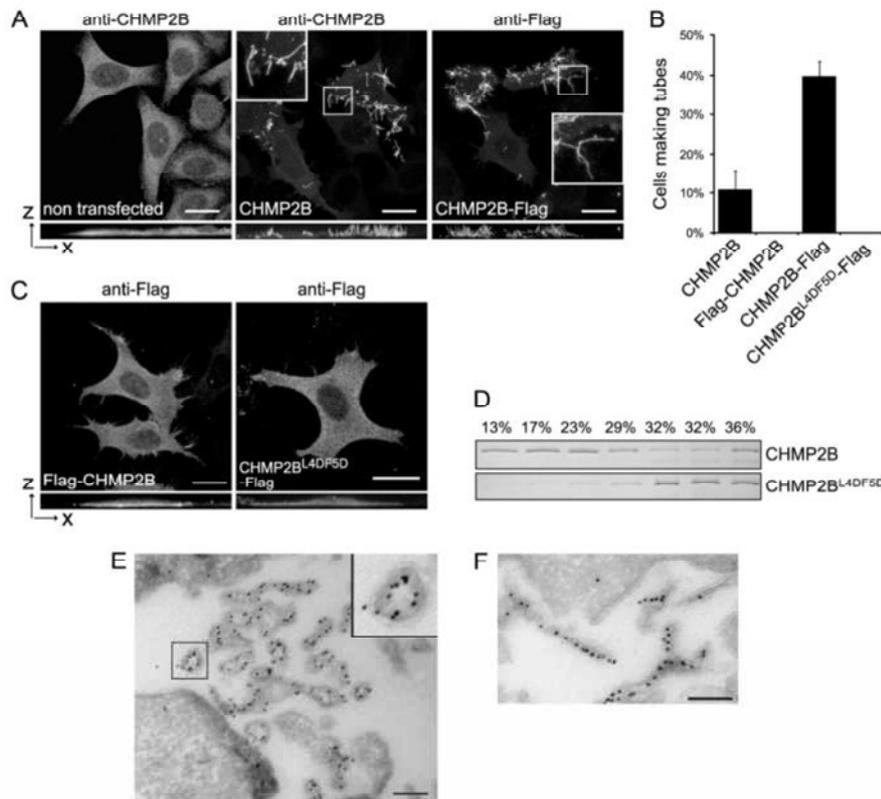


**FIGURE 1. VPS4A and -B down-regulation induces plasma membrane accumulation of endogenous CHMP2B.** HeLa cells were depleted of VPS4A and VPS4B using a mixture of siRNA against both proteins (right panels). Control cells were transfected with an irrelevant siRNA (left panels). The confocal section of control cells or of cells depleted of VPS4 was immunostained with antibodies against CHMP4A (A), CHMP4B (B), or CHMP2B (C). Enlargements of the boxed regions are shown on the right. D, confocal sections of VPS4-depleted cells treated with Alexa Fluor 594-WGA to delineate membranes. Cells were immunostained using anti-CHMP4A (left panel) or anti-CHMP2B (right panel). Scale bars, 20  $\mu$ m.

surface protrusions, which were detected in  $\sim$ 40% of CHMP2B-FLAG-positive cells (Fig. 2, A and B). Projection in the x-z plane (Fig. 2A) and three-dimensional reconstruction (supplemental Movies S1 and S2) of cells expressing CHMP2B or CHMP2B-FLAG show that the tubes protrude on the sides and above the cell and are rarely attached to the cell culture substrate. In some cases, however, CHMP2B protrusions detached from the cell surface were observed lying on the cell culture substrate.

Immunoelectron microscopy of CHMP2B-FLAG-expressing cells demonstrated the presence of tubular, electron dense structures covered by a single membrane (Fig. 2, E and F). The hollow electron dense structures were labeled with FLAG antibodies, revealing the presence of CHMP2B along the entire length of the tubes (Fig. 2F). In tube cross-sections, FLAG

## Plasma Membrane Deformation by CHMP2B



**FIGURE 2. Overexpression of CHMP2B or CHMP2B-FLAG induces formation of long cell surface protrusions in which they concentrate.** HeLa cells were transfected with the indicated plasmids and immunostained 36 h later. Except otherwise stated, photographs presented in all figures are maximal intensity projections of confocal image stacks. In *A* and *C*, bottom panels represent projections in the *x-z* plane. Bars, 20  $\mu$ m. *A*, CHMP2B immunostaining of cells transfected with the empty vector reveals a homogeneous cytoplasmic localization of the protein. Overexpression of CHMP2B and CHMP2B-FLAG induces the formation of cell surface protrusions in which CHMP2B concentrates. Note the absence of cytoplasmic staining in tube forming cells. *B*, percentage of transfected cells displaying tubes as revealed with anti-CHMP2B antibodies. For each condition, 200 CHMP2B-expressing cells were counted. Data from three independent experiments are plotted. Standard error bars are shown. *C*, FLAG-CHMP2B and CHMP2B<sup>L4D/F5D</sup>-FLAG do not induce surface protrusions. *D*, flotation experiments demonstrate that mutations in Leu-4–Phe-5 impair the capacity of CHMP2B to associate with membranes *in vitro*. Purified recombinant full-length CHMP2B and CHMP2B<sup>L4D/F5D</sup> were mixed with liposomes. Liposomes were floated on a sucrose gradient, fractions were run on SDS-PAGE, and proteins were revealed by Coomassie staining. *E* and *F*, FLAG immunogold labeling of cells overexpressing CHMP2B-FLAG. Cross-sections of tubes reveal the presence of the C-terminal FLAG lining the lumen of a hollow, electron-dense structure closely associated with the membrane of tubes; longitudinal sections reveal the presence of CHMP2B along the entire length of the tubes. Scale bars, 200 nm.

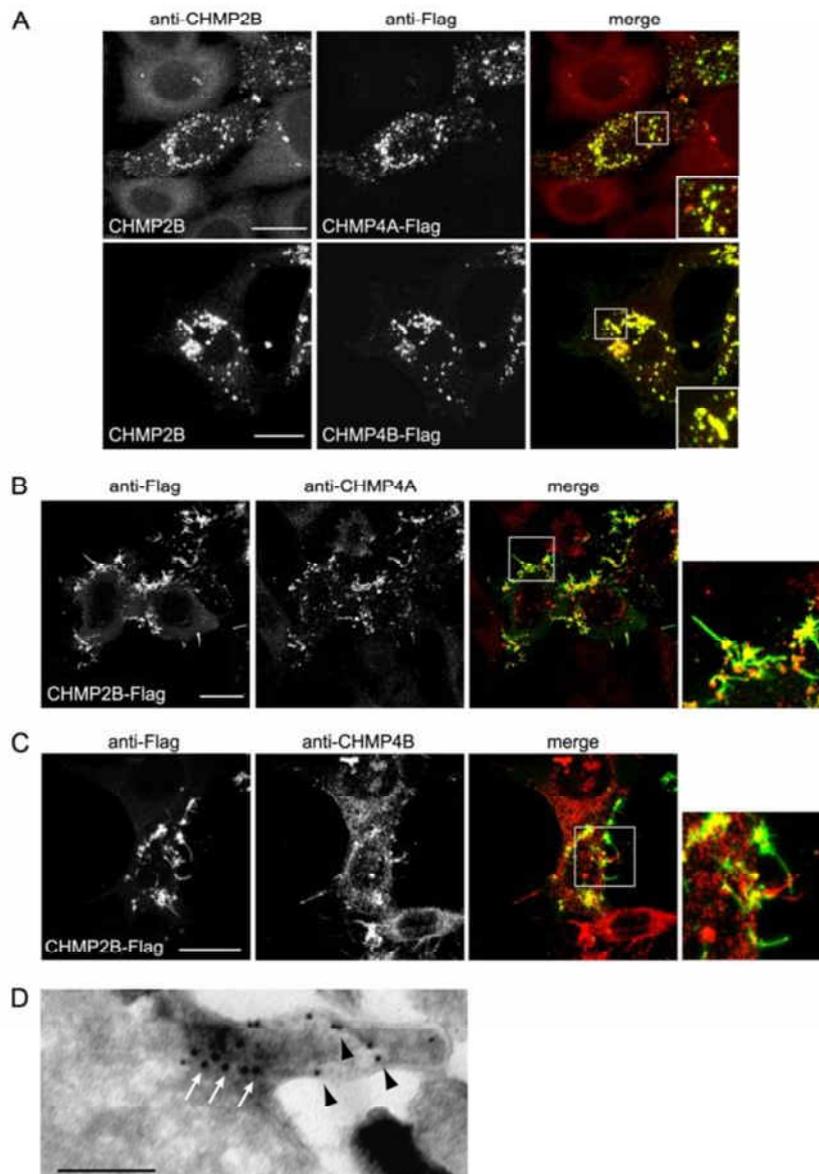
immunolabeling was seen in the lumen of the tubes indicating that the C-terminal part of CHMP2B points toward the interior of the tubular structure (Fig. 2*E*).

Expression of CHMP2B also induced the formation of tubes in HEK 293T cells (data not shown). CHMP2B expressed in post-mitotic neurons also deformed the membrane into protrusions in which it accumulates (supplemental Fig. S3*A*). This demonstrates that CHMP2B protrusions do not result from cell retraction occurring during cell migration or division.

**N-terminal End of CHMP2B Is Required to Deform Plasma Membrane**—In contrast to CHMP2B-FLAG and wild-type CHMP2B, N-terminally FLAG-tagged CHMP2B (FLAG-CHMP2B) remained cytoplasmic and failed to induce growth of surface protrusions (Fig. 2, *B* and *C*). Similarly, an HA tag fused to the N terminus blocked the capacity of CHMP2B to induce membrane tubulation (data not shown). Western blot analysis showed similar levels of expression of CHMP2B, FLAG-

CHMP2B, or CHMP2B-Flag (supplemental Fig. S3*B*), demonstrating that the inability of N-terminally tagged versions of CHMP2B to induce tubule formation is not due to differences in their expression level.

Based on these observations, we reasoned that the N-terminal part of the protein might be crucial for deforming membranes. The CHMP2B N-terminal eight amino acids are conserved throughout the CHMP family. In particular Leu-4 and Phe-5 of CHMP2B, followed by a cluster of positively charged residues (Lys and Arg) are conserved within all CHMPs (supplemental Fig. S1*B*). Expression of the double mutant L4D/F5D (CHMP2B<sup>L4D/F5D</sup>-FLAG) did not deform the plasma membrane into protrusions (Fig. 2, *B* and *C*). To test whether these mutations affect membrane binding, a liposome flotation assay was employed using purified recombinant CHMP2B and CHMP2B<sup>L4D/F5D</sup>. The presence of CHMP2B in the upper fractions demonstrated the capacity of the protein to interact with liposomes (Fig. 2*D*). In contrast, most CHMP2B<sup>L4D/F5D</sup> stayed



**FIGURE 3. Relationship between CHMP4- and CHMP2B-induced protrusions.** HeLa cells were transfected with the indicated plasmids and immunostained 36 h later. *A*, CHMP4A-FLAG or CHMP4B-FLAG, co-expressed with similar amounts of CHMP2B, block the capacity of CHMP2B to form protrusions. Note that the relocalization of CHMP2B inside CHMP4A or CHMP4B patches. In cells expressing CHMP2B-FLAG only, immunostaining with anti-CHMP4A (*B*) or anti-CHMP4B (*C*) antibodies reveals the relocalization of endogenous CHMP4A and CHMP4B at the base of CHMP2B tubes. The *right panels* show enlargement of the boxed regions in the *merged panels*. In all cases, *scale bars* are 20  $\mu\text{m}$ . *D*, double immunogold labeling of a tube emanating from a cell overexpressing CHMP2B-FLAG. Anti-FLAG staining (10-nm beads, *black arrowheads*) reveals the presence of CHMP2B along the entire length of the tube; anti-CHMP4A (15-nm beads, *white arrows*) reveals CHMP4A labeling restricted at the base of the tube. *Scale bars*, 200 nm.

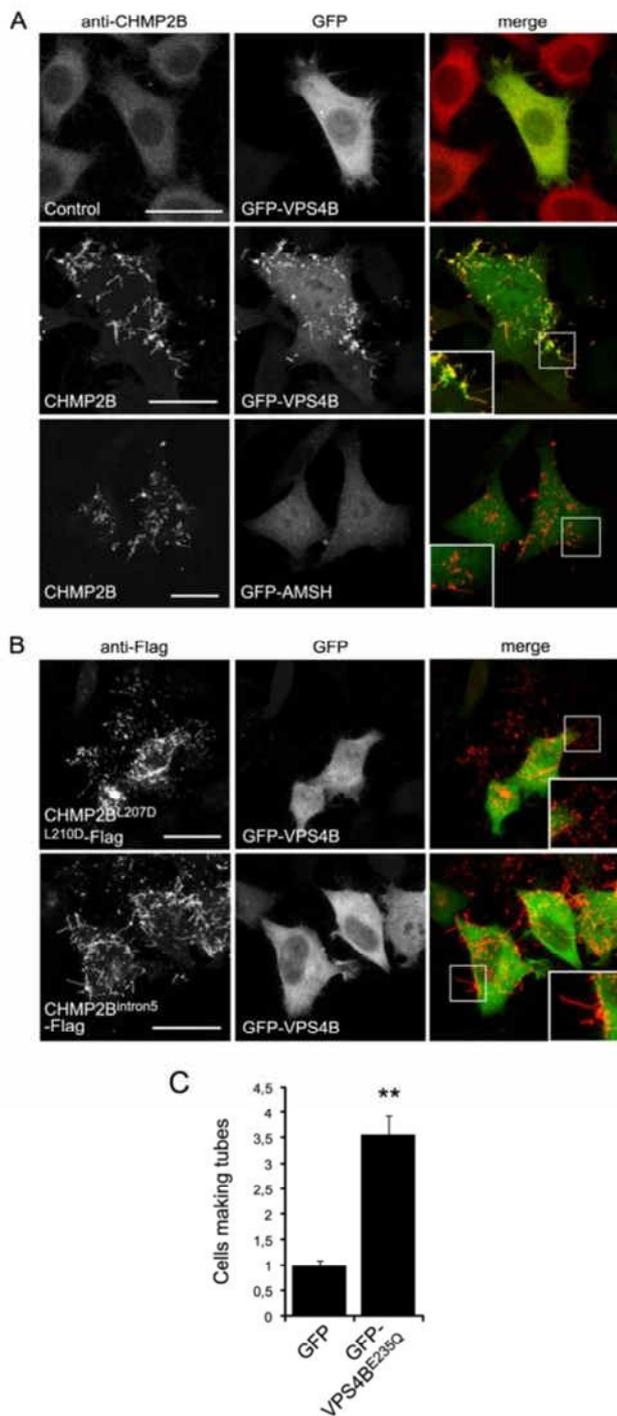
in the bottom fraction, demonstrating that the L4D/F5D mutation impairs CHMP2B lipid bilayer interaction *in vitro*. These data confirm the requirement of an intact N terminus for CHMP2B function.

**Co-expression of CHMP4 with CHMP2B Affects Capacity of CHMP2B to Induce Membrane Tubulation**—Because formation of CHMP2B cell protrusions depends on an intact N terminus, we re-examined the expression of C-terminally FLAG-tagged CHMP2A, CHMP3, and the CHMP4A, -B, and -C isoforms. None of these induced membrane protrusions when expressed alone.

Although CHMP2A and CHMP3 polymerize into tubes *in vitro*, no such structures could be observed *in vivo* upon co-expression of CHMP2A-FLAG and CHMP3-FLAG (data not shown).

CHMP4 co-expressed with CHMP2B abolished CHMP2B protrusions and led to relocalization of CHMP2B to CHMP4-containing structures (Fig. 3*A*). In contrast, neither CHMP2A nor CHMP3 abolished formation of CHMP2B protrusions (data not shown). These observations thus suggest that CHMP4 isoforms regulate the capacity of CHMP2B to polymerize and deform the plasma membrane.

## Plasma Membrane Deformation by CHMP2B



**FIGURE 4. Relationship between VPS4 and CHMP2B protrusions.** HeLa cells were co-transfected with the indicated plasmids and observed 36 h later. **A**, in cells transfected with the control plasmid together with GFP-VPS4, VPS4 is distributed homogeneously in the cytoplasm. In cells expressing both GFP-VPS4B and CHMP2B, VPS4 is mainly present in CHMP2B tubes. In contrast, AMSH is not recruited in CHMP2B protrusions made by cells expressing both GFP-AMSH and CHMP2B. **B**, CHMP2B<sup>L207D/L210D</sup>-FLAG, mutated in the MIM domain, accumulates in plasma membrane patches but does not induce protrusions. CHMP2B<sup>intron5</sup>, which lacks the C-terminal  $\alpha 6$  helix containing the MIM domain, forms everted tubes. GFP-VPS4 is recruited neither in CHMP2B<sup>L207D/L210D</sup>-FLAG patches nor in CHMP2B<sup>intron5</sup>-FLAG containing

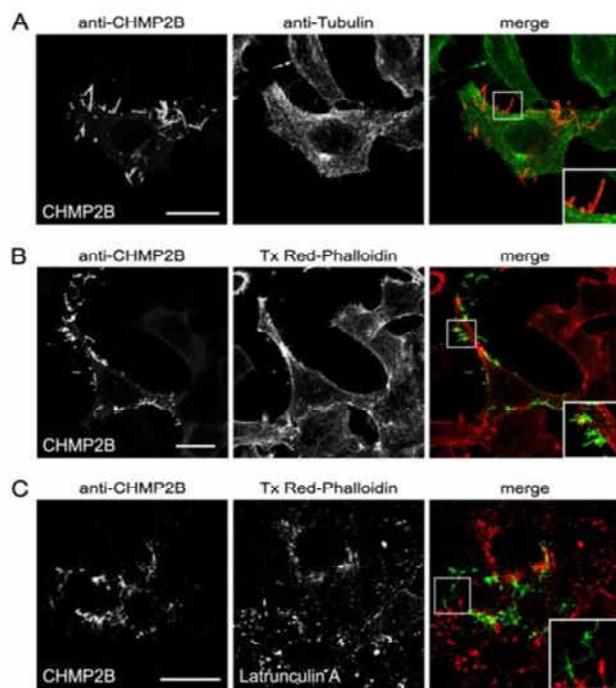
Immunostaining with antibodies against CHMP4A and CHMP4B of CHMP2B-overexpressing cells revealed that the endogenous proteins were both recruited at the base of CHMP2B protrusions (Fig. 3, *B* and *C*). This localization was confirmed using double immunogold labeling of CHMP2B-FLAG expressing cells with anti-FLAG and anti-CHMP4A antibodies: CHMP4A was confined to a dense core material at the base of the tube whereas CHMP2B was distributed along the entire length (Fig. 3*D*).

**CHMP2B Membrane Tube Formation Is Regulated by VPS4**—The C-terminal MIT domain-interacting motif (MIM) of CHMP2B recruits the ATPase VPS4 (9). Accordingly, we found that GFP-VPS4B decorated the entire length of CHMP2B-containing protrusions (Fig. 4*A*). In contrast, the ubiquitin hydrolase GFP-AMSH, which binds to the MIMs of CHMP1A, -B, -2A, and -3 but not that of CHMP2B (28, 43) was absent from CHMP2B protrusions (Fig. 4*A*). This further indicates that none of these proteins take part in the making of CHMP2B protrusions.

We next tested whether VPS4 binding to CHMP2B is necessary for its membrane tubulating activity. Here, we used a CHMP2B double mutation L207D/L210D (CHMP2B<sup>L207D/L210D</sup>-FLAG), which impairs VPS4B recruitment (supplemental Fig. S1) (9). CHMP2B<sup>L207D/L210D</sup>-FLAG did not co-localize with GFP-VPS4B, confirming its inability to bind the ATPase (Fig. 4*B*). Unexpectedly, CHMP2B<sup>L207D/L210D</sup>-FLAG was concentrated inside patches but almost never induced tube formation. This observation suggests that VPS4 is required for the formation or integrity of CHMP2B tubes. However, a CHMP2B mutant (CHMP2B<sup>intron5</sup>), which lacks part of the C terminus, including the MIM domain, formed patches at the plasma membrane like CHMP2B<sup>L207D/L210D</sup>-FLAG but nevertheless polymerized efficiently into membrane tubes (Fig. 4*B*). GFP-VPS4B was not detected inside tubes made of CHMP2B<sup>intron5</sup>-FLAG. We conclude that interaction of VPS4 to the C-terminal MIM domain is required for full-length CHMP2B to form membrane tubes. This was further supported by the fact that co-expressing catalytically inactive VPS4B (VPS4<sup>E235Q</sup>) with CHMP2B, strikingly increased the number of cells making tubes compared with cells expressing CHMP2B only (Fig. 4*C*). The requirement for the VPS4-CHMP2B interaction can be overcome by deletion of the C-terminal part, which is thought to release autoinhibition as in the case of CHMP2B<sup>intron5</sup>. Thus, VPS4 interaction might be necessary to release the autoinhibition in full-length CHMP2B, a process that is required to induce CHMP membrane association and polymerization. However, it is not necessary to form or maintain the structures of the protrusions.

**Relationship between CHMP2B and Actors of Membrane Deformation**—Classically, actin and tubulin underlie plasma membrane protrusions. No immunostaining of  $\beta$ -tubulin was detected inside CHMP2B tubes (Fig. 5*A*). Absence of microtu-

tubes. **C**, the catalytically inactive form of VPS4B (GFP-VPS4B<sup>E235Q</sup>) increases the proportion of cells displaying CHMP2B protrusions: HeLa cells were transfected with CHMP2B together with GFP-VPS4B<sup>E235Q</sup> and observed 24 h later. For each condition, 200 cells from three independent experiments were counted. Standard error bars are shown. Mann-Whitney statistical analysis was used ( $p < 0.0011$ ). Scale bars, 20  $\mu$ m. \*\*,  $p < 0.0011$ .



**FIGURE 5. HeLa cells CHMP2B protrusions do not contain actin or tubulin.** Immunostaining with anti- $\beta$ -tubulin antibody (A) and staining with Texas Red (Tx Red)-phalloidin (B) of HeLa cells overexpressing CHMP2B demonstrate the absence of tubulin and F-actin in CHMP2B tubes. C, latrunculin A treatment (0.1  $\mu$ g/ml; 60 min) induces depolymerization of actin but does not collapse CHMP2B tubes.

bules inside CHMP2B protrusions was also obvious from electron microscopy data (Fig. 2E). Thus, CHMP2B-induced protrusions are not related to microvilli or other protrusions made by microtubules.

F-actin stained by phalloidin was almost never present inside CHMP2B protrusions, demonstrating that it is not necessary to keep them intact (Fig. 5B). The lack of a structural role of actin for maintaining CHMP2B protrusions was confirmed by the fact that latrunculin A (Fig. 5C) or cytochalasin D (data not shown), which dramatically disrupted the actin cytoskeleton, did not affect their integrity. Our observations thus demonstrate that CHMP2B assembly can scaffold plasma membrane tubes independently of actin and tubulin.

**Membrane Tubes Made of CHMP2B Are Resistant to Detergent**—Because CHMP2B protrusions are often found shed from HeLa cells, we collected them from the culture medium of CHMP2B-expressing cells. After low speed centrifugation, media were centrifuged at  $30,000 \times g$ . The pelleted material (P1) was solubilized in 1% Triton X-100 and centrifuged at  $20,000 \times g$  (P2 and S2). Western blot analysis demonstrated the presence of large amounts of CHMP2B in the P1 pellets, the vast majority remaining insoluble in Triton X-100 (Fig. 6A). This is in good agreement with the known resistance of ESCRT-III complexes to non-ionic detergents. No CHMP2B immunopositive material was recovered from P1 or P2 pellets prepared from cell supernatants of cells transfected with CHMP2B<sup>LAD/F5D-FLAG</sup> in accordance with the inability of the mutant to make tubes.

EM examination of P1 pellets negatively stained with uranyl acetate demonstrated the presence of numerous rigid tubes surrounded by plasma membrane (data not shown). Their diameter ranged from 70 to 350 nm. No such tubes could be seen in similar supernatants of untransfected cells. Immunogold labeling performed after permeabilization revealed the presence of CHMP2B along the entire length of the tubes (Fig. 6B).

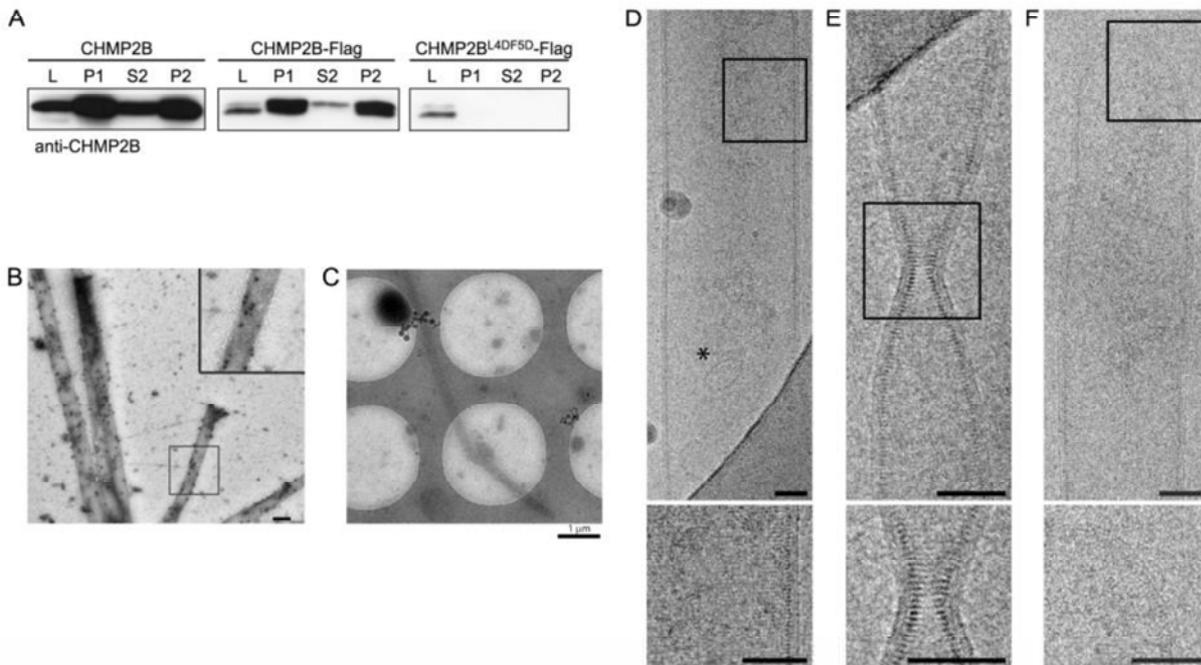
**Cryo-EM Observation Reveals CHMP2B Polymerized into Tightly Packed Helical Structure**—We next observed CHMP2B tubes present in P1 pellets using cryo-EM to better characterize their structure (Fig. 6, C–F, and supplemental Fig. S4). In these conditions, the diameter of the tubes ranged from 100 to 400 nm. Regular striations perpendicular to the longitudinal axis of the tube could be revealed. The hollow nature of the tubes was demonstrated as they were sometimes filled with small vesicles (Fig. 6D). Regardless of the diameter of the tubes, the striations of CHMP2B tubes were regular (Fig. 6, D–F, and supplemental Fig. S4) and spaced by a 32 Å gap as determined by Fourier transform of an image, indicating a helical structure with a pitch of 32 Å (supplemental Fig. S4). The CHMP2B protein lattice was tightly linked to the internal leaflet of the membrane derived from the plasma membrane. In some cases, the tube was constricted for example from a diameter of  $\sim 80$  to  $\sim 16$  nm. Because the lateral striation remains well visible, constriction is most likely induced by gradually reducing the number of CHMP protomers per helical turn (Fig. 6E). Sometimes tubes had a succession of two uniform segments with different diameters (data not shown) or presented closed ends with continuous membrane (Fig. 6F and supplemental Fig. S4). These analyses show that CHMP2B assembles into a helical polymer to deform the membrane into tubes with variable diameters.

## DISCUSSION

ESCRT-III catalyzes membrane budding and fission processes during Multi Vesicle Body biogenesis, cytokinesis, and enveloped virus budding (25, 44, 45). In yeast, sequential assembly of Vps20p (CHMP6), Snf7p (CHMP4), Vps24p (CHMP3), and Vps2p (CHMP2) is required for function, whereas SNF7p was suggested to constitute the driving force of membrane fission (6–8). The importance of Snf7 was further highlighted by giant unilamellar vesicles budding assays showing that vesicles can be released into the lumen of the giant unilamellar vesicles by yeast ESCRT-III Vps20p (CHMP6), Snf7p (CHMP4), and Vps24p (CHMP3) (15). However, the mammalian system might differ in that CHMP4 still plays a crucial role but requires in addition CHMP2 to catalyze membrane fission: although CHMP4 isoforms are recruited to the interior of the membrane neck of budding HIV-1 virions, virions are not released in the absence of both CHMP2 isoforms (26). Furthermore, VPS4 is recruited last and before virion release (35, 36). Similarly, CHMP4 in conjunction with CHMP2A have been implicated in constriction and membrane fission at the cytokinetic midbody (19, 26, 46). Thus, both CHMP4 and CHMP2 play important roles in HIV-1 release and cytokinesis.

Here, we show that overexpression of intact CHMP2B is sufficient to induce the formation of membrane tubes protruding from the cell surface. The capacity of CHMP2B to make cell

## Plasma Membrane Deformation by CHMP2B



**FIGURE 6. Characterization of tubes pelleted from culture media of CHMP2B-expressing cells.** *A*, Western blotting analysis using anti-CHMP2B of culture media of CHMP2B, CHMP2B-FLAG, and CHMP2B<sup>L40F50</sup>-FLAG expressing cells. *L*, cell lysates; *P1*, 30,000 × *g* pellet of culture media. *P2* and *S2*, *P1* pellets solubilized in 1% Triton X-100 were centrifuged at 20,000 × *g*: most of the CHMP2B-containing material present in culture media is resistant to detergent extraction. No CHMP2B pelletable material could be recovered from media of CHMP2B<sup>L40F50</sup>-FLAG-expressing cells. *B*, *P1* pellets of culture medium of CHMP2B-FLAG-expressing cells contain tubes made up of CHMP2B. *P1* pellets were fixed, permeabilized, and immunolabeled with anti-CHMP2B antibodies revealed by protein A gold (10 nm). *C–F*, cryo-EM analysis of *P1* pellets prepared from culture medium from CHMP2B-FLAG-expressing cells reveals the structure of CHMP2B tubes. *C*, low magnification shows tubes with a length reaching at least 8 μm. *D*, striations perpendicular to the longitudinal axis can be seen across the width of the tube. An asterisk indicates a 50-nm vesicle inside of the tube. *E*, constriction of a tube with no change in the helix pitch. *F*, dome closing one end of a tube. The inner leaflet of the membrane is closely associated with the CHMP2B protein lattice. Scale bars, 50 nm.

protrusions and to bind to membranes *in vitro* depends on an intact N-terminal end, suggesting that this domain participates in the regulation of the interaction between the lattice and the inner membrane leaflet. Even though membrane recruitment of and deformation by CHMP2B were easily observed in the present experiments, this property has escaped detection in previous studies. This can be explained by the fact that all the other studies used tagging of the protein at the N terminus, which clearly abolishes its capacity to form plasma membrane tubes.

Even if CHMP proteins vary extensively in their primary sequence, they share a common folded structure with an N-terminal basic domain interacting with the C-terminal acidic regulatory domain. Because CHMPs are cytosolic, they require an activation step to polymerize on membranes (12, 27–29). The autoinhibition is thought to be lifted by displacement of the C-terminal region from the N-terminal core, which subsequently permits polymerization at membranes. The fact that wild-type CHMP2B is able to form tubes indicates that the protein needs to be activated prior to polymerization at the plasma membrane. The AAA-ATPase VPS4 could be part of this activation through binding to the C-terminal MIM domain of CHMP2B, thus releasing autoinhibition. A similar mechanism has already been described for activation of CHMP3 by AMSH (28). Indeed, mutations in the VPS4 binding site of CHMP2B prevent membrane tube formation. Furthermore, co-expres-

sion with catalytically inactive VPS4B increases the propensity of CHMP2B to polymerize into tubes. In humans, dominant mutations in CHMP2B cause frontotemporal dementia (47–49). One mutation generates a distinct aberrant transcript, CHMP2B<sup>intron5</sup>, which encodes a protein lacking the α6 helix, thus rendering the protein constitutively active. CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant induces tube formation, demonstrating that the lack of VPS4 binding can be overcome by the absence of the C-terminal regulatory domain.

On the other hand, the ATPase activity of VPS4 is known to regulate the dissociation of ESCRT-III complexes (11, 13, 14). Accordingly, down-regulation of VPS4A and -B revealed the accumulation of cytoplasmic CHMP4A-containing ESCRT-III complexes. In contrast, the same down-regulation led to preferential accumulation of endogenous CHMP2B in plasma membrane patches. This suggests that ESCRT-III complexes forming transiently at the plasma membrane are major sites of CHMP2B polymerization. Altogether, our results suggest that VPS4 plays a dual regulatory role: binding to CHMP2B would structurally favor polymerization into tubes, whereas its ATPase activity depolymerizes plasma membrane ESCRT-III complexes. CHMP2B<sup>intron5</sup> polymerization would escape control by VPS4 potentially contributing to its pathogenic activity (39).

A remarkable finding was the recruitment of endogenous CHMP2B in VPS4 knocked down cells at the plasma mem-

brane, which correlates well with the fact that the overexpressed protein makes tubes only at the cell surface. This preferential recruitment of CHMP2B at the plasma membrane could explain our recent observation in neurons of its involvement in the shaping of dendritic spines, which are small protrusions corresponding to post synaptic parts of synapses (39). It is also in good agreement with the crucial role played by CHMP2s in HIV-1 virus egress (26).

None of the CHMPs tested so far, including the closest homolog CHMP2A, polymerized into tubes or copolymerized with CHMP2B on the plasma membrane, although they all tended to concentrate at their base. However, using co-transfection experiments, only CHMP4 isoforms had a drastic effect in blocking CHMP2B-tubulating activity. The dominant negative effect of CHMP4 on CHMP2B tube formation may be explained by sequestering of CHMP2B by the overexpressed CHMP4. On the other hand, the presence of CHMP4 at the base of the tubes suggests that it also plays a positive role in that it sets the stage for CHMP2B membrane polymerization. Similarly, CHMP2 isoforms have no effect on HIV-1 budding in the absence of CHMP4 isoforms consistent with the absence of CHMP2 in the membrane necks of budding virions in the absence of CHMP4 (26).

Recruitment of FLAG-CHMP4B at the plasma membrane has already been observed using "deep etched" electron microscopy. In this case, the protein polymerized into filaments, which self-associated into circular arrays underneath the plasma membrane (34). Expression of C-terminal deleted CHMP4A or -B or co-expression of the full-length protein together with an ATPase-dead version of VPS4 (VPS4B<sup>E235Q</sup>) led to the appearance of buds and tubes pointing out of the cells. The identity of the CHMPs making these hollow tubes was not defined, but our results open the possibility that they represent CHMP2B polymers.

Cryo-EM analyses of isolated membrane tubes demonstrated the presence of a protein lattice in close association with the inner leaflet of the tube membrane. Immunogold labeling indicates that the protein lattice is made of CHMP2B, confirming the immunofluorescence staining of CHMP2B along the entire length of cellular membrane tubes. The CHMP2B protein lattice present in the tubes displays a lateral striation that is produced by helical symmetry; thus, tube formation most likely followed the biophysical principle of membrane buckling as proposed for ESCRT-III polymer assembly (38). The pitch of the helix was determined by cryo-EM to be 32 Å. Furthermore, immunogold labeling revealed that the arrangement of CHMP2B within the helix must be such that the C-terminal part points inside the lumen. These characteristics have already been observed in the case of CHMP2A/CHMP3 tubular structures assembled *in vitro* in the absence of membranes (12), indicating common structural principles for CHMP polymerization. The CHMP2B tubes varied in diameter, and the CHMP2B lattice was able to constrict the membrane tube down to a diameter of 16 nm; furthermore, tube ends are closed and often reveal dome-like structures covered with continuous membrane. The induced membrane constriction and the observation of tubes with dome-like structural ends tightly covered by membrane indirectly support the following membrane fission

model: the building up of a dome-like CHMP protein lattice attracts and bends membranes sufficiently to induce neck thinning, leading to spontaneous membrane fission (33). Furthermore, our observations are in agreement with the tomography data that present spiral CHMP2A tubes at the cytoskeletal midbody with a diameter of 17 nm (46). Thus, both CHMP2A and CHMP2B can constrict membranes to narrow diameters. Because none of the other CHMPs have yet been shown to induce membrane constriction, it is tempting to speculate that CHMP2 polymers catalyze the final membrane fission step, as suggested for HIV-1 budding (26), by providing sufficient membrane bending energy that leads to close apposition of the membranes within the membrane neck of a virus or vesicle or within the midbody structure.

*Acknowledgments*—We acknowledge the support by the Grenoble Partnership for Structural Biology and the GIS-IBISA platform for access to the Polara microscope. We thank W.I. Sundquist and S. Urbé for generous gift of reagents, D. Béal for technical assistance, F. Hemming for critical reading of the manuscript and all members of the lab for helpful suggestions.

## REFERENCES

- Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B., and Emr, S. D. (2002) *Dev. Cell* **3**, 283–289
- Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., and Emr, S. D. (2002) *Dev. Cell* **3**, 271–282
- Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001) *Cell* **106**, 145–155
- Hurley, J. H. (2010) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 463–487
- Shestakova, A., Hanono, A., Drosner, S., Curtiss, M., Davies, B. A., Katzmann, D. J., and Babst, M. (2010) *Mol. Biol. Cell* **21**, 1059–1071
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S. D. (2008) *Dev. Cell* **15**, 578–589
- Teis, D., Saksena, S., Judson, B. L., and Emr, S. D. (2010) *EMBO J.* **29**, 871–883
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A. E., and Emr, S. D. (2009) *Cell* **136**, 97–109
- Stuchell-Brereton, M. D., Skalicky, J. J., Kieffer, C., Karren, M. A., Ghafarian, S., and Sundquist, W. I. (2007) *Nature* **449**, 740–744
- Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D. J., Perisic, O., Emr, S. D., and Williams, R. L. (2007) *Nature* **449**, 735–739
- Lin, Y., Kimpler, L. A., Naismith, T. V., Lauer, J. M., and Hanson, P. I. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 12799–12809
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H. G., and Weissenhorn, W. (2008) *Science* **321**, 1354–1357
- Babst, M., Sato, T. K., Banta, L. M., and Emr, S. D. (1997) *EMBO J.* **16**, 1820–1831
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J., and Emr, S. D. (1998) *EMBO J.* **17**, 2982–2993
- Wollert, T., and Hurley, J. H. (2010) *Nature* **464**, 864–869
- Carlton, J. G., and Martin-Serrano, J. (2007) *Science* **316**, 1908–1912
- Morita, E., Colf, L. A., Karren, M. A., Sandrin, V., Rodesch, C. K., and Sundquist, W. I. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12889–12894
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H. Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K., and Sundquist, W. I. (2007) *EMBO J.* **26**, 4215–4227
- Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T. A., Hurley, J. H., and Lippincott-Schwartz, J. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 4846–4851
- Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W. G., and Gottlinger, H. (2009) *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 181–184
- Demirov, D. G., and Freed, E. O. (2004) *Virus Res.* **106**, 87–102
- Morita, E., and Sundquist, W. I. (2004) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 395–425
- Bieniasz, P. D. (2009) *Cell Host Microbe* **5**, 550–558
- Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P. D. (2003) *J. Virol.* **77**,

## Plasma Membrane Deformation by CHMP2B

- 4794–4804
25. Martin-Serrano, J., and Neil, S. J. (2011) *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 519–531
  26. Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, L., and Sundquist, W. I. (2011) *Cell Host Microbe* **9**, 235–242
  27. Muziol, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R. B., Zamborlini, A., Usami, Y., Göttlinger, H., Weissenhorn, W. (2006) *Dev. Cell* **10**, 821–830
  28. Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S. R., Popova, E., Palu, G., and Göttlinger, H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 19140–19145
  29. Bajorek, M., Schubert, H. L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D. M., Stubblefield, W. M., Uter, N. T., Myszk, D. G., Hill, C. P., and Sundquist, W. I. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 754–762
  30. Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Gottlinger, H. G., Svergun, D. I., and Weissenhorn, W. (2008) *J. Mol. Biol.* **378**, 818–827
  31. Shim, S., Kimpler, L. A., and Hanson, P. I. (2007) *Traffic* **8**, 1068–1079
  32. Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., Boyer, V., Sadoul, R., Forest, E., Svergun, D. I., Göttlinger, H. G., and Weissenhorn, W. (2009) *Structure* **17**, 843–856
  33. Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J. D., Briggs, J. A., Weissenhorn, W., and Kozlov, M. M. (2009) *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000575
  34. Hanson, P. I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J. E. (2008) *J. Cell Biol.* **180**, 389–402
  35. Baumgärtel, V., Ivanchenko, S., Dupont, A., Sergeev, M., Wiseman, P. W., Kräusslich, H. G., Bräuchle, C., Müller, B., and Lamb, D. C. (2011) *Nat. Cell Biol.* **13**, 469–474
  36. Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P. D., and Simon, S. M. (2011) *Nat. Cell Biol.* **13**, 394–401
  37. Mahul-Mellier, A. L., Strappazon, F., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Béal, D., Torch, S., Hemming, F., Petiot, A., Verna, J. M., Fraboulet, S., and Sadoul, R. (2009) *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 200–203
  38. Lenz, M., Crow, D. J., and Joanny, J. F. (2009) *Phys. Rev. Lett.* **103**, 038101
  39. Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Bouron, A., Sadoul, R., and Goldberg, Y. (2010) *J. Cell Sci.* **123**, 2943–2954
  40. Liou, W., Geuze, H. J., and Slot, J. W. (1996) *Histochem. Cell Biol.* **106**, 41–58
  41. Conway, J. F., and Steven, A. C. (1999) *J. Struct. Biol.* **128**, 106–118
  42. Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadi, M., and Leith, A. (1996) *J. Struct. Biol.* **116**, 190–199
  43. Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 23083–23091
  44. Hurley, J. H., and Hanson, P. I. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
  45. Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N., and Weissenhorn, W. (2011) *Trends Biochem. Sci.* **36**, 199–210
  46. Guizetti, J., Schermelleh, L., Mäntler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Müller-Reichert, T., and Gerlich, D. W. (2011) *Science* **331**, 1616–1620
  47. Skibinski, G., Parkinson, N. J., Brown, J. M., Chakrabarti, L., Lloyd, S. L., Hummerich, H., Nielsen, J. E., Hodges, J. R., Spillantini, M. G., Thusgaard, T., Brandner, S., Brun, A., Rossor, M. N., Gade, A., Johannsen, P., Sørensen, S. A., Gydesen, S., Fisher, E. M., and Collinge, J. (2005) *Nat. Genet.* **37**, 806–808
  48. Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerød, L., Fisher, E. M., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H., and Simonsen, A. (2007) *J. Cell Biol.* **179**, 485–500
  49. Lee, J. A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G., and Gao, F. B. (2007) *Curr. Biol.* **17**, 1561–1567

## Supplementary Figures

**Figure S1:** (A) Schematic representation of CHMP2B and CHMP2B mutants used throughout this study. MIM: MIT domain interacting motif (B) Sequence alignment of the N-terminal amino-acids of human CHMP proteins. Conserved LF residues are shown in bold.

**Figure S2:** (A) Western-Blot analysis of cells used in the experiment shown in figure 1 demonstrates the effect of siRNAs on VPS4A and VPS4B proteins. Lysate of HeLa cells were prepared 72 h after transfection with siRNAs and western-blots revealed using the indicated antibodies.  $\alpha$ -Actin was used as loading control. (B) Western-Blot analysis of cells used in the experiment shown in figure 2 reveals comparable levels of expression of all CHMP2B proteins. Lysates of HeLa cells were prepared 36 h after transfection and western blots revealed using the indicted antibodies. (C) CHMP2B overexpression in post-mitotic neurons induces formation of cell protrusions in which it accumulates. Rat Hippocampal neurons (E19) were prepared and transfected with CHMP2B after 14 DIV as described in {Belly, 2010 #5419}. Three days later, CHMP2B was revealed by immunostaining with a polyclonal antibody against CHMP2B.

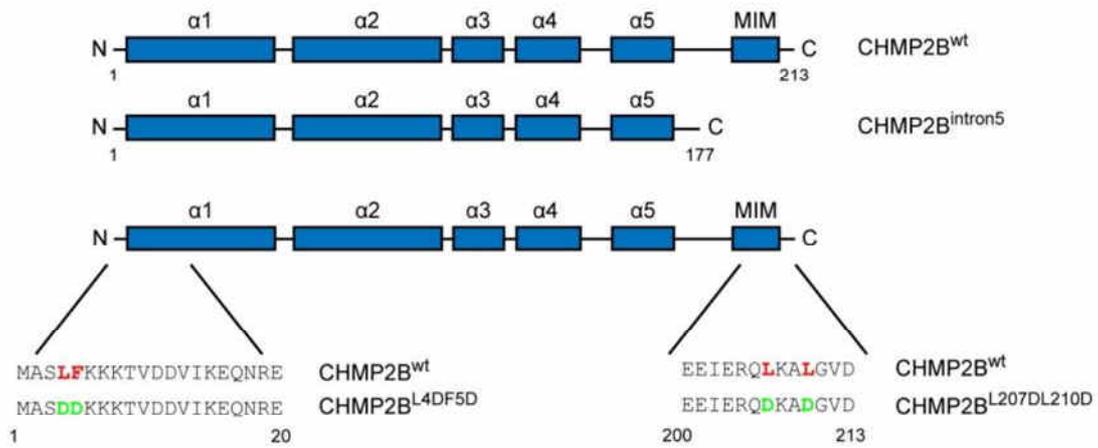
**Figure S3:** (A) Cryo electron microscopy image of a CHMP2B tube. (B) Part of a 2D average made of 35 boxes (900 x 900 pixels) chosen along the tube shown in A. Bars 50 nm. (C) Power spectrum of the 2D average shown in B. The arrow indicates the layer line corresponding to the  $1/32\text{\AA}$  spacing.

**Movie S1:** 3D reconstruction of a cell expressing CHMP2B immunostained with anti-CHMP2B antibody.

**Movie S2:** 3D reconstruction of a cell expressing CHMP2B-Flag immunostained with anti-Flag antibody.

Figure S1

A



B

CHMP1A	---MDDT <b>LF</b> -QLK--FTAKQ-LEK--LAK-KAEKDSKAEQAKVKKALLQ-	39
CHMP1B	MSNMEKH <b>LF</b> -NLK--FAAKE-LSR--SAK-KCDKEEKAEKAKIKKA-IQ-	41
CHMP2A	---MD- <b>LF</b> -GRR--KTPEE-LLR--QNQ-RALNRRAMRELDL-ERQKLET	38
CHMP2B	---MA- <b>SLF</b> --KK--KTVDD-VIK--EQN-RELRGTRQRAIIR-DRAALEK	37
CHMP3	---MG-- <b>LF</b> -GKTQEKPPKE-LVN--EWS-LKIRKEMRVVDR-QIRDIQR	39
CHMP4A	MSGLG- <b>RLF</b> -GKG--KKEKG-PTP--EEAIQKLKETEKILIK-KQEFLE-	41
CHMP4B	MSVFG- <b>KLF</b> -GAGGGKAGKGGPTP--QEAIQRLRDTEEMLSK-KQEFLE-	44
CHMP4C	MSKLG- <b>KFL</b> KGGGS-SKSRAAPSP--QEALVRLRETEEMLGK-KQEYLE-	44
CHMP5	---MN- <b>RLF</b> -GKA---KPKA-PPPSLTDCIGTVDSRAESIDK-KISRDL-	39
CHMP6	---MG- <b>NLF</b> -GRK--KQSRV-TEQ--DKAILQLKQQRDKLRQYQKR-IA-	38
	: :*	: . :

Figure S2

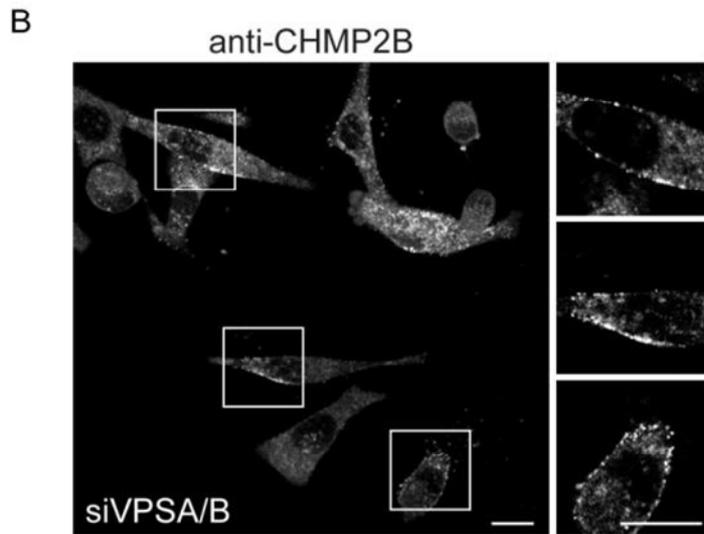
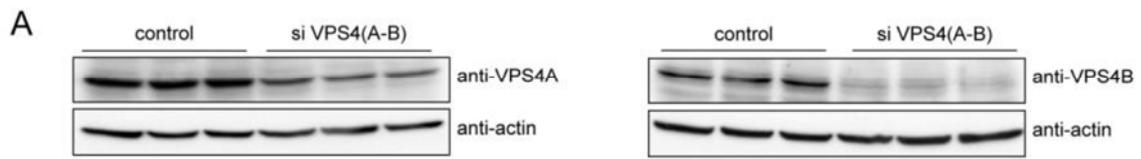
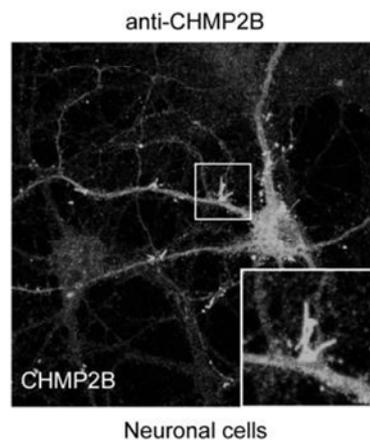


Figure S3

A



B

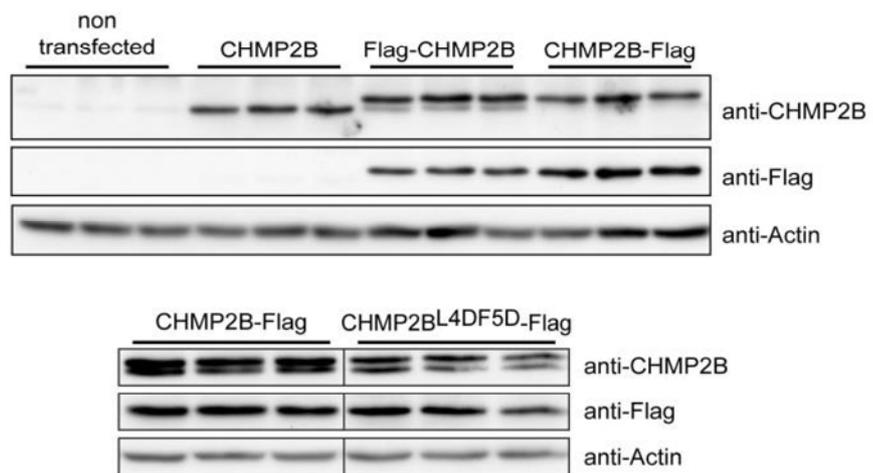
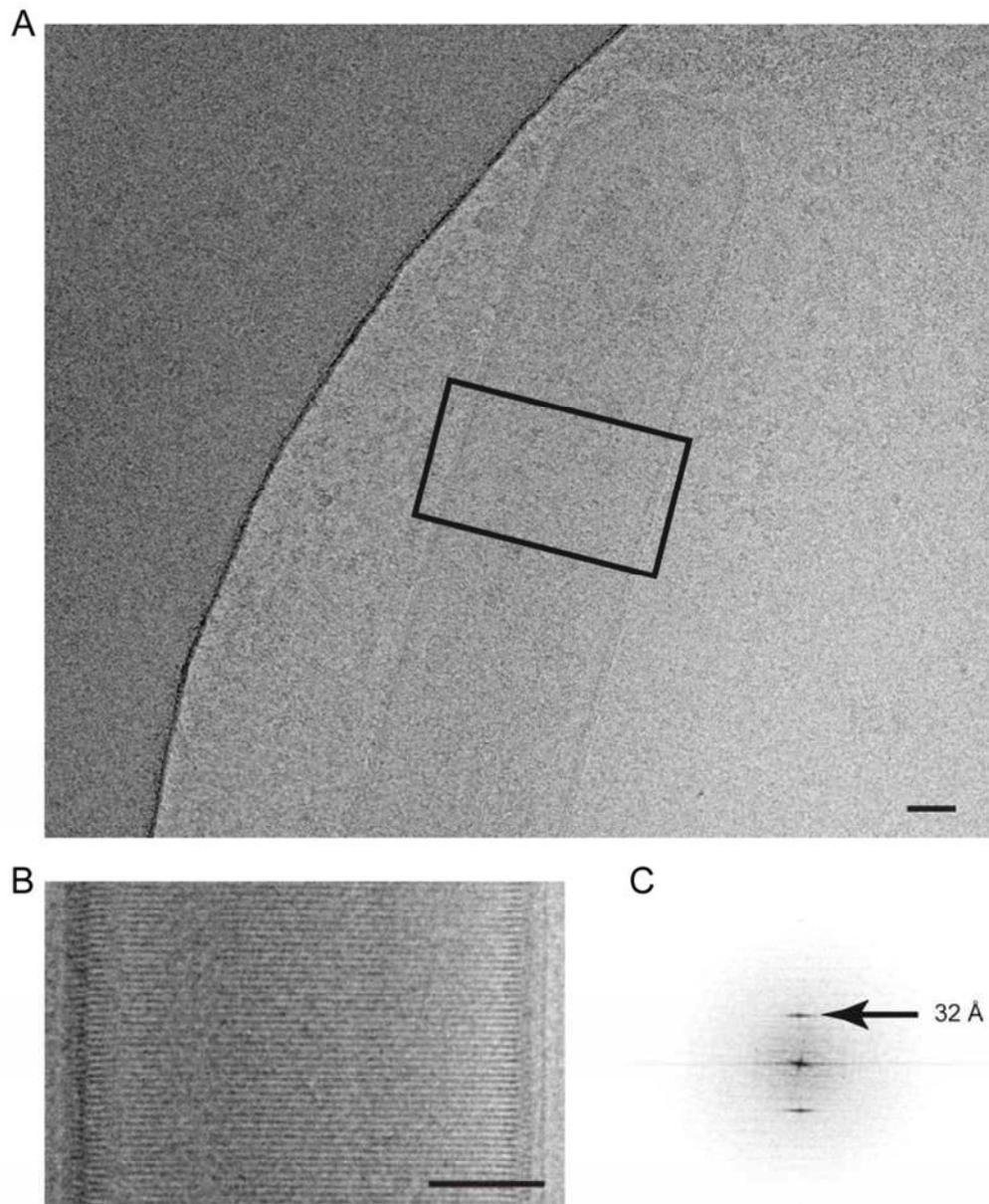


Figure S4



**Table S1: PCR primers used in this study**

<b>Construction</b>	<b>Forward primer (5'-3')</b>	<b>Reverse primer(5'-3')</b>
CHMP2B <sup>L4DF5D</sup>	caccatggcgtccgacgacaagaag	catccacggttttcttcttgcgtcggacgccatggggaaggga
CHMP2B <sup>L207DL210D</sup> - Flag	caccatggcgtccctcttcaagaa	gggctacttgatcgcgtcctttagtcatctactccatcagcc ttgtcttggcgtcaatcttcat
CHMP2B-Flag	caccatggcgtccctcttcaagaa	gggcccctcgagctacttgatcgcgtcctttagtcatctact cctaaagccttgag
CHMP2B	caccatggcgtccctcttcaagaa	gggctaactactcctaaagccttgag
CHMP2B <sup>INTRON5</sup> - Flag	caccatggcgtccctcttcaagaa	ggggggcccttacttgatcgcgtcctttagtcaacctttcca gaaattcaattcc
CHMP3-Flag	caccatggggctgttggaaag	gggcccctacttgatcgcgtcctttagtgcgtcggaggtg gg
CHMP4A-Flag	caccatgfcggcggcggcggccc	gggtcacttgatcgcgtcctttagtggatacccactcagc caact
CHMP4B-Flag	caccatgfcgggttcgggaagc	gggcctcacttgatcgcgtcctttagtccatggatccagc ccagttc
CHMP4C-Flag	caccatgagcaagttgggcaagttc	ttacttgatcgcgtcctttagtgcggtagcccaagctgccaat t



## 2. Rôle de CHMP2B et du complexe ESCRT-III dans la morphogenèse des neurones et des épines dendritiques

### Article 2: Regulation of post-synaptic function by the dementia-related ESCRT-III subunit CHMP2B

**Romain Chassefeyre**\*, José Martínez-Hernández\*, Federica Bertaso, Nathalie Bouquier, Béatrice Blot, Marine Laporte, Yohann Couté, Anny Devoy, Adrian Isaacs, Karin Pernet-Gallay, Rémy Sadoul, Laurent Fagni et Yves Goldberg.

\* : les auteurs ont contribué à égalité

**The Journal of Cell Biology**

Soumis

## Contexte de l'étude

Les épines dendritiques sont au centre du fonctionnement neuronal. Leur morphologie et leur organisation moléculaire sont finement régulées. Des paramètres comme le volume de la tête, le diamètre du cou et le nombre de récepteurs aux neurotransmetteurs sont fondamentaux et vont conditionner l'efficacité de transmission du message nerveux. Des altérations du fonctionnement des épines dendritiques sont retrouvées dans de nombreuses maladies neurodégénératives. Elles apparaissent de manière précoce et sont considérées comme une cause majeure des dysfonctionnements neuronaux et de la mort neuronale, dans ces pathologies (Penzes et al., 2011).

Des mutations de CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B) sont associées à des formes familiales de démence fronto-temporale. Des travaux précédents ont montré que cette protéine était requise pour la maturation morphologique des épines dendritiques (Belly et al., 2010). CHMP2B appartient au complexe ESCRT-III, impliqué dans divers mécanismes de déformation membranaire. Cette sous-unité semble posséder des propriétés particulières, au sein du complexe ESCRT-III, de par sa capacité à s'associer préférentiellement à la membrane plasmique (Article 1 : (Bodon et al., 2011)). Nous avons cherché à comprendre par quel mécanisme CHMP2B pouvait être impliquée dans le fonctionnement des épines dendritiques. Nous avons proposé l'hypothèse que CHMP2B puisse jouer un rôle direct dans la morphogenèse des épines dendritiques au travers des propriétés du complexe ESCRT-III dans l'établissement de courbures de la membrane plasmique.

Nous avons abordé la question sous trois angles principaux. (1) La localisation de CHMP2B au niveau des synapses. (2) L'assemblage de cette protéine au sein d'un complexe ESCRT-III. (3) Le rôle fonctionnel de ce complexe dans le gonflement des épines dendritiques et l'établissement de processus de plasticité synaptique.

Ce travail a été mené en collaboration avec l'équipe du Pr. Laurent Fagni (IGF, Montpellier) autour d'un projet ANR (MALZ 2011 : MAD CHMP2B). Ma contribution personnelle a concerné principalement la mise en évidence et la caractérisation biochimique du complexe protéique synaptique contenant CHMP2B. J'ai également participé à l'orientation des recherches, à la rédaction du manuscrit et à la préparation des figures.

## Résultats

L'expression et la localisation de CHMP2B ont été analysées dans les tissus de rongeurs. La protéine était fortement exprimée dans le cerveau, en particulier dans des régions comme le cortex, l'hippocampe et le bulbe olfactif. Cette expression était finement corrélée au développement cérébral *in vivo* et à la synaptogenèse *in vitro* (Figure 1).

Des expériences d'immunofluorescence sur des neurones d'hippocampe de rat matures ont montré que la protéine CHMP2B endogène formait des clusters dans les dendrites, souvent localisés au niveau de la tête et du cou des épines dendritiques (Figure 2). La microscopie immunoélectronique a permis de déterminer la localisation ultrastructurale de CHMP2B endogène à l'intérieur des épines dendritiques. Un premier pic de distribution se trouvait à proximité de la membrane plasmique et latéralement en contact avec la densité postsynaptique (espace pérисynaptique). L'ensemble de ces résultats indique que la protéine CHMP2B se localise principalement à proximité de la membrane plasmique de l'épine et relativement peu au contact des membranes intracellulaires (Figure 3). Ceci est en accord avec le comportement particulier de cette protéine, dans des lignées cellulaires (Bodon et al., 2011).

L'analyse biochimique de la distribution subcellulaire de CHMP2B a confirmé les données de localisation. La protéine était sous-représentée dans le cytosol et se concentrait au niveau des membranes, en particulier dans les synaptosomes. Une proportion importante de CHMP2B et de CHMP4B, une autre sous-unité du complexe ESCRT-III, sont restées insolubles, après une extraction des synaptosomes au TritonX-100 (Figure 4). Ceci suggère que les clusters de CHMP2B peuvent représenter des assemblages polymériques, associés à des éléments de la densité postsynaptique.

Pour déterminer si CHMP2B formait des oligomères dans les épines dendritiques nous avons solubilisé des extraits de synaptosomes dans du désoxycholate et réalisé une chromatographie d'exclusion de taille. Un tiers de CHMP2B s'est retrouvé dans une fraction de haut poids moléculaire (> 1,5 MDa) et était co-éluée avec CHMP4B et Alix, une protéine associée au complexe ESCRT-III. Une large proportion du CHMP4B et d'Alix ont été co-immunoprécipités avec CHMP2B à partir de cette fraction de haut poids moléculaire. L'analyse du complexe contenant CHMP2B par spectrométrie de masse (Y. Couté, CEA, Grenoble) a permis d'identifier des peptides correspondant à CHMP1A, CHMP2A, CHMP3, CHMP4B, CHMP5, CHMP6 et Alix. Ceci a indiqué que CHMP2B faisait partie d'un complexe ESCRT-III stable dans les synapses (Figure 4). Il s'agit de la première fois qu'un complexe ESCRT-III endogène a pu être purifié. Son extrême stabilité détonne avec le caractère labile du complexe ESCRT-III identifié chez la levure (Babst et al., 2002b; Teis et al., 2008).

D'autres protéines de l'échafaudage postsynaptique (Homer, Shank, récepteur NMDA...) ont également été identifiées, ce qui confirme que le complexe contenant CHMP2B est en contact étroit avec des éléments structurants de la postsynapse. Le détail des expériences de protéomique fait l'objet d'une partie dédiée (Partie 3).

La déplétion de CHMP2B dans des neurones d'hippocampes mature et l'étude de la souris déficiente en CHMP2B ont montré que CHMP2B était requise à la fois pour les processus de maturation et de stabilisation des épines dendritiques, *in vitro* et *in vivo*. Ces effets morphologiques

ont été corrélés à des effets sur le fonctionnement synaptique. Les neurones déficients en CHMP2B présentaient une diminution de la fréquence et de l'amplitude des mini-courants postsynaptiques excitateurs spontanés (Figures 5 et 6).

La déplétion en CHMP2B a inhibé le processus de gonflement de la tête des épines associé aux protocoles de LTP chimique. L'enregistrement des mini-courants spontanés n'a pas mis en évidence de potentialisation électrique dans les neurones déplétés, une heure après le protocole de LTP chimique, contrairement aux neurones contrôles (Figures 7 et 8). Ces résultats indiquent que CHMP2B est requis pour la plasticité structurale et fonctionnelle des épines dendritiques.

L'ensemble de ces résultats indiquent que, dans les épines dendritiques, CHMP2B intègre un complexe ESCRT-III particulièrement stable et associé à la membrane plasmique. La protéine est en relation étroite avec des éléments structurants de la post-synapse et régule des aspects relatifs au développement, à la stabilisation, et à la plasticité structurale et fonctionnelle des épines dendritiques. Ceci suggère que ce complexe ESCRT-III particulier pourrait jouer un rôle direct dans la morphogénèse des épines dendritiques.

### **Lien avec la problématique de la thèse**

Cet article constitue véritablement le cœur de mon travail de thèse. Il s'articule parfaitement avec le travail précédent, centré sur la mécanistique d'assemblage de la sous-unité CHMP2B, dans des lignées cellulaires. Ce travail constitue le point de départ pour étudier le rôle fonctionnel de CHMP2B et du complexe ESCRT-III dans les cellules neuronales et les épines dendritiques en particulier.

**REGULATION OF POST-SYNAPTIC FUNCTION BY THE DEMENTIA-RELATED  
ESCRT-III SUBUNIT CHMP2B**

**Running title: ESCRT-III function at synapses**

**39587 characters**

**Romain Chassefeyre<sup>1,2,\*</sup>, José Martínez-Hernández<sup>1,2,\*</sup>, Federica Bertaso<sup>3,4</sup>, Nathalie Bouquier<sup>3,4</sup>, Béatrice Blot<sup>1,2</sup>, Marine Laporte<sup>1,2</sup>, Yohann Couté<sup>5,6</sup>, Anny Devoy<sup>7</sup>, Adrian Isaacs<sup>7</sup>, Karin Pernet-Gallay<sup>1,2</sup>, Rémy Sadoul<sup>1,2,+</sup>, Laurent Fagni<sup>3,4</sup>, Yves Goldberg<sup>1,2,8,+°</sup>**

- (1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 836, F-38042 Grenoble, France
- (2) Université Joseph Fourier, Institut des Neurosciences, F-38042 Grenoble, France
- (3) Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR)-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34094 Montpellier, France
- (4) Université Montpellier-2, F-34090, Montpellier, France
- (5) INSERM, UMR-S 1036, F-38054 Grenoble, France
- (6) Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), Laboratoire EDyP, F-38054 Grenoble, France
- (7) Department of Neurodegenerative Disease, UCL Institute of Neurology, London WC1N 3BG, UK
- (8) Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), Laboratoire GPC, F-38054 Grenoble, France

(\* Equal first authors

(+) Corresponding authors

(°) In charge of correspondence with the Editors

E-mail: [yves.goldberg@ujf-grenoble.fr](mailto:yves.goldberg@ujf-grenoble.fr)

Phone: +33 456 52 05 49

Fax: +33 456 52 06 57

Mail: Institut des Neurosciences, UJF Site Santé, Bât. Safra, Chemin Ferrini, 38042 Grenoble cedex 9, France

## ABSTRACT

ESCRT-III is a ubiquitous cytoplasmic protein complex which plays a central role in remodeling of lipid membranes, during endo-lysosomal trafficking, mitotic cell abscission and viral budding. ESCRT-III subunits, called Charged Multivesicular body Proteins (Chmp1-7), transiently assemble into helical polymers that change the curvature of membrane domains. Mutations in subunit CHMP2B cause frontotemporal dementia, suggesting that normal Chmp2b may play a specific role in neurons. We examined the distribution and function of Chmp2b in mature hippocampal neurons. Immuno-electron microscopy showed a subset of neuronal Chmp2b to concentrate beneath the perisynaptic membrane of dendritic spines. In synaptoneurosome lysates, Chmp2b was stably bound to a large complex containing other ESCRT-III subunits and post-synaptic scaffolds. Chmp2b depletion reduced dendritic branching of cultured neurons, decreased excitatory synapse density *in vitro* and *in vivo*, and abolished activity-induced spine enlargement and synaptic potentiation. We propose that synapses harbor a stable form of ESCRT-III that may play a novel role in shaping the spine plasma membrane.

## INTRODUCTION

The Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT-0, I, II, III) are a set of four cytoplasmic protein complexes, conserved from yeast to man, initially discovered for their role in cargo sorting to the lumen of multivesicular bodies (Babst et al., 2002; Henne et al., 2013b; Katzmann et al., 2001). In mammalian cells, ESCRTs are also necessary for enveloped viruses budding (von Schwedler et al., 2003) and the abscission step of cytokinesis (Carlton and Martin-Serrano, 2007). During all of these processes, flat membrane domains become deformed into tubes filled with cytoplasm (e.g. vesicle necks), which are then constricted from within. Assembly of ESCRT-III on the membranes is thought to be directly responsible for this remarkable remodeling topology. The core ESCRT-III subunits are small cytosolic proteins, called Charged Multivesicular body Proteins (Chmp), which are all made of a four-helix module with oligomerization potential, regulated by intramolecular interaction with a fifth helix and C-terminal tail (Bajorek et al., 2009; Muziol et al., 2006). Upon release of intramolecular inhibition, the subunits assemble into homo- or heteropolymers that adhere to membranes (Shim et al., 2007). Based on *in vitro* reconstitution experiments (Lata et al., 2008; Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009), overexpression of polymers in cultured cells (Bodon et al., 2011; Hanson et al., 2008), high-resolution microscopy of mitotic cell abscission (Guizetti et al., 2011), and biophysical modeling (Elia et al., 2012; Fabrikant et al., 2009; Lenz et al., 2009), it is thought that ESCRT-III polymers form helical filaments (20-200 nm wide, subject to subunit type), rigid enough to reshape overlying membranes. The combination of an N terminal hydrophobic motif and a group of positively charged residues allows subunits to generate balanced changes in membrane curvature, such that the polymer causes evagination and constriction of membrane tubes (Bodon et al., 2011; Buchkovich et al., 2013). In ESCRT-dependent processes characterized so far, membrane deformation is driven to the point of scission. However, the scission step requires that ESCRT-III polymers recruit the depolymerizing ATPase Vps4, which couples membrane severing to subunit dissociation, thus making ESCRT-III assembly transient (Lata et al., 2008; Teis et al., 2008). The possibility that the potent membrane-sculpting function of ESCRT-III might operate in cell morphogenetic activities other than membrane scission events remains largely unexplored.

The different core subunits control distinct aspects of the ESCRT-III polymerization cycle. In yeast, Snf7/Chmp4 is the stoichiometrically major subunit in the polymers, and forms circular filaments that are converted to helices by subsequent recruitment of Vps24/Chmp3 and Vps2/Chmp2; this latter is responsible for terminating the cycle and recruiting Vps4 (Henne et al., 2013a; Saksena et al., 2009; Teis et al., 2008; Wollert et al., 2009). In vertebrates, this scheme is made more complex by the diversification of Chmp2 and Chmp4 isoforms, which have acquired partially distinct functions (Carlton et al., 2012; Morita et al., 2011). Whether particular subunits confer tissue-specific functions to ESCRT-III is not known. This question is especially intriguing in the case of Chmp2b, the more distantly related of the two Vps2/Chmp2 homologues in vertebrates. Chmp2b has attracted particular attention, since the discovery that dominant mutations in the human *CHMP2B* gene underlie a familial form of frontotemporal dementia (FTD; (Isaacs et al., 2011; Skibinski et al., 2005). When overexpressed, CHMP2B exhibits a specific ability to accumulate beneath the

plasma membrane, where it forms helical polymers that generate long membrane protrusions, at the base of which CHMP4B accumulates (Bodon et al., 2011). Transgenic mice expressing an FTD-linked CHMP2B mutant throughout their brain display progressive neurodegenerative changes (Ghazi-Noori et al., 2012); and strong expression of the same mutant in cultured cortical neurons is rapidly lethal (Lee et al., 2007). 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, since degeneration was not seen in knock-out mice severely (though not completely) deficient for Chmp2b (Chmp2b KD mice; Ghazi-Noori et al., 2012), and since in cultured neurons, Chmp2b depletion by RNAi did not affect cell survival (Belly et al., 2010; Lee et al., 2007). In cultured hippocampal neurons, we have previously shown that Chmp2b RNAi caused a specific impairment in the morphological maturation of dendritic spines (Belly et al., 2010). In some specific neuronal populations of the developing mouse nervous system, synaptogenesis correlates with Chmp2b gene transcription (Xu et al., 2012). These observations suggest that Chmp2b may play a role in synaptic biology.

In the present study, we characterized the properties of Chmp2b in mature neurons, in terms of subcellular localization, oligomeric state and contribution to synaptic function. Our investigation indicates that Chmp2b is bound to a stable form of ESCRT-III associated with the postsynaptic cytoskeleton; and is required for maintaining the complexity of dendritic trees as well as the stability, efficacy and plasticity of excitatory synapses.

## RESULTS

### Chmp2b expression in the postnatal brain

To compare Chmp2b protein levels across tissues, a range of mouse organs were analyzed by Western immunoblotting with an anti-Chmp2b antibody. The same blots were also probed with an antibody raised against the major ESCRT-III subunit Chmp4b. For both proteins, expression was strikingly higher in the brain than in the other organs we examined, except for testes (Fig. 1A). Expression of Chmp2b and Chmp4b varied among regions of the adult brain, with highest Chmp2b levels found in olfactory bulb and cortex (Fig. 1C). To define the topographical pattern of Chmp2b expression, we performed immunohistochemistry on mouse brain sections (Fig. 1D). Chmp2b immunoreactivity was stronger in specific areas, including habenula, olfactory bulb, all layers of the cortex, amygdala, and hippocampus. In higher magnification views, immunostaining was evident in the somatodendritic compartment of numerous neurons (e.g. in the CA1 region of the hippocampus) (Fig. 1E). Specificity of staining was confirmed by showing reduced staining in Chmp2b KD brain, and by use of a second anti-Chmp2b antibody (Fig. S1C-E). Analysis of mouse brain at various stages of development indicated that Chmp2b expression increased during the first post-natal week, i. e. at a time of intense synaptogenesis, as documented by the rise in the amount of post-synaptic marker PSD95 (Fig. 1B).

### Chmp2b clustering in dendritic shafts and spines

To analyze the subcellular distribution of Chmp2b, we first turned to primary cultures of rat neurons. Immunoblotting analysis of cultured hippocampal (Belly et al., 2010) or cortical neurons (Fig.S2A) showed that Chmp2b expression steadily increased during neuronal maturation, reaching a plateau after 12 DIV, i.e. after synapse formation had occurred. Immunofluorescent staining of mature hippocampal neurons revealed Chmp2b immunoreactivity throughout the entire cytoplasm. Focussing on the dendrites, we noted that Chmp2b staining formed numerous small clusters, many of which were found at the base, in the neck and in the head of dendritic spines (Fig. 2A). Within spine heads, Chmp2b clusters were often juxtaposed to post-synaptic densities labelled with anti-PSD-95 antibody. The overlap of Chmp2b with PSD95 puncta was significantly more frequent than expected by random superposition (Fig. S2B).

### Chmp2b preferentially localizes beneath the spine plasma membrane

To define the localization of Chmp2b in neuronal processes *in situ* at ultrastructural resolution, we used the same antibody as above for pre-embedding immunogold labelling of the adult mouse hippocampus. Electron

microscopy (EM) of the stratum radiatum revealed Chmp2b immunoreactivity in axons, dendrites and spines (Fig. 2, B-C). In the dendritic shafts, as expected based on the known function of Chmp2b, particles sometimes decorated multivesicular endosomes (MVB; Fig. 2C, bottom right). Spines, which are usually devoid of MVB (Cooney et al., 2002), displayed a density of immunogold particles that was two-fold higher than in dendritic shafts or axonal boutons (Fig. 2D). Importantly, immunogold labelling of spines was greatly reduced in Chmp2b KD brain, confirming specificity of the labelling (Fig. S1F,G). We quantitated the distribution of Chmp2b within dendritic spines by measuring the distance of the gold particles relative to either the centre of the spine (radial distance) or the edge of the PSD (tangential distance). Chmp2b immunoreactivity clearly peaked at radial positions corresponding to the submembrane cortex, and at tangential positions immediately adjacent to the PSD (Fig. 2D). Along the tangential coordinate, a second peak was observed at large distances, corresponding to a distinct accumulation in the spine neck. No significant association with internal vesicular compartments was detected. Taken together, these data indicated that within spines, Chmp2b concentrates just below the perisynaptic membrane, and also to some extent in the spine neck. This result was confirmed by reconstructing the three-dimensional distribution of Chmp2b immunoreactivity within individual spines (Fig. 2E). 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 ESCRT-III assemblies might surround or attach to the PSD. Post-embedding immunolabelling suggested that Chmp2b is scarce within the PSD core (Fig. S2C).

### **Synaptic Chmp2b is part of a stable ESCRT-III complex**

We then used immunoblotting to analyze the distribution of Chmp2b and 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 PSD-95 were used as markers of the pre- and post-synaptic compartments respectively. Chmp2b was more concentrated in the membranes and in the synaptoneurosomes than in the soluble fraction (Fig.3A). We estimated that Chmp2b represented about 0.08% of total synaptosomal protein (Fig.S3 D-E). The relative level of Chmp2b remained elevated in the Triton X-100-insoluble material extracted from synaptoneurosomes (PSDI fraction, mainly containing post-synaptic densities). Chmp4b was mostly Triton-insoluble and highly enriched in the PSDI fraction. A similar distribution was found in subcellular fractions prepared from cultured cortical neurons (Fig. S3A). Subsequent solubilization of PSDI revealed that unlike PSD-95, Chmp2b and Chmp4b could be solubilised from the PSD fraction using the more stringent detergent Sarkosyl (fraction PSDIII in Fig. 3B). Furthermore, solubilization of Chmp2b from synaptoneurosomes was completely ineffective with 1% digitonin, only partial with the mild non-ionic detergent dodecylmaltoside, and very efficient with 1% deoxycholate (DOC) (Fig. S3B). 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 solubilised proteins were then analyzed by gel filtration. This revealed that 30% of synaptic Chmp2b was associated with large molecular assemblies (> 1.5 MDa), co-eluting with the expected peak of post-synaptic receptor / scaffold complexes (Fig. 3C). The remaining Chmp2b molecules were eluted in low molecular weight (LMW) fractions (peaking at  $\approx$  50 kDa apparent molecular weight) corresponding to monomeric Chmp2b, as indicated by comparison with purified recombinant protein (see Fig. S3C). Importantly, DOC buffer did not affect the apparent size of monomeric recombinant Chmp2b (Fig. S3C), making it very unlikely that the Chmp2b-containing multimer arose from a detergent-induced artefact. The vast majority of synaptic Chmp4b as well as a fraction of the Chmp4b-binding protein Alix co-eluted with the high molecular weight (HMW) pool of Chmp2b and PSD95 (Fig. 3C,D). These data show that at synapses Chmp2b, Chmp4b and Alix are part of stable polymers, which could be ESCRT-III complexes associated with synaptic structures. To investigate this point further, we performed co-immunoprecipitation 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 co-precipitated along with Chmp2b (Fig. 3E, lanes 1-3). In contrast, those Chmp4b molecules existing in the LMW fraction were not co-precipitated with Chmp2b (lanes 4-6). Thus, in synaptoneurosomes solubilised 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 (Table S3). In agreement with the immunodetection data, Chmp4b was detected as one of the most prominent proteins among the numerous Chmp2b-associated species (Table I). 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 (Table I). The presence of these post-synaptic proteins was confirmed by immunoblotting. 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 (Fig. 3F). Together with the intra-spine 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.

### **Chmp2b is required for maintaining dendritic branches, dependent on interaction with Chmp4b**

We examined the possible role of Chmp2b in the maintenance of dendrites and synapses. For this, Chmp2b was down-regulated by transfecting cultured hippocampal neurons with a well-validated shRNA construct (Belly et al., 2010) (re-validated in Fig. S4A). Control transfections were carried out 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 Fig. 4 (A, B), Chmp2b-depleted neurons underwent a dramatic loss of higher-order dendritic branches, compared to neurons transfected with control shRNA. Coexpression of a RNAi-resistant version of the Chmp2b mRNA together with the shRNA fully rescued dendritic complexity. These data indicate that Chmp2b is required for maintaining the integrity of dendritic trees.

We then tested whether the effect of Chmp2b on dendrite branching depended on its ability to interact with Chmp4b. For this, we designed a Chmp2b point mutant deficient for binding to Chmp4b. (Morita et al., 2011) have shown that binding of Chmp4b to the close Chmp2b homologue 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 then evaluated the ability of wild-type or mutant Chmp2b to associate with Chmp4b, by co-localization and co-immunoprecipitation assays in transfected HEK cells. Unlike Chmp2b<sup>WT</sup>, Chmp2b<sup>R19/22/26A</sup> failed to co-localize with Chmp4b in the cell cytoplasm, and to co-immunoprecipitate with Chmp4b in cell lysates (Fig. S4B,C). Thus, Chmp2b<sup>R19/22/26A</sup> is unable to interact with Chmp4b. In Chmp2b-depleted neurons, Chmp2b<sup>R19/22/26A</sup> failed to rescue dendritic complexity (Fig. 4B), strongly suggesting that Chmp2b activity in dendrite morphogenesis strictly depends on its capacity to form ESCRT-III complexes together with Chmp4b. A second point mutant, Chmp2b<sup>L4DF5D</sup>, was also severely deficient in dendrite branching assays (Fig. 4B). The L4D/F5D mutation abolishes the ability of Chmp2b to bind liposomes *in vitro* and to deform the plasma membrane when over-expressed (Bodon et al., 2011) (Fig. S4D). These data suggest that the contribution of Chmp2b to dendrite branching correlates with its membrane-deforming potential. Taken together, the results support the notion that neuronal ESCRT-III complexes containing Chmp2b are involved in dendrite morphogenesis.

### **Chmp2b is required for maintenance of synapse density *in vitro* and *in vivo***

To investigate the contribution of Chmp2b to the maintenance of excitatory synapses, neurons were transfected with control or Chmp2b-targeting shRNA plasmid. Two days later, the neurons were fixed and synapses were labelled by dual immunofluorescence with antibodies against PSD95 and the presynaptic marker synapsin. Transfected neurons were then imaged by confocal microscopy (Fig. 5A). The density of

synaptic (synapsin- and PSD95-positive) puncta along the dendrites of transfected neurons was significantly lower in Chmp2b-depleted neurons (Fig. 5A,B).

To determine if the loss of synaptic puncta correlated with changes in synaptic transmission, we performed whole-cell patch clamp recordings of spontaneous miniature post-synaptic excitatory currents (mEPSCs) in cultured hippocampal neurons transfected with control or shChmp2b constructs (Fig. 5C). Transfection was done at 18 DIV and recordings 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%. Both effects were partially reversed by co-expression of RNAi-resistant Chmp2b mRNA (Fig. 5D,E). To confirm that the decrease in frequency arose from a loss of functional post-synaptic receptor sites, we compared the responses of control and depleted neurons to bath-applied NMDA. Transfection of the Chmp2b-depleting plasmid resulted in a 63% drop in NMDA receptor-mediated currents, which could be partially rescued by re-expression of RNAi-resistant Chmp2b (Fig. 5F). These data indicate that Chmp2b is required for maintenance of functional excitatory synapses in cultured hippocampal neurons.

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. 6A) (Ghazi-Noori et al., 2012). We found that the total density of spines was reduced by 33% in KD mice compared to age-matched control siblings. This included a 50% loss in the density of mushroom spines (Fig. 6B). 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. 6C). KD hippocampus displayed a 33% drop in excitatory synapse density (Fig. 6D). Taken together, the data strongly support the conclusion that Chmp2b is rate-limiting for formation and maintenance of post-synaptic 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 DIV 16-18 and imaged at DIV 19-21 by confocal microscopy, 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. 7A). As expected (Park et al., 2006), in control neurons, spine volumes were increased at 45 min by  $\approx 15\%$  (median value). In contrast, the volume of spines from Chmp2b-depleted neurons did not increase, and we even observed a slight reduction ( $\approx 5\%$ ) (Fig. 7B). Co-expression of RNAi-resistant Chmp2b fully restored the increase in spine volume (Fig. 7B). These data indicated that Chmp2b was required for stable expansion of spine heads during cLTP. We then examined the effect of the cLTP protocol

on mEPSCs in control and Chmp2b-depleted neurons. As expected, in control neurons, glycine induced a stable increase in the amplitude of mEPSCs, thus demonstrating effective LTP (Fig. 7C, D). Knockdown of Chmp2b impaired the increase in synaptic currents and this effect was rescued by expression of RNAi-resistant Chmp2b (Fig. 7D). These data indicated that Chmp2b was required for long-term synaptic plasticity.

## DISCUSSION

In this study, subunit Chmp2b of the highly conserved ESCRT-III complex was shown to form a novel type of ESCRT-III assembly in neurons, located in dendritic spines, and stable enough to be biochemically isolated. Furthermore, depleting Chmp2b by RNAi caused a striking decrease in the stability of dendritic branches, and in 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. Thus, Chmp2b and ESCRT-III play a previously unsuspected role in the regulation of long-term synaptic plasticity.

The neuronal effects of Chmp2b deficiency might possibly arise from impaired endosomal traffic. In cultured cells, ESCRT-III knock-down was shown to result in endosomal trapping of Src kinase (Lobert and Stenmark, 2012) and in defective recycling of EGF receptor to the membrane (Baldys and Raymond, 2009). In neurons, Chmp2b depletion may similarly alter the trafficking of some crucial protein(s), and thereby cause dendrite loss and weakening of synapses. Alternatively, the synaptic effects of Chmp2b depletion might be explained by hypothesizing a specific function for the synaptic Chmp2b pool identified here. One possibility is that synaptic ESCRT-III assemblies may help scaffold the plasma membrane of dendritic spines, without triggering membrane cleavage. Such a scenario is suggested by the subplasmalemmal rather than endosomal localization of synaptic Chmp2b, and its association with both stable ESCRT-III polymers and spinoskeleton. Post-synaptic Chmp2b-containing polymers might cooperate with actin assembly to impose local membrane curvature around the PSD or in the neck, anchor signaling molecules to membrane domains, or create diffusion barriers.

The notion 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 sub-membrane 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. Gel filtration of synaptosomal lysates showed that at least 30% of synaptic Chmp2b was bound into a large supramolecular complex which comigrated with post-synaptic scaffolds; co-immunoprecipitation 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. Secondly, in accordance with the strong concentration of Chmp4b in the PSD fraction, about 90% of synaptosomal Chmp4b comigrated with the Chmp2b / PSD95 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 semi-quantitative criterion for abundance, Chmp4b, but also ESCRT-III components Chmp2A, Chmp3, Chmp1A and Chmp5 and the Chmp4b-binding platform Alix were strongly represented. This composition corresponds to that

expected for ESCRT-III. The simplest explanation of these data is that Chmp2b, Chmp4b and other subunits were all bound together in stable ESCRT-III polymers attached to post-synaptic 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). It is thus likely, though not formally proven, that most of the Chmp2b molecules accumulated 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 post-synaptic entities predominate in the PSD95 peak and among Chmp2b-bound proteins, it is likely that most of the ESCRT-III identified here was post-synaptic.

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 depolymerising ATPase Vps4, and membrane scission (Henne et al., 2013b). 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, due to steric hindrance by synaptic proteins. Granted that membrane scission requires remodeling of ESCRT-III polymers by Vps4 (Henne et al., 2013b), the spine membrane would then also be protected from cleavage by synaptic ESCRT-III. In line with this possibility, proteomic analysis failed to detect Vps4 among Chmp2b-associated proteins, even though Vps4 was present in total synaptosomal lysates.

The mechanism that activates ESCRT-III polymerization in spines is unknown. One candidate for the role of upstream activator is the Chmp4b-binding protein Alix, which was present in the synaptic complex described above and is known to be crucial for ESCRT-III recruitment in other contexts (Carlton et al., 2008). Post-synaptic proteins associated with Chmp2b also likely play a role in subunit activation.

RNAi-mediated depletion experiments indicated that Chmp2b was essential for maintaining the morphology of dendritic trees at both the branch and spine scales. The effect of Chmp2b on dendritic branches correlated with its ability to bind Chmp4b, in agreement with previous findings that Chmp4b was required for dendritic growth and maintenance in *Drosophila* and mouse neurons (Lee et al., 2007; Sweeney et al., 2006). Interestingly, mutation of Chmp2b arginine 22 was recently detected in a sporadic case of amyotrophic lateral sclerosis (van Blitterswijk et al., 2012), suggesting that specific

dysfunction of the Chmp2b-Chmp4b interaction may have disease relevance. 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. Given the specific affinity of Chmp2b for the plasma membrane (Bodon et al., 2011) and the lack of dendrite stabilisation by the lipid binding-deficient mutant Chmp2b<sup>L4DF5D</sup>, Chmp2b may control some morphogenetic interaction between ESCRT-III and the dendritic membrane.

The role of Chmp2b in synaptic stability is supported by the concomitant drop in immunological synaptic markers, mEPSC frequency and NMDA-evoked current density in mature cultured neurons subjected to RNAi. Those synapses which remained were less efficient than in control neurons, as seen by the drop in mEPSC amplitude, and less apt to undergo potentiation, as tested in a well-known in vitro model of LTP. Chmp2b was required for both structural and electrophysiological aspects of LTP. The spine morphogenetic function of Chmp2b was confirmed in vivo by the decrease in both Golgi-stained spines and EM synaptic profiles in the stratum radiatum of “leaky KO” mice expressing 15% of the normal Chmp2b amount (Ghazi-Noori et al., 2012).

It is tempting to speculate that the intrinsic geometry and rigidity of ESCRT-III filaments may be responsible for imparting spines with some aspect of their typical architecture, in a way necessary for synaptic stability and plasticity. The synaptic effects of Chmp2b deficiency also raise the possibility that plasticity impairments may contribute to the cognitive effects of Chmp2b mutations in FTD patients. More work is needed to address these issues.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmids

See Table S1 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 or mutant versions of the RNAi-resistant Chmp2b (Belly et al., 2010) were cloned in the pBI-CMV3 vector (Clontech), yielding pBI-CMV3-Chmp2b<sup>WT</sup>, pBI-CMV3-Chmp2b<sup>R19,22,26A</sup>, and pBI-CMV3-Chmp2b<sup>L4D/F5D</sup> (used in Figs 5, 6 and 8C). In these vectors, Chmp2b is co-expressed 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. 8B). In this vector, Chmp2b is co-expressed with EGFP from a bicistronic transcript. All constructs were verified by sequencing (Beckman-Coulter, Grenoble, France).

### Antibodies

See Table S2 for details of antibodies and dilutions.

### Animals

Animals were handled and sacrificed in conformity with European law and internal regulations of INSERM. Pregnant OFA rats (Charles River, Ecully, France) were used for primary neuron cultures and two-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. 3 month-old C57BL/6 mice and 1.3 month-old female Chmp2b KO or WT littermate mice (on C57BL/6 background) (Ghazi-Noori et al., 2012) were used for immunohistochemistry and EM studies. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 0.1 ml of sodium pentobarbital (5.6% (w/v), CEVA Santé Animale, Libourne, France) 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, post-fixed for 4 h in the same fixative and 60  $\mu\text{m}$ -thick coronal brain sections were cut with a vibratome (Leica VT 1000 S, Nanterre, France).

### **Cell culture and transfection**

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as previously described (Belly et al., 2010). Briefly, hippocampi were dissected from E18 rat embryos, digested with trypsin and hippocampal cells were seeded at a density of 15,000 /  $\text{cm}^2$  in 35-mm dishes on coverslips pre-coated for 4 hours with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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). 14 mm-wide round coverslips were used for immunostaining and 30 mm-wide coverslips for live imaging. Neurons were maintained in water-saturated 95% air / 5%  $\text{CO}_2$  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 co-transfection experiments, for each dish, 1  $\mu\text{g}$  pSuper-mCherry-based plasmid was mixed with 2  $\mu\text{g}$  pBI-CMV3-based or pIRES2-EGFP-based plasmid. In Fig. 2C, 1  $\mu\text{g}$  each of pSuper-mCherry, pcDNA3.1-Chmp2b-HA and pcDNA3.1-Chmp4b-Flag were mixed and transfected into one dish. 5  $\mu\text{l}$  of 250 mM  $\text{CaCl}_2$  was added to 45  $\mu\text{l}$  water containing 3  $\mu\text{g}$  DNA, mixed and immediately added dropwise to 50  $\mu\text{l}$  2 x BES buffered saline (BBS; pH 7.1) solution. The mixture was gently stirred by tapping the tube and bubbling air once, left to incubate for 10 minutes, then added to coverslips in 1 ml transfection medium (Eagle's MEM (Invitrogen) including 2.2 %  $\text{NaHCO}_3$  and supplemented with B27, 0.05 mM glutamine and 20 mM glucose). After 1h in the incubator the coverslips were transferred to dishes containing 2 ml transfection medium (without B27) pre-incubated for 30 min in 10%  $\text{CO}_2$ . The dishes were quickly returned to 5%  $\text{CO}_2$  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 (Gibco) supplemented with 10% FBS and 2 mM of L-glutamine (Sigma). Cells were transfected after 24h 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 % normal goat serum (GPI) diluted in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 0.9 % NaCl (TBS), with 0.2 % Triton X-100, for 1 h. Sections were then incubated overnight at 4°C in primary antibody at a final protein concentration of 1–2 µg/ml, which had been diluted in TBS containing 1 % NGS. After several washes in TBS, the sections were further incubated for 2 h in biotinylated goat anti-rabbit IgG (Sigma Immuno Chemicals, St Louis, MO) 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 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydro- chloride (DAB; 0.05 % in TB, pH 7.4) as the chromogen and 0.01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 3 washes in PBS containing 0.1% glycine, cells were permeabilized in PBS containing 0.25% Triton X-100 for 10 min at 4°C, then rinsed with PBS. Coverslips were blocked for 1h in PBS containing 5% goat pre-immune serum (GPI), then incubated for 1-2 h at room temperature in a humidified chamber with primary antibodies diluted in blocking solution. After washing in PBS, cells were incubated for 1 h containing with secondary antibodies conjugated to Alexa 488, Alexa 594 or Cy-5, diluted in blocking solution. Coverslips were rinsed and mounted in Mowiol.

### **Golgi staining**

For the Golgi impregnation we used FD Rapid GolgiStain Kit (FDNeuroTechnologies, INC.). Tissue blocks (2.5–3 mm) were immersed in equal volumes of solution A and B during 7 days and then impregnated with solution C for 48 h at 4°C. Then, the brains were cut with a vibratome into 150 µm-thick sections embedded in agarose, washed twice in double distilled water and incubated for 10 min in a mixture of 1 part of solution D, 1 part 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 four animals per genotype, nine secondary or tertiary pyramidal neuron dendrites were randomly selected in the CA1 stratum radiatum. Selection criteria were (i) dendrites displayed

complete Golgi impregnation, (ii) the cell type was clearly identifiable and (iii) the minimum length of the dendrites was 50  $\mu\text{m}$  from the soma. Stacks of bright field images with 0.3  $\mu\text{m}$  spacing were acquired with a Zeiss Axioskop 50 microscope with 63x oil objective (NA 1.4; Plan-Apochromat) coupled to a CCD camera (CoolSnap ES, Roper Scientific) operated by Metaview software (Molecular Devices). Images were analyzed with Image J. 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 63x Plan-Apochromat oil immersion objective (NA 1.4, Zeiss), or (for Sholl analysis) a 40x 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 nm, 561 nm and 633 nm were used for exciting fluorescence of EGFP, ZsGreen or Alexa 488; mCherry or TexasRed; and Cyanine 5, respectively. For multicolor imaging, collection windows were adjusted based on emission spectra to minimize cross-channel contamination. Pinhole size was usually set to generate 0.9  $\mu\text{m}$ -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, signal was averaged over four scans, and digitized on a 8-bit gray scale. In the experiments of Figs. 2B-C and 6A, Z-stacks were acquired with 0.09 x 0.09 x 0.2  $\mu\text{m}^3$  voxel size, then 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 purposes. To evaluate the probability of random overlap between Chmp2b and PSD95 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 PSD95 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 Image J plug-in JACOP (Bolte and Cordelières, 2006). For Sholl analysis, images (1024 x 1024 pixels; 350 x 350  $\mu\text{m}$ ; 4 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, 3 independent cultures). Sholl analysis was performed on maximum intensity projections of mCherry fluorescence, using the Sholl Analysis plugin of Image J. Images of neurons used to study RNAi effects were acquired and analyzed by investigators blind to the transfected constructs.

### **Electron microscopy**

Free-floating sections were incubated in 10 % GPI diluted in TBS for 1 h at room temperature. Sections were then incubated over night at 4°C in primary anti-bodies at a final protein concentration of 1–2 µg/ml diluted in TBS containing 1 % GPI. Then the sections could continue for immunogold labeling or peroxidase-reacted labeling. For immunoperoxidase labeling, we followed the same procedure described before for the immunohistochemistry from the secondary antibody. For immunogold, then they were incubated for 3 h in goat anti- rabbit IgG coupled to 1.4 nm gold (Nanoprobes Inc., Stony Brook, NY) diluted 1:300 in TBS containing 1 % GPI. 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 Inc., Stony Brook, NY).

The peroxidase-reacted sections and the gold-silver-labelled sections were processed for electron microscopy. This included treatment with osmium tetroxide (1 % in 0.1 M PB), block- staining with uranyl acetate, dehydration through increasing graded series of ethanol 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, Austria) and collected on 1-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). They were analyzed with ImageJ. Three-dimensional reconstruction of spine heads from serial section digital images was done using Reconstruct software (John C. Fiala, Boston, 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 synaptoneuroosomes 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 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 1,400 x g for 10 min to remove nuclei. The post-nuclear supernatant (S1) was spun down at 4°C for 10 min. at 13,800 x 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 0.85M; 1.0M; 1.2 M sucrose layers). The gradients

were centrifuged at 82,500 x 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. 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 x 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. 1% Triton X-100, and centrifuged at 200,000 x g for 20 min., yielding pellet PSDII. The other half was solubilized by adding 1 vol. 6% Sarkosyl and centrifuged at 200,000 x g for 1 h, yielding PSDIII.

### **Gel filtration of synaptoneurosome extract**

Size-exclusion chromatography was performed at 4°C on a 120 ml HiPrep Sephacryl S-300 HR column coupled to an Akta FPLC system (GE Healthcare). The column was equilibrated and separation achieved in 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% TritonX-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 DOC buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, protease inhibitors (Complete, Roche Molecular) and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, P0044). The suspension was stirred by rotation at 4°C during 30 min, then centrifuged at 100,000 x 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 endogenous brain protein, 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 x g for 20 min the supernatant was collected and diluted with 3 volumes of IP 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 super-paramagnetic protein A beads (Dynabeads, Life Technologies, 10001D) by cross-linking with dimethyl-pimelimidate (Sigma) according to Harlow and Lane (1988). After extensive 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, homogenized in isotonic lysis buffer and the lysate was centrifuged at 1000 x g for 10 min. The post-nuclear supernatant was centrifuged at 50,000 x g for 1 h and the pelleted membranes were resuspended in DOC buffer. Immunoprecipitation was carried out 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 on PVDF membranes. Membranes were blocked 30 min in TBS containing 0.1% Tween20 and 5% dry milk. Primary antibodies were prepared in blocking solution and incubated 1 hour. After 6 washes in TBS-Tween, secondary antibodies coupled to HRP were added for 30 min. Bound-antibodies were revealed on dark room after ECL treatment.

### **Mass spectrometry analysis**

A DOC extract from gradient-purified synaptoneuroosomes was fractionated by gel filtration and the HMW fractions were pooled and immunoprecipitated with control or anti-Chmp2b antibody. Two other, independently prepared synaptoneurosome extracts were directly immunoprecipitated with the same antibodies. The three pairs of immunoprecipitates were digested and the resulting peptides analyzed by 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 6 successive incubations of 15 min in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and in 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  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 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and for 35 min in the dark with 55 mM iodoacetamide in 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Alkylation was stopped by adding 10 mM DTT in 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and mixing for 10 min. Gel pieces were then washed again by incubation in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  before dehydration with 100% acetonitrile. 0.15  $\mu\text{g}$  of modified trypsin (Promega, sequencing grade) in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  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 analyzes, the dried extracted peptides were resuspended in 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and analyzed by online nanoLC-MS/MS (Ultimate 3000, Dionex and LTQ-Orbitrap Velos pro, Thermo Fischer Scientific). Peptides were sampled on a 300  $\mu$ m x 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75  $\mu$ m x 250 mm C18 column (PepMap, Dionex). The nanoLC method consisted of a 120-minutes gradient at a flow rate of 300 nL/min, ranging from 5% to 37% acetonitrile in 0.1% formic acid during 114 min before reaching 72% for the last 6 minutes. MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Fischer 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 106 ions (maximum filling time: 500 ms). The twenty 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 104 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, 42469 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, trypsin/P as the enzyme and 2 missed cleavage 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 FDR < 1% (as calculated by employing the reverse database strategy), and minimum of 1 specific peptide per identified protein group. The filtered results were uploaded into a relational mass spectrometry identification database (MSIdb) and a homemade tool (hEIDI, manuscript in preparation) 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 which 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 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:  $\geq 2$  unique peptides (specific spectral counts, SSC);  $\geq 2$  distinct protein fragments (spectral counts, SC); ratio of SC in specific to control immunoprecipitate (SC 2B / SC Control)  $\geq 5$ .

### **Electrophysiological recordings in cultured neurons**

Mature (18-21 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<sub>2</sub>, 3 mM KCl, 10 mM Hepes, 10 mM glucose, 0.5  $\mu$ M tetrodotoxin, 50  $\mu$ M bicuculline methiodide, 1  $\mu$ M strychnine, adjusted to pH 7.4 with NaOH and to 330 mosm with Na-acetate. To induce LTP, glycine (200  $\mu$ M in extracellular solution) was perfused for 3 min onto the neurons (Lu et al., 2001). For the experiments where NMDA current amplitudes were measured, NMDA (100  $\mu$ M) 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  $\Omega$ M when filled with a solution containing: 115 mM CsMeSO<sub>3</sub>, 20 mM CsCl, 10 mM HEPES, 0,6 mM EGTA, 4 mM Na<sub>2</sub>-ATP, 0,4 mM Na-GTP, 10 mM Na-phosphocreatine, and 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, adjusted to pH 7.2 with CsOH and to 300 mosm with Cs-acetate. Currents were recorded from an holding potential of -60 mV using an Axon 200B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). 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 excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) and NMDA-evoked currents were analyzed using ClampFit (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

### **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, Germany), washed and kept in extracellular solution (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 33 mM glucose, 50  $\mu$ M bicuculline, 0.5  $\mu$ M TTX, 1  $\mu$ M 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  $\mu\text{W}$  nominal laser power at 561 nm. Pinhole diameter was set to 1 Airy unit. Z-stacks of 20-30 optical sections (voxel size  $0.11 \times 0.11 \times 0.2 \mu\text{m}^3$ ) per dendritic segment were acquired at 15 min intervals. Signal per pixel was averaged over 2 scans. After acquiring baseline images, extracellular solution containing 200  $\mu\text{M}$  glycine (warmed to  $37^\circ\text{C}$  by in-line heating) was delivered. Stimulation was stopped after 4 min by perfusing 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., 2008; Rodriguez et al., 2006). Individual spines labelled 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  $\Delta V/V = (V_f - V_i)/V_i$ , with  $V_i$  = volume at 5 min before start of stimulation and  $V_f$  = volume at 45 min after end of 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 7 independent cultures were pooled.

### **Statistical analysis**

The significance of differences between sample means was usually calculated by one-tailed t test for single comparisons; and by one-way or two-way ANOVA, followed by pairwise one-tailed t tests with Holm's correction, for multiple comparisons. The normality of samples and ANOVA residues was checked by the Shapiro-Wilks test. Where appropriate, the significance of differences was calculated by Friedman test (Fig. 2D, difference between blocks of compartments), Kolmogorov-Smirnov test with Bonferonni correction (Fig. 4B, pairwise differences with control distribution), Wilcoxon rank-sum test (Fig. 5 D-F, 6D), or Kruskal-Wallis test followed by one-tailed pairwise Wilcoxon tests with Holm's correction (Fig. 7B, differences with control median). Statistical tests were performed with R (R core team, 2013).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

R. C. and M. L. were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. J.M.-H. and N. B. were supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR). Work funded by INSERM and ANR MALZ 2011 program. A.M.I . was funded by the UK medical Research Council. We thank S. El-Alaoui (Covalab) for graciously providing the anti-Chmp2b monoclonal, Y. Saoudi for help with microscopy, and N. Jaafari, W. Weissenhorn and all members of the Sadoul lab for critically reading the manuscript.

## ABBREVIATIONS LIST

CA1, Cornu Ammonis area 1

cLTP, chemical long-term potentiation

Chmp, Charged multivesicular body protein

DIV, Days *in vitro*

DOC, Sodium deoxycholate

ESCRT, Endosomal sorting complex required for transport

HMW, High molecular weight

KD, knock-down

LMW, Low molecular weight

mEPSC, miniature excitatory post-synaptic synaptic current

MVB, Multivesicular body

NMDA, N-methyl-D-aspartate

PSD, Post-synaptic density

Vps, Vacuolar protein sorting

Wt, wild-type

## REFERENCES

- Alvarez, V.A., D.A. Ridenour, and B.L. Sabatini. 2006. Retraction of synapses and dendritic spines induced by off-target effects of RNA interference. *J Neurosci.* 26:7820-5.
- Babst, M., D.J. Katzmann, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S.D. Emr. 2002. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell.* 3:271-82.
- Bajorek, M., H.L. Schubert, J. McCullough, C. Langelier, D.M. Eckert, W.M. Stubblefield, N.T. Uter, D.G. Myszka, C.P. Hill, and W.I. Sundquist. 2009. Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol.* 16:754-62.
- Baldys, A., and J.R. Raymond. 2009. Critical role of ESCRT machinery in EGFR recycling. *Biochemistry.* 48:9321-3.
- 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.* 123:2943-54.
- 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.* 286:40276-86.
- Bolte, S., and F.P. Cordelières. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc.* 224:213-32.
- Buchkovich, N.J., W.M. Henne, S. Tang, and S.D. Emr. 2013. Essential N-Terminal Insertion Motif Anchors the ESCRT-III Filament during MVB Vesicle Formation. *Dev Cell.* 27:201-14.
- 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.* 105:10541-6.
- Carlton, J.G., A. Caballe, M. Agromayor, M. Kloc, and J. Martin-Serrano. 2012. ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science.* 336:220-5.
- Carlton, J.G., and J. Martin-Serrano. 2007. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science.* 316:1908-12.
- Cooney, J.R., J.L. Hurlburt, D.K. Selig, K.M. Harris, and J.C. Fiala. 2002. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J Neurosci.* 22:2215-24.

- Elia, N., G. Fabrikant, M.M. Kozlov, and J. Lippincott-Schwartz. 2012. Computational model of cytokinetic abscission driven by ESCRT-III polymerization and remodeling. *Biophys J.* 102:2309-20.
- Fabrikant, G., S. Lata, J.D. Riches, J.A. Briggs, W. Weissenhorn, and M.M. Kozlov. 2009. Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol.* 5:e1000575.
- Filimonenko, M., S. Stuffers, C. Raiborg, A. Yamamoto, L. Malerod, E.M. Fisher, A. Isaacs, A. Brech, H. Stenmark, and A. Simonsen. 2007. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol.* 179:485-500.
- Ghazi-Noori, S., K.E. Froud, S. Mizielinska, C. Powell, M. Smidak, M. Fernandez de Marco, C. O'Malley, M. Farmer, N. Parkinson, E.M. Fisher, E.A. Asante, S. Brandner, J. Collinge, and A.M. Isaacs. 2012. Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain.* 135:819-32.
- Goetze, B., B. Grunewald, S. Baldassa, and M. Kiebler. 2004. Chemically controlled formation of a DNA/calcium phosphate coprecipitate: application for transfection of mature hippocampal neurons. *J Neurobiol.* 60:517-25.
- 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.* 331:1616-20.
- 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.
- Harlow, E., and D.P. Lane. 1988. *Antibodies: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Henne, W.M., N.J. Buchkovich, Y. Zhao, and S.D. Emr. 2013a. The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell.* 151:356-71.
- Henne, W.M., H. Stenmark, and S.D. Emr. 2013b. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5.
- Husi, H., and S.G. Grant. 2001. Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. *J Neurochem.* 77:281-91.
- Isaacs, A.M., P. Johannsen, I. Holm, and J.E. Nielsen. 2011. Frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutations. *Curr Alzheimer Res.* 8:246-51.
- Jiang, M., and G. Chen. 2006. High Ca<sup>2+</sup>-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat Protoc.* 1:695-700.
- Katzmann, D.J., M. Babst, and S.D. Emr. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell.* 106:145-55.

- 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*. 321:1354-7.
- Lee, J.A., A. Beigneux, S.T. Ahmad, S.G. Young, and F.B. Gao. 2007. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol*. 17:1561-7.
- Lenz, M., D.J. Crow, and J.F. Joanny. 2009. Membrane buckling induced by curved filaments. *Phys Rev Lett*. 103:038101.
- 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.
- Lu, W., H. Man, W. Ju, W.S. Trimble, J.F. MacDonald, and Y.T. Wang. 2001. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron*. 29:243-54.
- Morita, E., V. Sandrin, J. McCullough, A. Katsuyama, I. Baci Hamilton, and W.I. Sundquist. 2011. ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe*. 9:235-42.
- Muziol, T., E. Pineda-Molina, R.B. Ravelli, A. Zamborlini, Y. Usami, H. Gottlinger, and W. Weissenhorn. 2006. Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell*. 10:821-30.
- Park, M., J.M. Salgado, L. Ostroff, T.D. Helton, C.G. Robinson, K.M. Harris, and M.D. Ehlers. 2006. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*. 52:817-30.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rodriguez, A., D.B. Ehlenberger, D.L. Dickstein, P.R. Hof, and S.L. Wearne. 2008. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS One*. 3:e1997.
- Rodriguez, A., D.B. Ehlenberger, P.R. Hof, and S.L. Wearne. 2006. Rayburst sampling, an algorithm for automated three-dimensional shape analysis from laser scanning microscopy images. *Nat Protoc*. 1:2152-61.
- Saksena, S., J. Wahlman, D. Teis, A.E. Johnson, and S.D. Emr. 2009. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*. 136:97-109.
- Shim, S., L.A. Kimpler, and P.I. Hanson. 2007. Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic*. 8:1068-79.
- Skibinski, G., N.J. Parkinson, J.M. Brown, L. Chakrabarti, S.L. Lloyd, H. Hummerich, J.E. Nielsen, J.R. Hodges, M.G. Spillantini, T. Thusgaard, S. Brandner, A. Brun, M.N. Rossor, A. Gade, P. Johannsen, S.A. Sorensen, S. Gydesen, E.M. Fisher, and J. Collinge. 2005. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet*. 37:806-8.

- 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.* 16:1006-11.
- Teis, D., S. Saksena, and S.D. Emr. 2008. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell.* 15:578-89.
- Urwin, H., A. Authier, J.E. Nielsen, D. Metcalf, C. Powell, K. Froud, D.S. Malcolm, I. Holm, P. Johannsen, J. Brown, E.M. Fisher, J. van der Zee, M. Bruyland, C. Van Broeckhoven, J. Collinge, S. Brandner, C. Fütter, and A.M. Isaacs. 2010. Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Hum Mol Genet.* 19:2228-38.
- van Blitterswijk, M., L. Vlam, M.A. van Es, W.L. van der Pol, E.A. Hennekam, D. Dooijes, H.J. Schelhaas, A.J. van der Kooi, M. de Visser, J.H. Veldink, and L.H. van den Berg. 2012. Genetic overlap between apparently sporadic motor neuron diseases. *PLoS One.* 7:e48983.
- 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. Cimbara, A. Scott, H.G. Krausslich, J. Kaplan, S.G. Morham, and W.I. Sundquist. 2003. The protein network of HIV budding. *Cell.* 114:701-13.
- Wollert, T., C. Wunder, J. Lippincott-Schwartz, and J.H. Hurley. 2009. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature.* 458:172-7.
- Xu, J., M. Nonogaki, R. Madhira, H.Y. Ma, O. Hermanson, C. Kioussi, and M.K. Gross. 2012. Population-specific regulation of Chmp2b by Lbx1 during onset of synaptogenesis in lateral association interneurons. *PLoS One.* 7:e48573.

## FIGURE LEGENDS

### Fig. 1. Chmp2b expression in the mouse brain

(A) Equal amounts of total protein from each tissue were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. Arrowhead : Chmp4b-specific band.  $\alpha$ -Tubulin was used as loading control.

(B) Mouse brains at increasing developmental ages were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. E : embryonic age, P : post-natal age (days). 1M : 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 ; c.c. : corpus callosum ; Hpc : hippocampus ; Hb : habenula ; Ce : central amygdala ; O.B. : 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. S.O. : stratum oriens ; Pyr : stratum pyramidale ; S.R. : stratum radiatum. Right: higher magnification of the boxed region. Immunoreactivity is observed in apical dendrites (arrowheads) and interneurons (arrows).

### Fig. 2. Chmp2b localization in dendritic spines

(A) 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 panel: punctate staining of a dendritic segment in a transfected neuron (single confocal plane). Staining of non-transfected cells is also visible. Merge: overlap (yellow) between Chmp2b and PSD95 puncta, in dendritic shafts and spines visualized with mCherry (white contour). Numbered arrowheads: spines with colocalized puncta. Right: enlarged views of the same spines. Scale bar: 20  $\mu$ m.

(B) Electron micrograph of Chmp2b immunoreactivity in the mouse stratum radiatum, detected by pre-embedding immunogold labeling. D: dendrites, S: spines, at: axon terminals.

(C) 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 multivesicular body (MVB) in a dendritic shaft.

(D) Quantitative analysis of immunogold labeling in the stratum radiatum. Upper panel: 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 higher in spines than in shafts or axonal boutons (\* $p=0.0498$ ,  $n=3$  animals, 10 fields per animal). Error bars indicate s.e.m. in this and all other figures. Lower panels: distribution of gold particle positions inside dendritic spines ( $n=335$  particles, 3 animals). Left: histogram of normalized positions along the spine radius. Coordinate 0 : spine center; 1.0 : plasma membrane (inset). Particles concentrate in the subplasmalemmal cortex. Right: histogram of normalized particle distances from the PSD. 0 corresponds to the PSD edge, and 1.0 corresponds to the point equidistant from both edges of the PSD (inset). 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. Plasma membrane is in grey, PSD in green, particles 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.

Also see supplemental video.

### **Fig. 3. 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) Gradient-purified synaptoneuroosomes 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 PSD95 complex.

(D) The percentage of Chmp2b and Chmp4b migrating in the high MW peak was measured by densitometry.

(E) Fractions corresponding to high and low MW 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 high MW peak.

(F) Synaptoneurosome extracts were prepared as in (C) and immunoprecipitated with anti-Chmp2b antibody or control IgG. The immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

#### **Fig. 4. Chmp2b regulates dendritic morphology in an ESCRT-III-dependent manner**

(A) Hippocampal neurons were co-transfected at 10 DIV with mixtures of pSuper-based and rescue plasmids. pSuper vectors expressed mCherry together with the indicated shRNA. Rescue plasmids expressed ZsGreen, alone or together with the indicated version of RNAi-resistant Chmp2b (noted 2B\*). Images of doubly transfected neurons at 14 DIV were acquired by confocal microscopy. Panel depicts the morphology of representative neurons in each condition, as visualized by mCherry fluorescence (negative contrast, maximum intensity projections).

(B) Sholl analysis of dendritic arborisation 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 distance-dependent branching (\*\*p= 0.0014 compared to control curve). Expression of wild-type Chmp2b\* restored the control phenotype (p = 1). Chmp4b binding-defective (Chmp2b\*<sup>R19,22,26A</sup>) and membrane binding-defective (Chmp2b\*<sup>L4D/F5D</sup>) mutants of Chmp2b were unable to restore the control phenotype (\*\*p = 0.004 and p = 0.006, respectively) .

#### **Fig. 5. Chmp2b is involved in the maintenance of excitatory synapses in cultured neurons**

(A) Hippocampal neurons were transfected at 16 DIV with pSuper-based plasmids expressing mCherry together with the indicated shRNA. The neurons were fixed at 18 DIV, stained by dual immunofluorescence with anti-PSD-95 and anti-synapsin I antibodies, and imaged by confocal microscopy. Upper panel: three-color images of representative transfected neurons, showing synaptic puncta overlaying mCherry fluorescence (blue; used as mask to facilitate visualization of puncta belonging to the transfected neuron). Lower panel: enlarged views of the boxed regions in different fluorescence channels. Overlap of synapsin I with PSD95 staining appears light yellow. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (top) and 15  $\mu\text{m}$  (bottom).

(B) Density of doubly stained synaptic puncta along the dendrites of neurons transfected as in (A). The Chmp2b-depleting plasmid induced a drop in excitatory synapse density  $*p=0.045$  ( $n=11-12$  neurons per condition).

(C-E) Hippocampal neurons were transfected at 18 DIV as in Fig. 5. Rescue of the Chmp2b deficiency was performed by co-expressing wild-type Chmp2b\*. Transfected neurons were identified by fluorescence at 21 DIV and their miniature EPSCs were measured by patch-clamp recordings in whole-cell configuration.

(C) Sample traces from neurons transfected as indicated.

(D) 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 ( $**p=0.005$ ), and could be partially restored by Chmp2b\* expression ( $p=0.669$ ).

(E) Histogram of mean mEPSC frequencies in neurons transfected as indicated. Frequencies were lower in Chmp2b-deprived neurons ( $*p=0.012$ ), and were partially restored by Chmp2b\* expression ( $p=0.673$ ).

(F) Neurons transfected as above were stimulated at 21 DIV by bath-applied NMDA. The density of NMDA-evoked currents was strongly decreased in Chmp2b-deprived neurons ( $*p = 0.031$ ) and restored by Chmp2b\* expression ( $p=0.71$ ).

### **Fig. 6. Chmp2b is involved in the maintenance of excitatory synapses in vivo**

(A) Brain sections from 5-week old Chmp2b knock-down mice (KD) or sibling controls (Wt) were stained by the Golgi impregnation technique. Stained dendritic segments were visualized by bright-field microscopy of the stratum radiatum. Panel shows 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). 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. S: post-synaptic spine. Presynaptic profiles are highlighted in blue and postsynaptic spines 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 post-synaptic spines per unit surface was significantly lower in the KD (\*\*\*p=0.0008).

### **Fig.7. 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: spines that have expanded.

(B) The percent 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 boxplot 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 knock-down (\*p=0.011 compared to control), and reinstated by expression of Chmp2b\* (p=0.336).

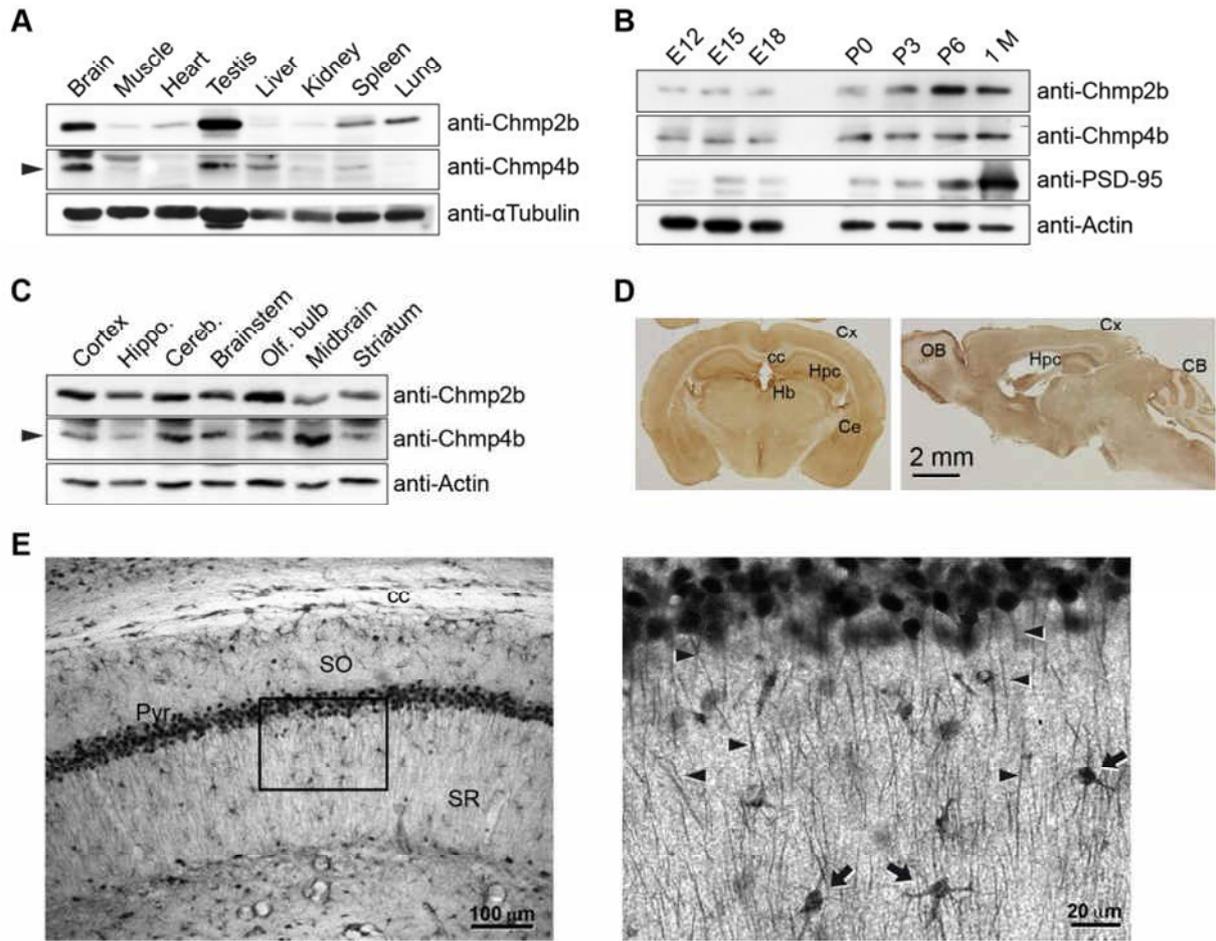
(C, D) Hippocampal neurons were transfected at 18 DIV with the indicated plasmids, then cLTP was induced as in (A). mEPSCs were recorded before and after cLTP induction by patch-clamp in the whole-cell configuration. (C) Sample traces obtained before and after cLTP in neurons transfected as indicated. (D) The histogram shows the relative potentiation of mEPSCs, compared to the mean

amplitude before cLTP (n=5 neurons per condition). Dotted line, 100% of basal amplitude (mean mEPSC amplitude before LTP). LTP was abolished in Chmp2b-deprived neurons (\*p=0.033 compared to control) and rescued by expression of Chmp2b\* (p=0.4).

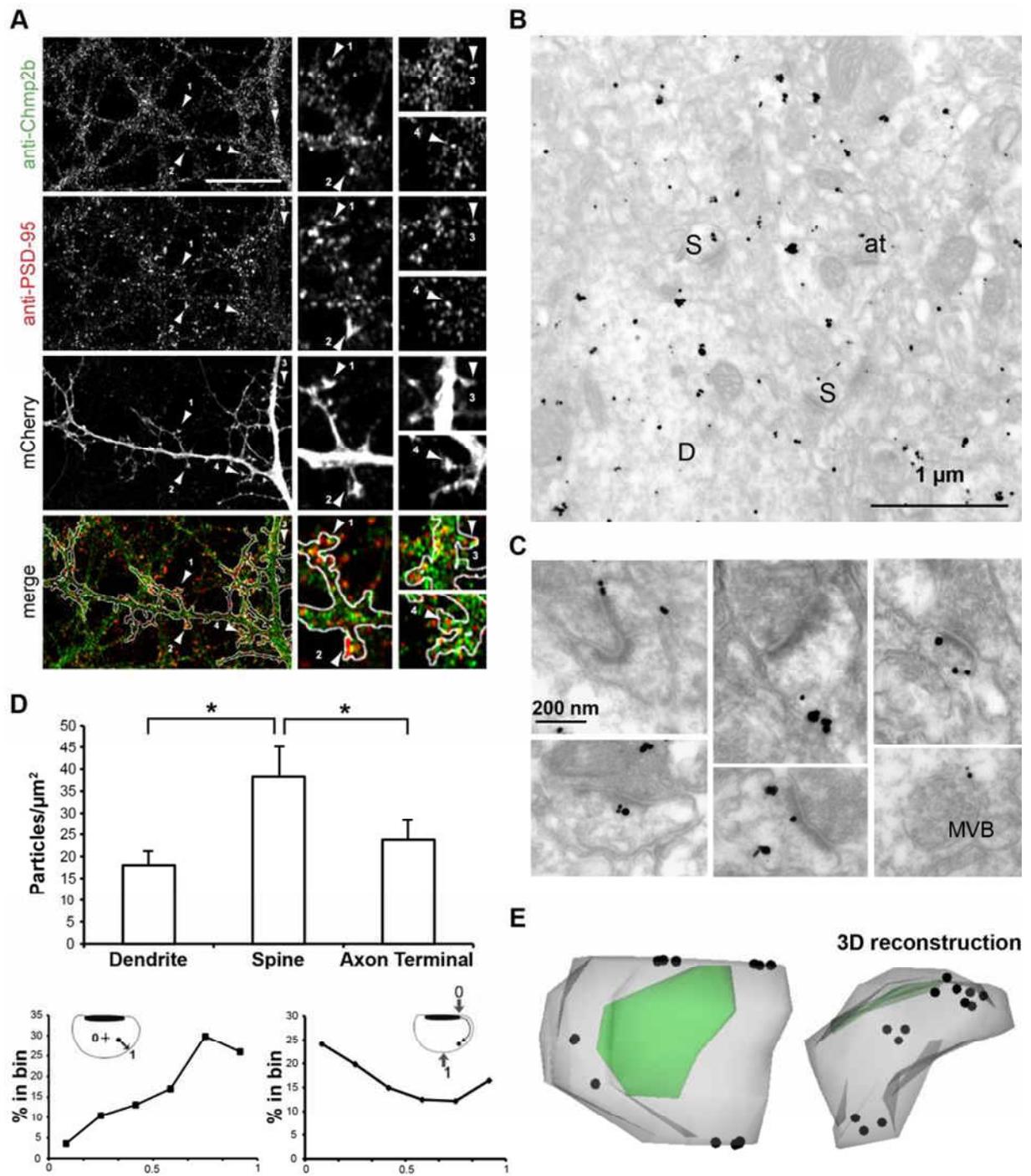
**Table 1. ESCRT-III subunits and post-synaptic scaffold proteins detected by mass spectrometry of the synaptic Chmp2b-containing complex**

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 table gives the total number of protein-derived peptides (spectral counts) as a semi-quantitative 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 in the table were detected in a total of three immunoprecipitation experiments.

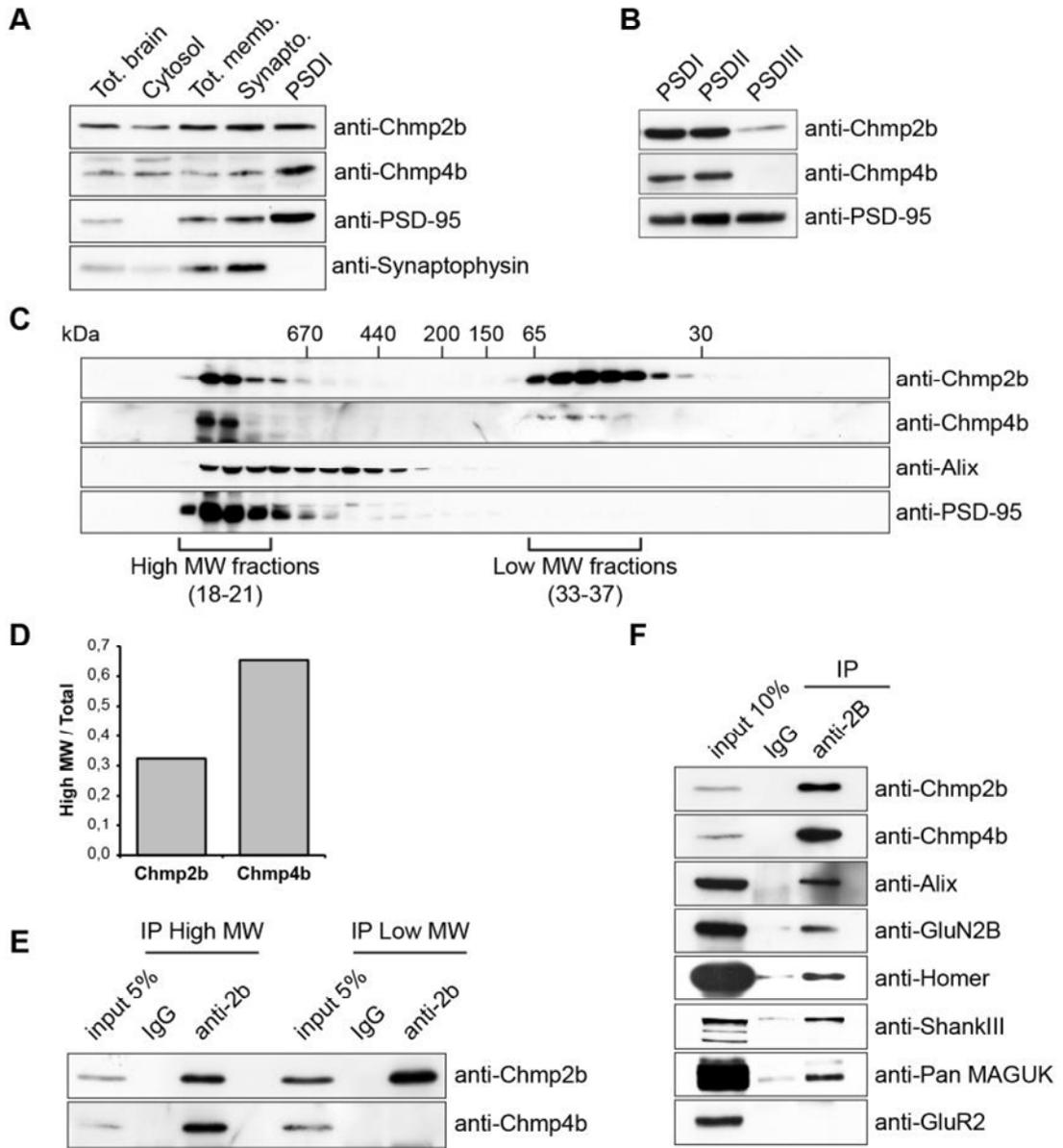
**Figure 1**



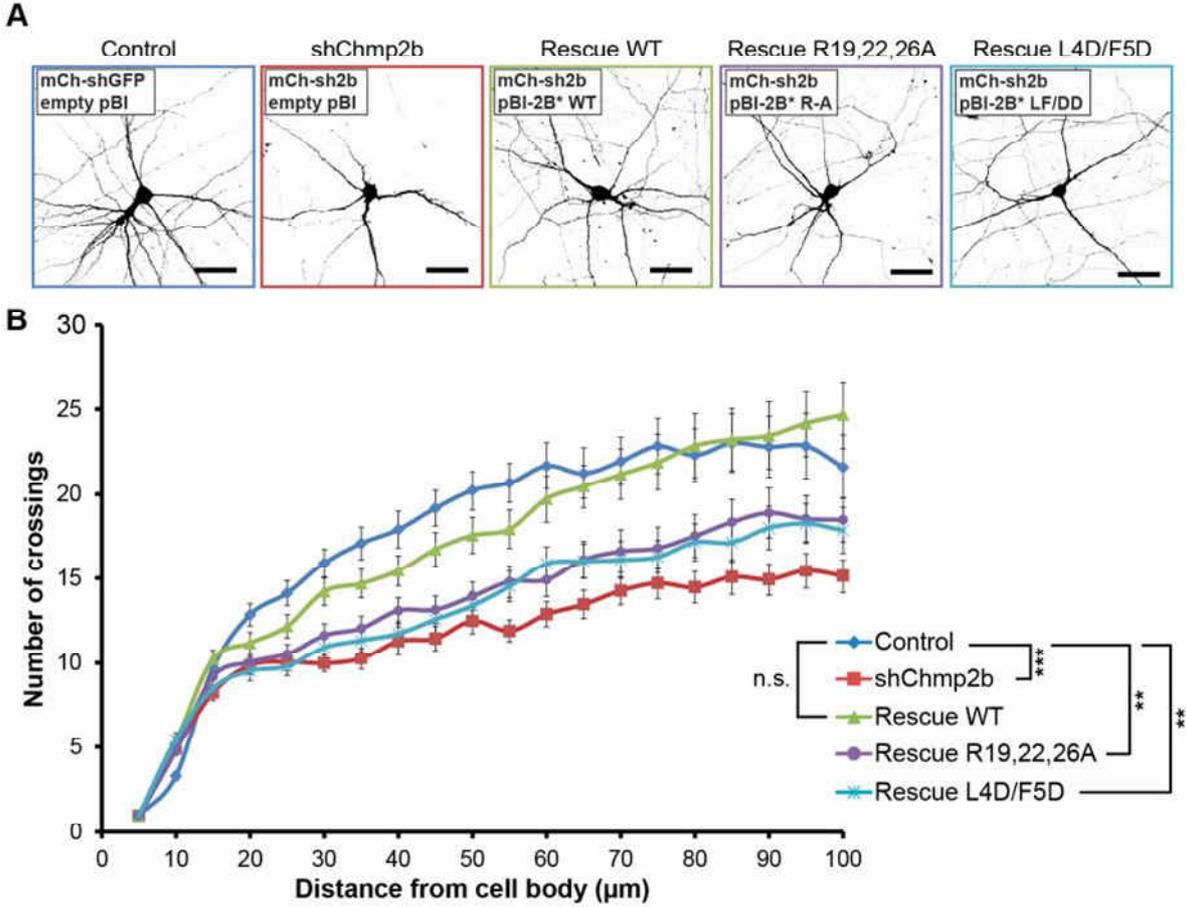
**Figure 2**



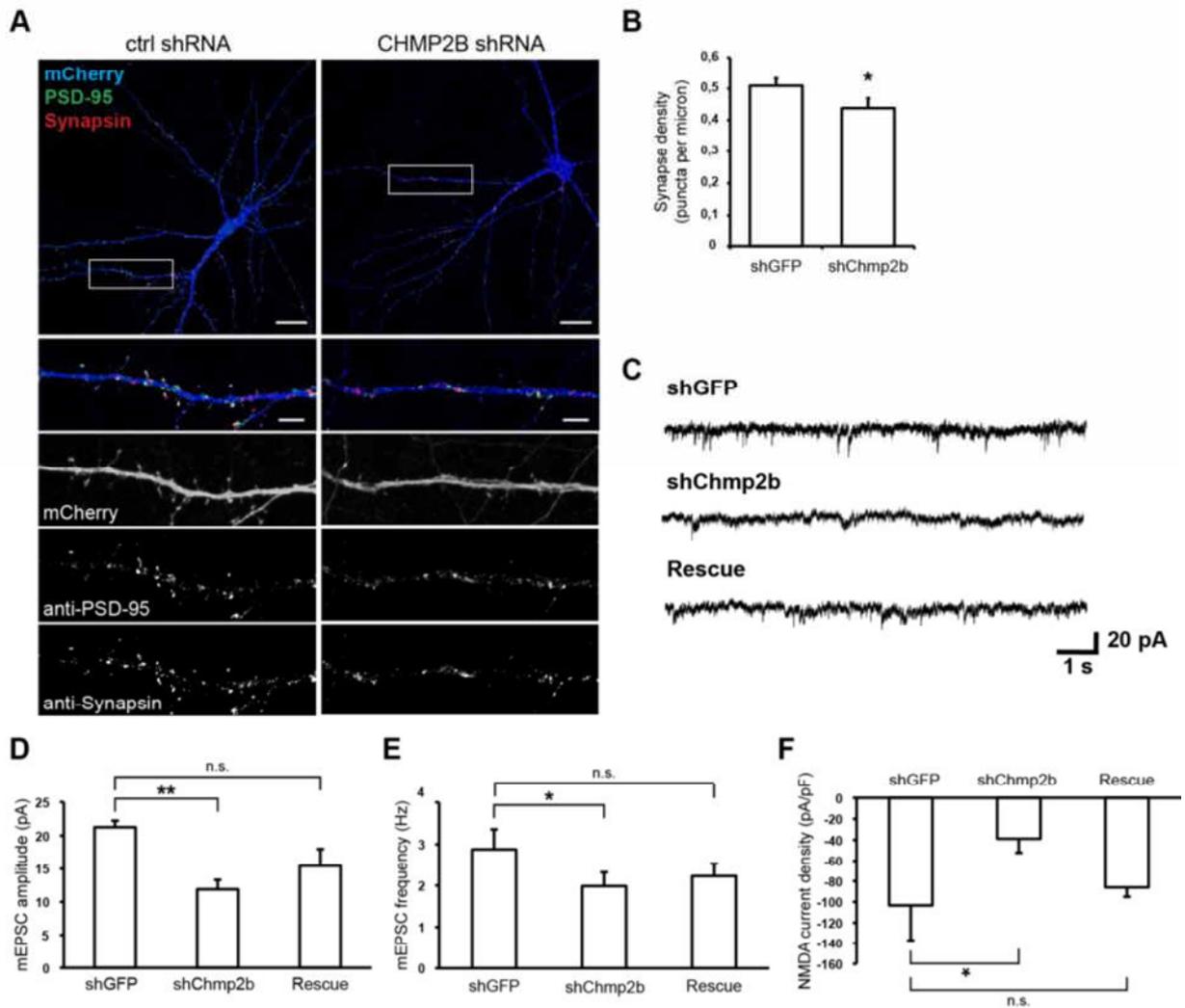
**Figure 3**



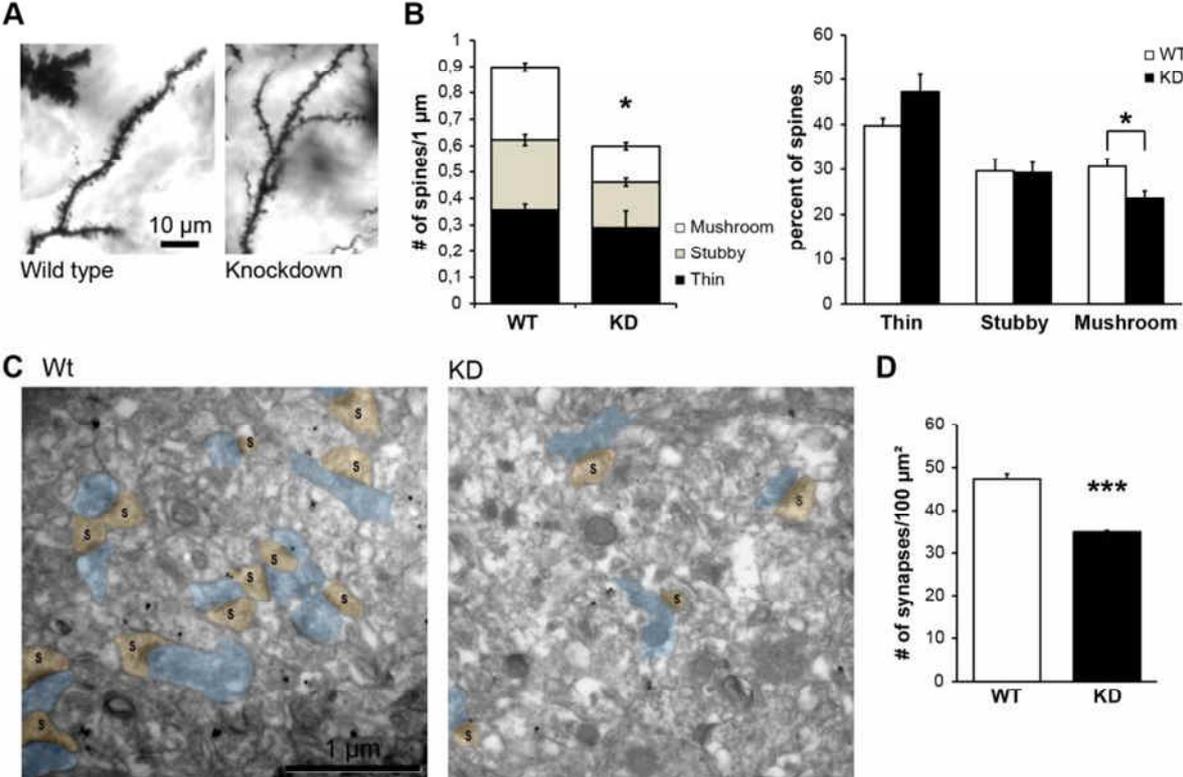
**Figure 4**



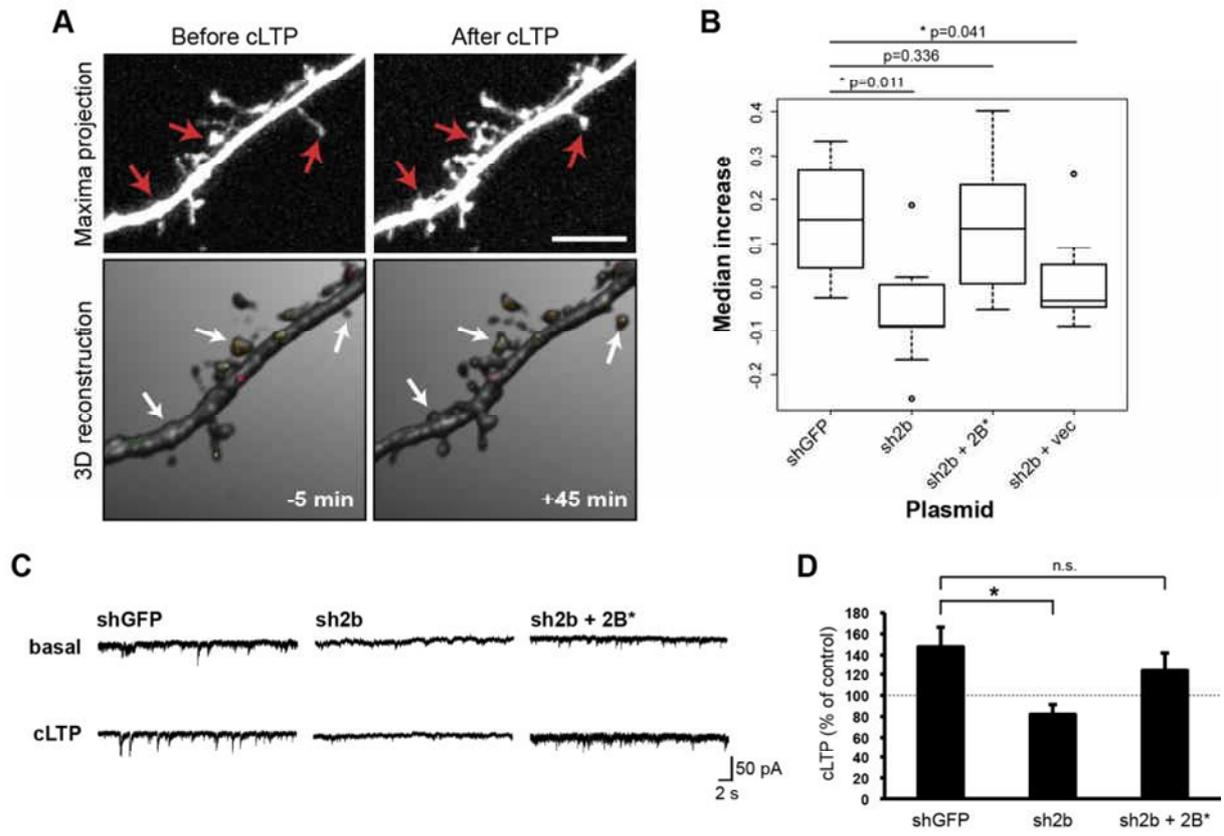
**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**



**Table 1**

Protein name	Accession	Spectral counts (IP HMW cplex)		Spectral counts (IP lysate)	
		Anti-Chmp2b IgG	Control IgG	Anti-Chmp2b IgG	Control IgG
CHMP2B	F1M8B7_RAT	2	0	2	0
CHMP2A	B2RZB5_RAT	8	0	4	0
CHMP4B	D4A9Z8_RAT	12	0	14	0
CHMP6	D3ZDR2_RAT	3	0	3	0
CHMP5	CHMP5_RAT	3	0	4	0
CHMP1A	D4AE79_RAT	4	0	4	0
CHMP3	CHMP3_RAT	8	0	3	0
ALIX	PDC6I_RAT	10	0	2	0
GLUN2B	NMDE2_RAT	2	0	10	0
PSD-95	DLG4_RAT	3	0	26	7
SHANK1	SHAN1_RAT	5	0	7	0
HOMER1	HOME1_RAT	6	0	11	3

## SUPPLEMENTARY DATA

### **Fig. S1 Specificity of Chmp2b and Chmp4b antibodies**

(A) HeLa cells were transfected using either a control siRNA, a Chmp4b-depleting siRNA, or a plasmid expressing Chmp4b. Transfected cell lysates were analyzed by Western immunoblotting with anti-Chmp4b antibody (Abcam ab105767). Actin was used as a loading control. The RNAi-induced decrease in the endogenous Chmp4b band is moderate but specific, supporting the identification of this band.

(B) Immunoblotting of recombinant MBP-tagged Chmp2b and Chmp4b (5 ng) showing that the polyclonal antibodies against Chmp2b (Abcam ab33174) and Chmp4b (ab105767) do not cross-react.

(C, D) Chmp2b immunoreactivity was revealed by the immunoperoxidase method in (C) a frontal section of the brain of a 5 week-old wild-type (Wt) mouse, or in (D) an equivalent section of a sibling Chmp2b Knock-down (KD) mouse.

(E) Chmp2b immunoreactivity detected with a different antibody (monoclonal, Covalab) shows similar distribution, but with weaker staining intensity.

(F) Electron micrographs showing immunoreactivity for Chmp2b in the stratum radiatum of wt and KD siblings, after pre-embedding labeling.

(G) 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).

### **Fig. S2. Expression and localization of Chmp2b in neurons**

(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) Top: dendritic segment dually stained by anti-Chmp2b and anti-PSD95 (see Fig.2). Bottom: same after randomization of Chmp2b staining pattern. The correlation coefficient ( $r$ ) between actual Chmp2b and PSD-95 staining intensities is much higher ( $p=0.000$ ) than the mean  $r$  value generated by randomized Chmp2b patterns.

(C) Electron micrograph showing a synapse in a section of mouse hippocampus subjected to post-embedding immunostaining with anti-Chmp2b antibody. Immunogold particles are visible on the edge but not the center of the PSD.

### **Fig. S3. Association of Chmp2b with large supramolecular complexes**

(A) Homogenates prepared from rat cortical neurons in culture (21 DIV) were fractionated and fractions analyzed as in Fig. 4A.

(B) Synaptoneuroosomes were solubilized with the indicated detergents, then centrifuged at high speed. The resulting supernatants and pellets were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

(C) Monomeric recombinant His-tagged Chmp2b was incubated with either 1% Triton X-100 or 1% DOC, then 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.

(D-E) Quantitation of Chmp2b in synaptoneuroosomes. (D) The indicated amounts of purified recombinant MBP-tagged Chmp2b and of total synaptoneurosome protein were analyzed by immunoblotting with anti-Chmp2b antibody. (E) Band intensities were measured by densitometry and the proportion of Chmp2b in synaptic protein was estimated from the standard curve.

(F) Synaptoneurosome extracts were immunoprecipitated with anti-Chmp2b antibody or control IgG. The immunoprecipitates and the unbound fractions were analyzed by immunoblotting. Most of the synaptic Chmp4b co-precipitated with Chmp2b.

### **Fig. S4. Characterization of Chmp2b shRNA and Chmp2b mutants used in rescue experiments**

(A) N2A cells were transfected with the indicated combinations of RNAi-inducing plasmids and rescue plasmids (see Methods). The cells were lysed and analyzed by immunoblotting with anti-Chmp2b antibody.

(B) HEK-293T cells were transfected with Flag-tagged Chmp4b plasmid, alone or together with HA-tagged Chmp2b<sup>WT</sup> or Chmp2b<sup>R19,22,26A</sup>. Anti-HA immunoprecipitates prepared from the transfected cells were analyzed by immunoblotting with anti-Flag or anti-HA antibodies.

(C) HeLa cells were co-transfected with HA-tagged Chmp2b<sup>WT</sup> or Chmp2b<sup>R19,22,26A</sup> together with Chmp4b-Flag. Cells were stained by dual immunofluorescence with anti-HA and anti-Flag antibodies, then imaged by confocal microscopy. Insets: high magnification of the boxed regions. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ .

(D) HEK-293T cells were transfected with Flag-tagged Chmp2b<sup>WT</sup> or Chmp2b<sup>L4D/F5D</sup>. The transfected cells were homogenized, the membrane (P) and cytosolic (S) fractions were separated by centrifugation, and equivalent volumes of homogenates were analyzed by immunoblotting with anti-Flag antibody.

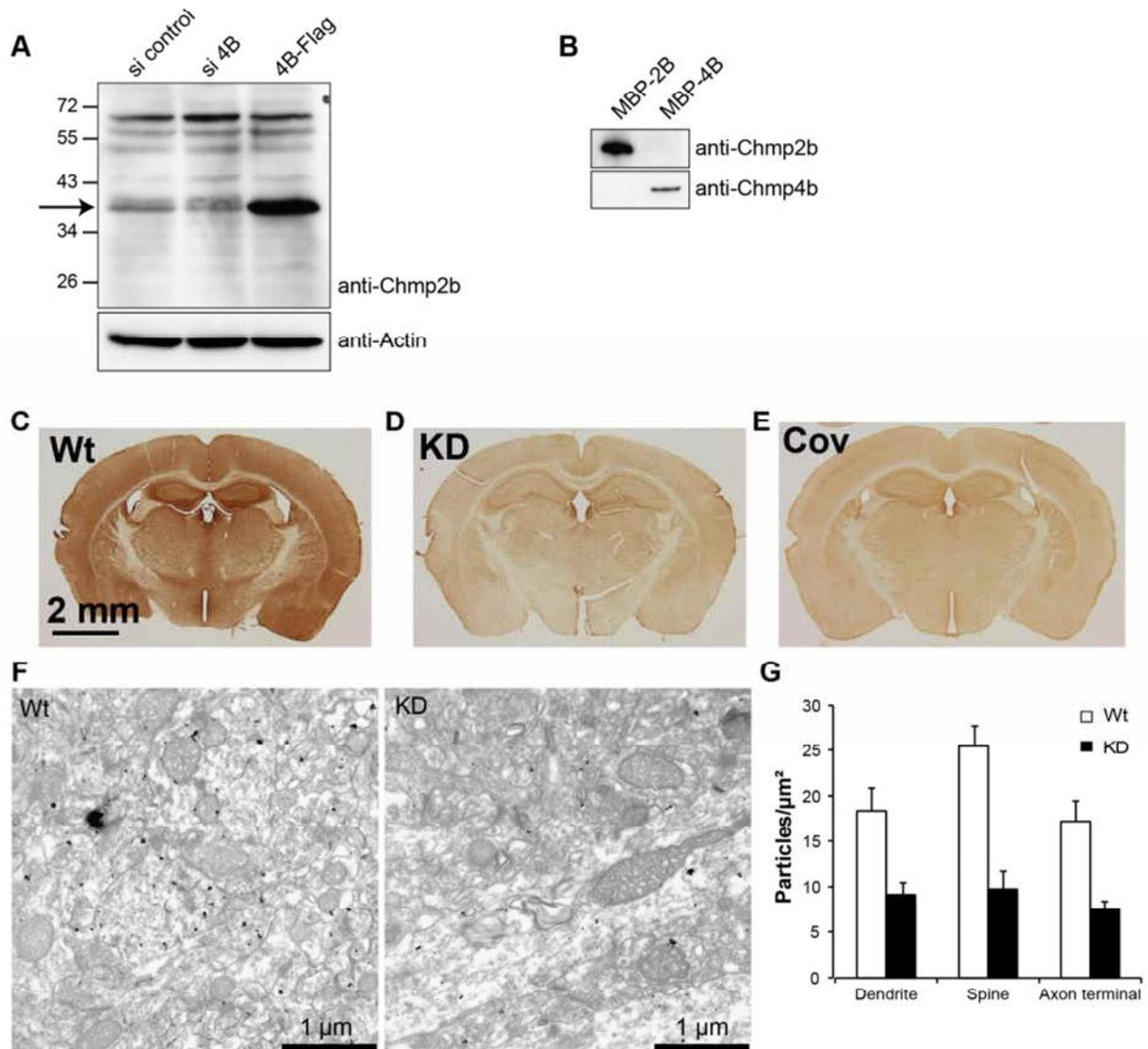
**Table S1. Plasmids and constructs used in this study.**

**Table S2. Antibodies and dilutions used in this study.**

**Table S3. Protein species identified by mass spectrometry of Chmp2b immunoprecipitate derived from the synaptic HMW complex.** 428 candidate proteins detected in the sample were filtered as described in Materials and Methods, yielding a list of 134 proteins. 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 IP. Red color: ESCRT-III proteins; green: actin cytoskeleton and associated proteins; blue: post-synaptic scaffolds. Green background codes for higher enrichment in the immunoprecipitate. Grey background: SSC number insufficient for positive identification.

**Video.** Animated 3D view of the reconstructed spine in Fig. 2E.

**Figure S1**

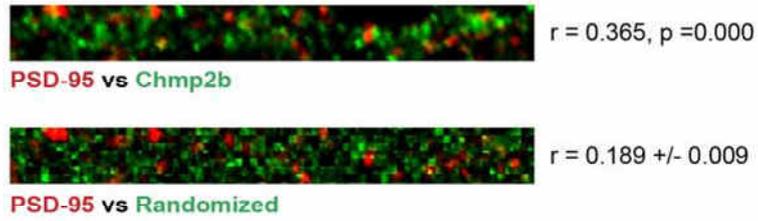


**Figure S2**

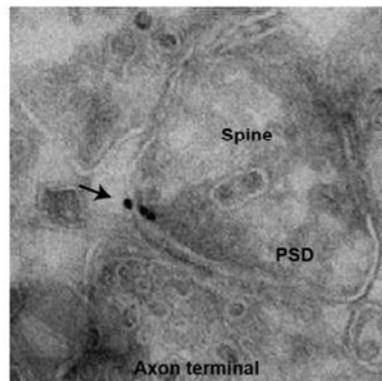
**A**



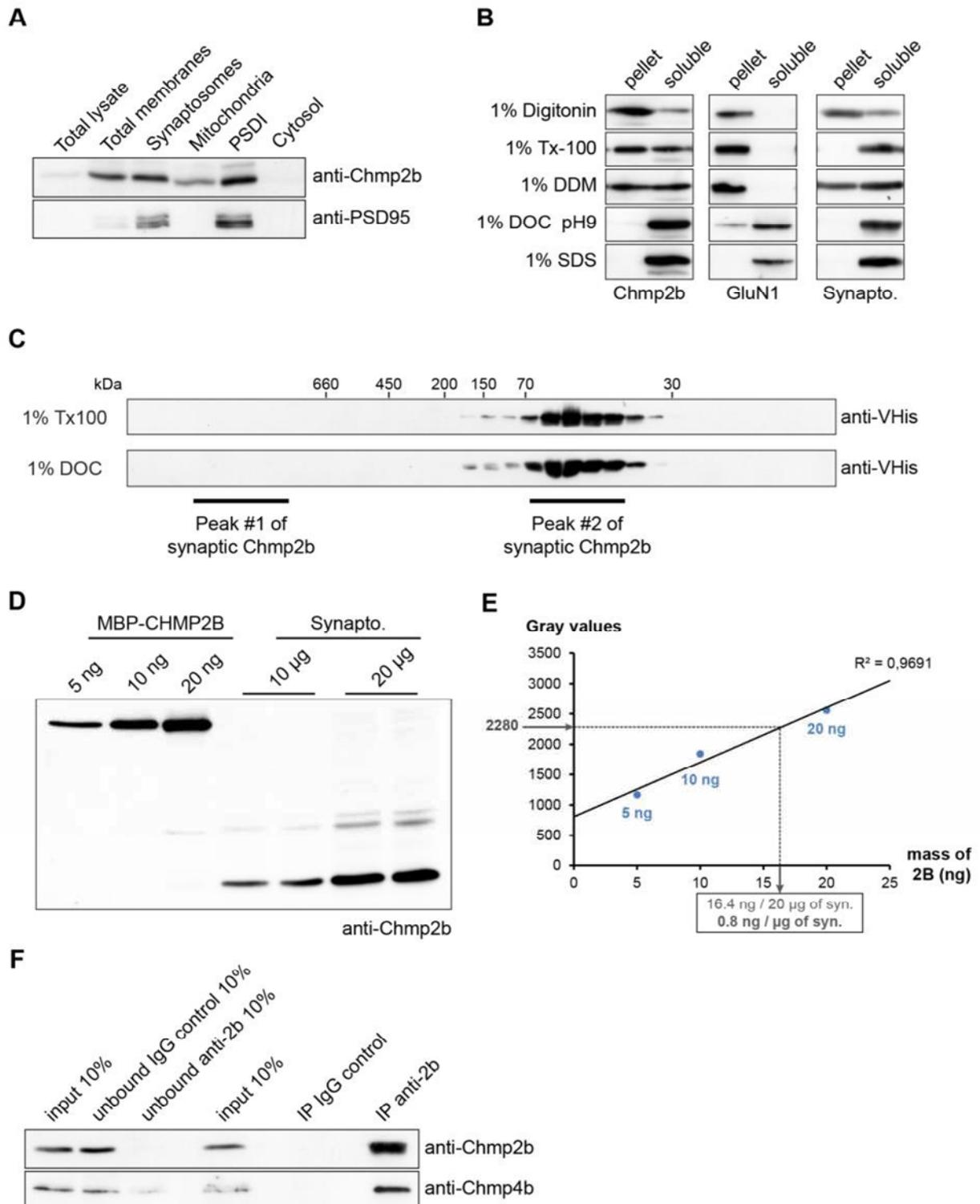
**B**



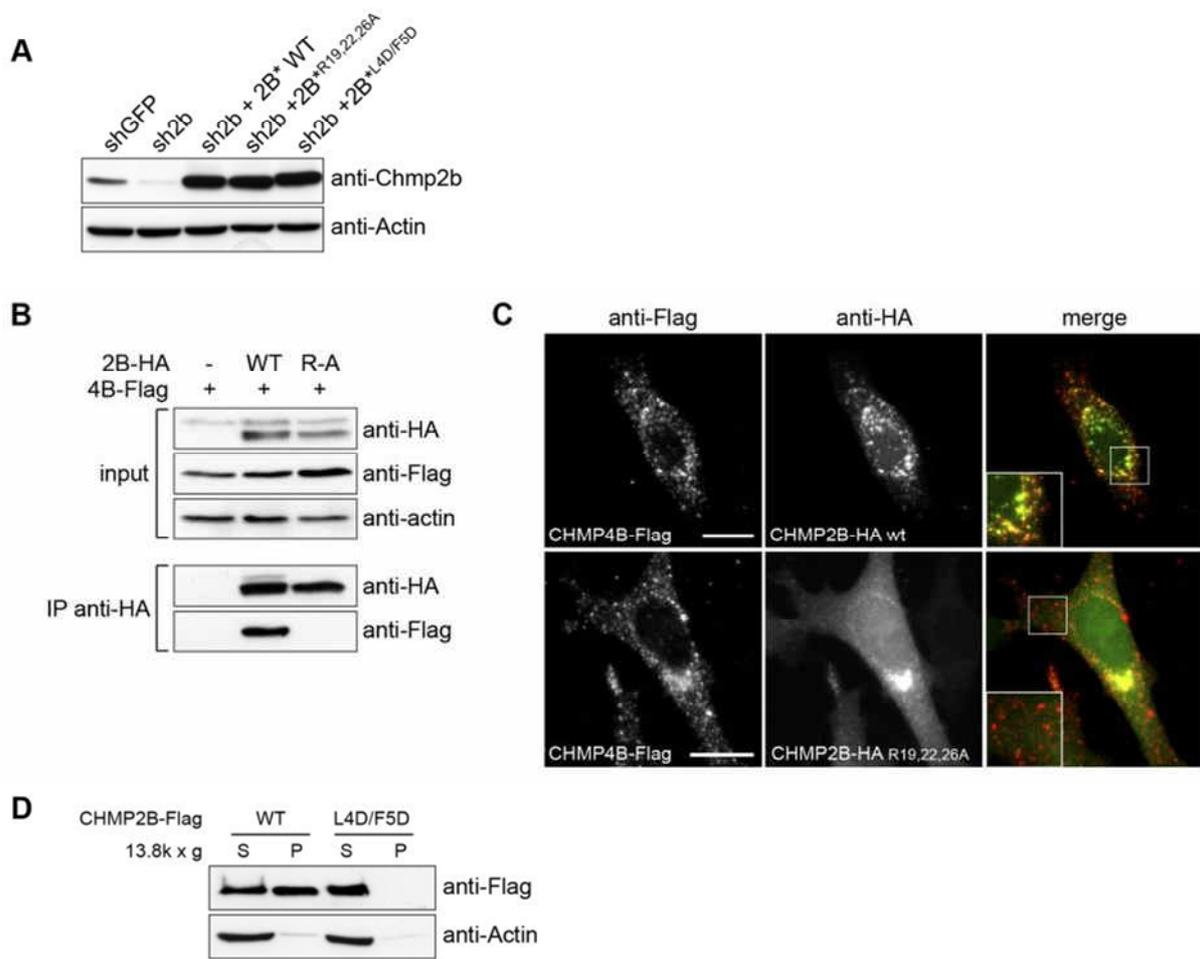
**C**



**Figure S3**



**Figure S4**



**Table S1**

Plasmid name	Technique	Cloning sites	Feature	Tags	Source
pIRES2-EGFP					
pIRES2-EGFP-CHMP2B WT	In-Fusion (Clontech)	XhoI, XhoI	RNAi res.	C-term FLAG	Clontech
pIRES2-EGFP-CHMP2B R19/22/26A	In-Fusion (Clontech)	XhoI, XhoI	RNAi res.	C-term FLAG	
pBI-CMV3					
pBI-CMV3-CHMP2B WT	In-Fusion (Clontech)	BamHI, HindIII	RNAi res.		
pBI-CMV3-CHMP2B R19/22/26A	In-Fusion (Clontech)	BamHI, HindIII	RNAi res.		
pBI-CMV3-CHMP2B L4D/F5D	In-Fusion (Clontech)	BamHI, HindIII	RNAi res.		
pSuper-mCherry					(Belly et al., 2010)
pSuper-mCherry shRNA-CHMP2B		HindIII, BglII			(Belly et al., 2010)
pSuper-mCherry shRNA-GFP		HindIII, BglII			
pCDNA3.1-CHMP2B WT	Topo (Life Technologies)			C-term HA	
pCDNA3.1-CHMP2B R19/22/26A	Topo (Life Technologies)			C-term HA	
pCDNA3.1-CHMP4B	Topo (Life Technologies)			C-term FLAG	(Bodon et al., 2011)

**Table S2**

Antibody	Species	Company (ref)	Dilution	
			IF	WB
anti-CHMP2B	rabbit poly	Abcam (ab33174)	500	10000
anti-CHMP4B	rabbit poly	Abcam (ab105767)	500	2000
anti-Alix	rabbit poly	Covalab (ab0204)		6000
anti-PSD95	mouse mono	NeuroMab (73-028)	200	4000
anti-GluN1	mouse mono	Synaptic Systems (114011)	200	4000
anti-Synaptophysin	mouse mono	Merck Millipore (MAB5258)		10000
anti-HA	mouse mono	Cell Signaling (2367)	200	5000
anti-HA	rabbit poly	Sigma-Aldrich (H6908)		5000
anti-Flag	mouse mono	Sigma-Aldrich (F3165)	1000	10000
anti-Flag	rabbit poly	Sigma-Aldrich (F7425)	1000	5000
anti-Actin	mouse mono	Millipore (MAB1501R)		20000
anti-Tubulin	mouse mono	gift from A. Andrieux's lab		20000
anti-Pan MAGUK	mouse mono	NeuroMab (75-029)		4000
anti-GluN2B	mouse mono	NeuroMab (75-097)		4000
anti-GluR2	mouse mono	Millipore (MABN71)		5000
anti-ShankIII	rabbit poly	Santa Cruz (30193)		1000
anti-Homer	mouse mono	Santa Cruz (17842)		2000
anti-mouse HRP	goat polyclonal	Jackson (115-035-166)		20000
anti-rabbit HRP	goat polyclonal	Jackson (115-035-044)		20000
anti-mouse Alexa488	goat polyclonal	Molecular Probes (A-11029)	1500	
anti-mouse Alexa594	goat polyclonal	Molecular Probes (A-11032)	1500	
anti-mouse cya5	goat polyclonal	Jackson (115-175-146)	1000	
anti-rabbit Alexa488	goat polyclonal	Molecular Probes (A-11034)	1500	
anti-rabbit Alexa594	goat polyclonal	Molecular Probes (A-11037)	1500	
anti-rabbit cya5	goat polyclonal	Jackson (111-175-144)	1000	

**Table S3**

Table S3.xls

**Video S1**

Video S1.avi



### 3. Purification d'interacteurs synaptiques de CHMP2B

#### 3.1. Objectif et démarche expérimentale

La machinerie ESCRT-III est connue pour s'assembler au niveau de divers substrats membranaires, chez les mammifères (membrane intracellulaires et membrane plasmique), pour participer à des processus cellulaires bien distincts. Chaque mécanisme faisant intervenir ESCRT-III nécessite, de fait, la présence d'interacteurs spécifiques capables de recruter les sous-unités au niveau où la déformation doit avoir lieu et de protéines régulatrices capables de contrôler finement la polymérisation du complexe. Cependant peu de partenaires (hors sous-unités entre elles) ont été identifiés et leur rôle exact reste le plus souvent à déterminer. Nous pouvons lister les protéines Alix, Tsg101, Cep55, Spastin, AMSH, Vps25, ARRDC, Gag, MITD1, CC2D1A Vps4A et Vps4B. En ce qui concerne la sous-unité CHMP2B, seules CHMP3 (Tsang et al., 2006), CHMP2B lui-même, et les ATPases Vps4A et B (Stuchell-Brereton et al., 2007) sont reconnus comme des interacteurs directs.

Plusieurs hypothèses demeurent concernant les dysfonctionnements cellulaires causés par la mutation du gène *chmp2b*, qui conduisent à la mort neuronale dans la FTD (toxicité liée à une perturbation de l'autophagie (Lee et al., 2007), blocage de la fusion entre endosomes tardifs et lysosomes (Urwin et al., 2010), altérations morphologiques et fonctionnelles des épines dendritiques (Belly et al., 2010)). Ces processus cellulaires correspondent soit à des fonctions en marge de ce qui est connu pour CHMP2B et le complexe ESCRT-III (phénomènes de fusion/fission sur d'autres compartiments intracellulaires), soit à une nouvelle fonction, non encore décrite (morphogénèse de la membrane plasmique, dans le cas des épines dendritiques). Toute l'interprétation de ces dysfonctionnements a été faite, jusqu'à présent, par l'extrapolation des travaux réalisés *in vitro* et sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, les mécanismes moléculaires potentiellement altérés par les mutants de CHMP2B restent obscurs. Un des enjeux majeurs, dans la compréhension de la FTD-3, est donc de déterminer quelles sont les voies de signalisation, ou assemblages moléculaires auxquels se rattachent CHMP2B et le complexe ESCRT-III dans les neurones.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pris le problème concernant CHMP2B dans ce sens-là. Au lieu de nous concentrer sur les perturbations causées par les mutants, nous avons cherché à comprendre quel pouvait être le rôle de la protéine CHMP2B sauvage dans les neurones. Les résultats présentés jusque-là, dans ce manuscrit, suggèrent que CHMP2B fait partie d'un complexe de haut poids moléculaire dans les synapses et que la protéine est impliquée dans des phénomènes liés à la plasticité morphologique et fonctionnelle des épines dendritiques. Nous émettons l'hypothèse que cette protéine puisse jouer un rôle morphogénétique direct au niveau de la membrane post-synaptique. Afin de vérifier cette hypothèse et de comprendre à quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) connu(s) se rattache CHMP2B, nous avons recherché biochimiquement ses partenaires protéiques dans les synapses. Pour cela, nous avons combiné différentes approches de chromatographie d'affinité avec une analyse des échantillons en spectrométrie de masse MS/MS (collaboration Yohann

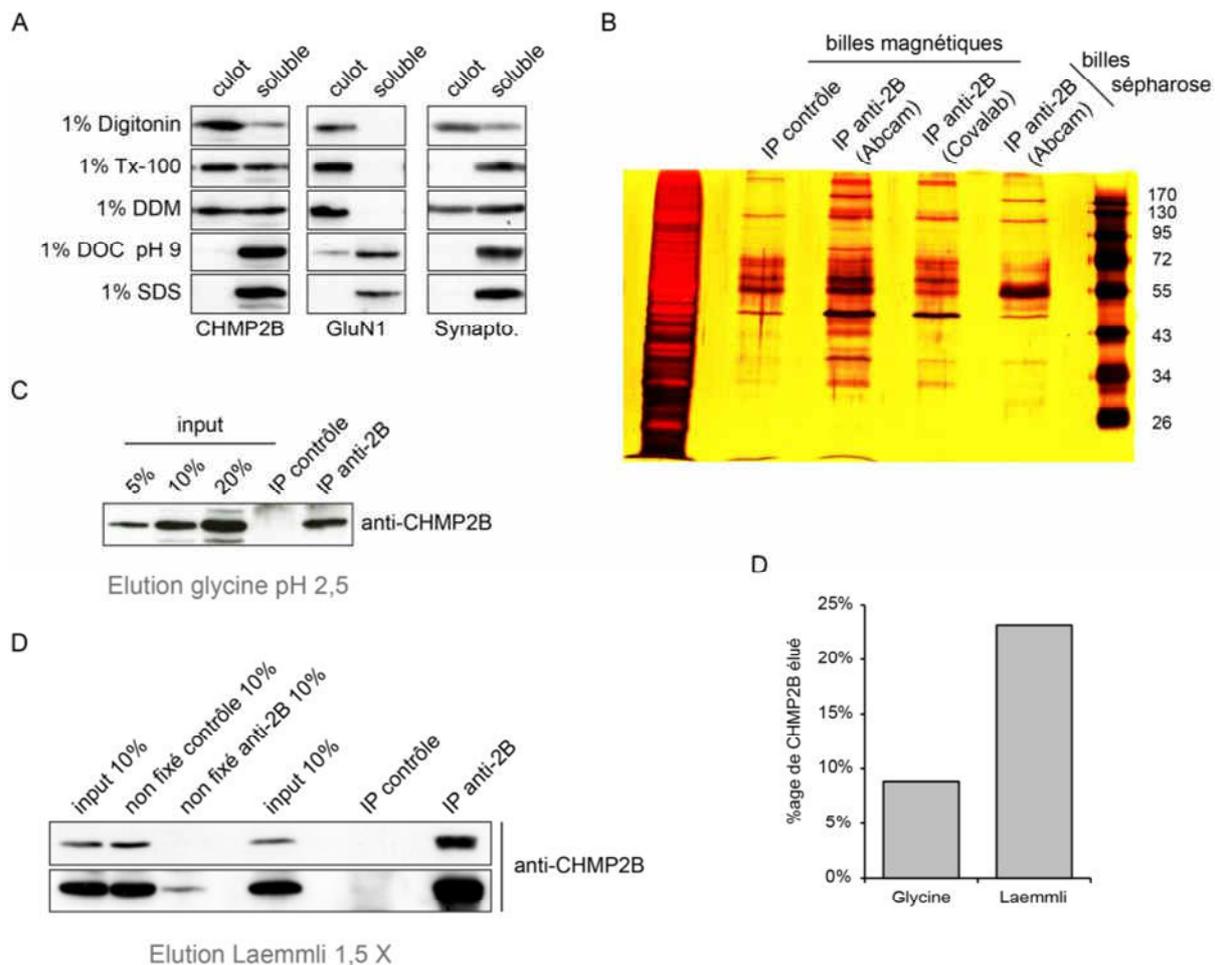
Couté, équipe EDyP, CEA, Grenoble). Les expériences d'immunoprécipitation et de pull-down ont été réalisées à partir de synaptosomes purifiés à partir de cerveaux de rats adultes. Nous avons également tenté d'améliorer la spécificité de notre analyse en réalisant des immunoprécipitations à partir de synaptosomes de souris knockdown et sauvages pour CHMP2B (don généreux de Adrian Isaacs, MRC, Londres, (Ghazi-Noori et al., 2012)).

## 3.2. Immunoprécipitation(s) de CHMP2B à partir de synaptosomes de rat

### 3.2.1. Mise au point des conditions d'IP

Nous avons tout d'abord recherché les meilleures conditions pour pouvoir immunoprécipiter CHMP2B, à partir de synaptosomes de rat. Les synaptosomes ont été solubilisés dans un tampon classique pour les immunoprécipitations (50 mM Tris ; 150 mM NaCl) contenant différents détergents de stringence croissante. La totalité de la sous-unité CHMP2B a été extraite des membranes synaptiques après traitement avec 1% de déoxycholate (DOC) à pH 9,0 ou 1% de SDS. En utilisant des détergents plus doux (TritonX-100 et n-Dodecyl-beta-D-Maltoside), une fraction substantielle de CHMP2B est restée insoluble (Figure 42A). Nous avons opté pour la solubilisation en 1% DOC à pH 9,0 qui présentait l'avantage d'extraire massivement CHMP2B, ainsi que d'autres protéines associées à la densité post-synaptique, comme la sous unité GluN1 du récepteur NMDA. Il semblerait que cette solubilisation préserve les interactions intermoléculaires de CHMP2B, comme l'a montré la purification d'un complexe de haut poids moléculaire contenant cette protéine, dans ces conditions (Article 2 ; Figure 4).

Nous disposions de deux anticorps polyclonaux de lapin spécifiques de CHMP2B (ab33174 de la société Abcam et anti-CHMP2B que nous avons développé en collaboration avec la société Covalab). Ces deux anticorps étaient capables d'immunoprécipiter CHMP2B endogène à partir de cellules en culture. Afin de diminuer le bruit de fond associé à l'élution des IgG de manière concomitante avec les échantillons, nous avons couplé de manière covalente les anticorps sur des billes de protéine A sépharose ou magnétiques. La coloration au nitrate d'argent a mis en évidence la présence de bandes spécifiques dans les échantillons d'immunoprécipitation (IP) de CHMP2B, par rapport au contrôle, et cela pour les deux anticorps utilisés (Figure 42B). La coloration à l'argent n'a pas permis de visualiser de bandes correspondant à CHMP2B (sur la base du profil de migration de la protéine en SDS-PAGE). Nous avons donc vérifié le rendement de l'IP par Western-Blot. L'élution à la glycine acide n'a permis de récupérer que 9% du CHMP2B synaptique (Figure 42C et E). Nous avons émis l'hypothèse que ce faible rendement pouvait provenir d'une difficulté à éluer CHMP2B des anticorps de haute affinité. En effet, une élution dans du tampon Laemmli 1,5 X bouillant a augmenté le rendement d'immunoprécipitation jusqu'à 23% (Figure 42D et E).



**Figure 42. Mise au point des conditions expérimentales pour l'immunoprécipitation de CHMP2B à partir de synaptosomes de cerveau de rat.**

(A) Solubilisation de CHMP2B à partir des synaptosomes. Les synaptosomes sont traités avec un tampon d'extraction (50 mM Tris pH 7,4 ; 150 mM NaCl) contenant différents détergents, listés sur la partie gauche. Après centrifugation à 20 000 x g, le culot et la fraction soluble sont déposés en équivalent volume sur gel SDS-PAGE et analysées par Western-Blot avec les anticorps indiqués (*Synapto.* : Synaptophysine).

(B) Immunoprécipitation de CHMP2B à partir des synaptosomes. Les synaptosomes sont solubilisés dans le tampon d'extraction contenant 1% de DOC à pH 9,0, puis centrifugés à 20 000 x g. La fraction soluble est incubée avec des billes de protéine A (magnétiques ou de sépharose), préalablement couplées de manière covalente avec des anticorps polyclonaux anti-CHMP2B (Abcam ou Covalab) ou des IgG de lapin non spécifiques. Après lavage, les protéines précipitées sont éluées avec 100 mM de glycine pH 2.5 et analysées sur gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent.

(C) Analyse en Western-Blot de l'IP anti-CHMP2B (billes magnétiques et anticorps Abcam) après élution avec 100 mM de glycine pH 2.5.

(D) Analyse en Western-Blot de l'IP anti-CHMP2B (billes magnétiques et anticorps Abcam) après élution avec du tampon Laemmli 1,5 X, suivi d'une ébullition pendant 10 min.

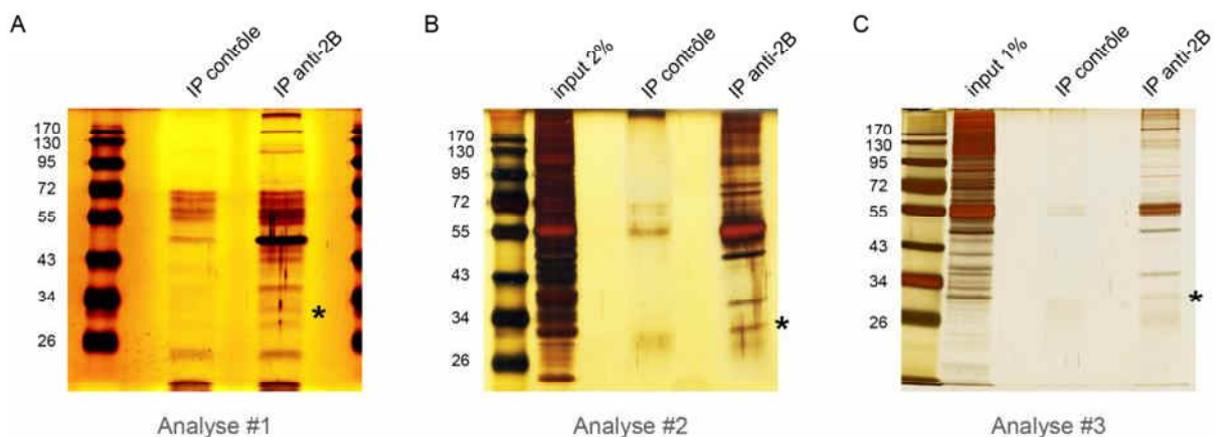
(E) Histogramme représentant le rendement des éluions avec 100 mM de glycine ou du Laemmli 1,5 X. Les quantifications de densitométrie des bandes ont été effectuées avec ImageJ.

Cette approche nous a permis d'optimiser les conditions expérimentales de cette immunoprécipitation, en vue d'analyser les échantillons par spectrométrie de masse. Nous avons opté pour l'utilisation de l'anticorps polyclonal d'Abcam couplé de manière covalente à

des billes de protéine A magnétiques. L'élution au Laemmli semblait également plus adaptée, car elle améliorait le rendement d'élution sans augmenter le bruit de fond et sans détacher les IgG couplées aux billes magnétiques.

### 1.1.1. Analyse protéomique par spectrométrie de masse

L'identification des protéines co-précipitées avec CHMP2B a été effectuée par spectrométrie de masse (collaboration Yohann Couté, équipe EDyP, CEA, Grenoble). Pour chaque expérience, la composition de l'échantillon d'IP anti-CHMP2B a été comparé à celle d'un échantillon contrôle (IP avec des IgG de lapin non spécifiques de l'antigène). Les partenaires potentiels ont été identifiés en mesurant le rapport du nombre de peptides spécifiques d'une protéine donnée entre l'échantillon d'intérêt et le contrôle. Nous avons effectué trois analyses protéomiques successives afin de valider la reproductibilité de nos expériences et d'exclure un maximum de faux positifs, qui sont une conséquence de la grande sensibilité des techniques modernes de spectrométrie de masse (MS). Même si la technique de MS utilisée n'est que semi-quantitative, la reproduction des expériences nous a permis d'isoler les partenaires les plus probables, c'est à dire ceux qui possèdent le plus grands nombre de peptides spécifiques.



**Figure 43.** Complexité apparente des échantillons analysés en spectrométrie de masse.

(A, B, C) Gels SDS-PAGE colorés au nitrate d'argent mettant en évidence les protéines spécifiquement co-précipitées par l'anticorps anti-CHMP2B. L'astérisque indique la bande supposée correspondre à CHMP2B. Pour chacune des trois expériences, un échantillon d'IP anti-CHMP2B et un échantillon d'IP contrôle ont été analysés en spectrométrie de masse.

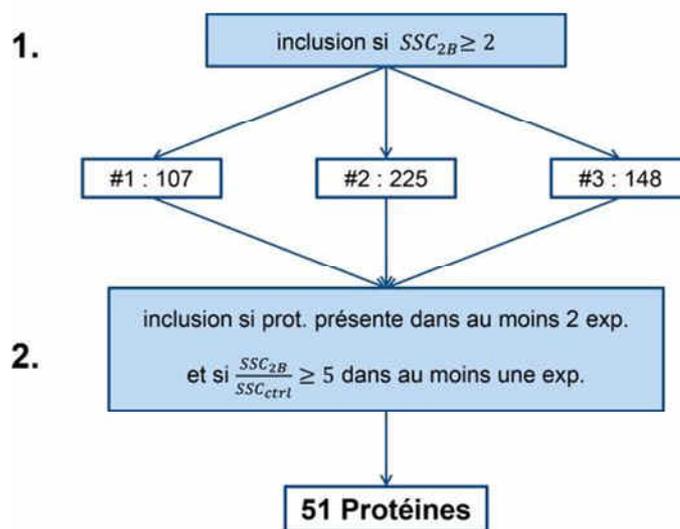
Les améliorations suivantes ont été apportées au protocole d'immunopurification afin de diminuer le bruit de fond : (B) pré-adsorption préalable sur des billes couplées à des anticorps non spécifiques ; (C) idem + purification préalable du complexe protéique contenant CHMP2B sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Sephaclyl S-300 HR). Les lavages du (C) sont effectués avec une concentration croissante de NaCl (jusqu'à 500 mM).

Tout en restant dans des conditions d'extraction, d'immunoprécipitation et d'élution similaires, nous avons effectué certaines optimisations séquentielles, afin de diminuer le bruit de fond. La complexité apparente des échantillons a toujours été vérifiée, au préalable, par

coloration d'un gel SDS-PAGE au nitrate d'argent. L'analyse #1 (Figure 43A) correspondait au protocole de base présenté précédemment. Nous avons pu observer que la pré-incubation des échantillons sur des billes porteuses d'IgG non spécifiques permettait de diminuer significativement le nombre de protéine éluées dans le contrôle ; analyse #2 (Figure 43B). Pour l'analyse #3, deux améliorations supplémentaires ont été apportées. Les synaptosomes solubilisés ont été d'abord purifiés sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Sephacryl S-300 HR, GE Healthcare). Seules les fractions 18 à 21 (34 à 42 mL d'élution), qui correspondent au CHMP2B sous forme de complexe (voir Article 2 ; Figure 4), ont été poolées et soumises à l'IP. L'IP et les lavages ont été effectués dans des conditions plus stringentes (250 mM de NaCl au lieu de 150 mM pour l'IP et jusqu'à 500 mM de NaCl pour les lavages). La diminution du nombre de bandes dans le témoin, comme dans l'IP CHMP2B, semble traduire une plus grande spécificité (Figure 43C).

### 1.1.2. Partenaires identifiés

L'analyse en spectrométrie de masse est très sensible et des milliers de partenaires potentiels ont été identifiés dans nos échantillons. Afin de pouvoir comparer les 3 expériences effectuées et donc d'isoler les partenaires les plus significativement représentés nous avons filtré les résultats. Les paramètres d'inclusion et d'exclusion ont été basés sur le rapport du nombre de spectres spécifiques (SSC : « specific spectral counting ») pour une protéine donnée, entre l'échantillon d'IP 2B et l'échantillon contrôle.



**Figure 44.** Une proportion significative des protéines sont identifiées dans au moins deux expériences.

Un double tri, basé sur les valeurs de SSC a été effectué parmi la liste des protéines identifiées. Pour chaque expérience seules les protéines avec un  $SSC_{2B} > SSC_{ctrl}$  et un  $SSC_{2B}$  brut  $\geq 2$  (1). Ensuite nous avons déterminé quelles protéines étaient redondantes en listant celles qui étaient présentes dans la liste d'au moins deux expériences et qui possédaient un rapport  $SSC_{2B}/SSC_{ctrl} \geq 5$  dans au moins une des expérience.

Pour chaque expérience, nous avons appliqué un premier filtre et sélectionné les protéines ayant un  $SSC_{2B} > SSC_{ctrl}$  et un  $SSC_{2B} \text{ brut} \geq 2$  (Figure 44). Nous obtenons 107 protéines pour l'analyse #1, 225 pour l'analyse #2 et 148 pour l'analyse #3. Nous avons ensuite analysé la redondance des protéines dans les 3 expériences. Les protéines considérées comme redondantes sont celles qui ont été identifiées dans au moins deux expériences et qui possédaient un rapport  $SSC_{2B}/SSC_{ctrl} \geq 5$  dans au moins une des expériences (Figure 44). Ces critères d'inclusion assez larges nous ont permis d'isoler 51 protéines que nous considérons comme co-précipitées de manière reproductible avec CHMP2B. Ces protéines, ainsi que le nombre de peptides associé, sont listées dans le Tableau 8.

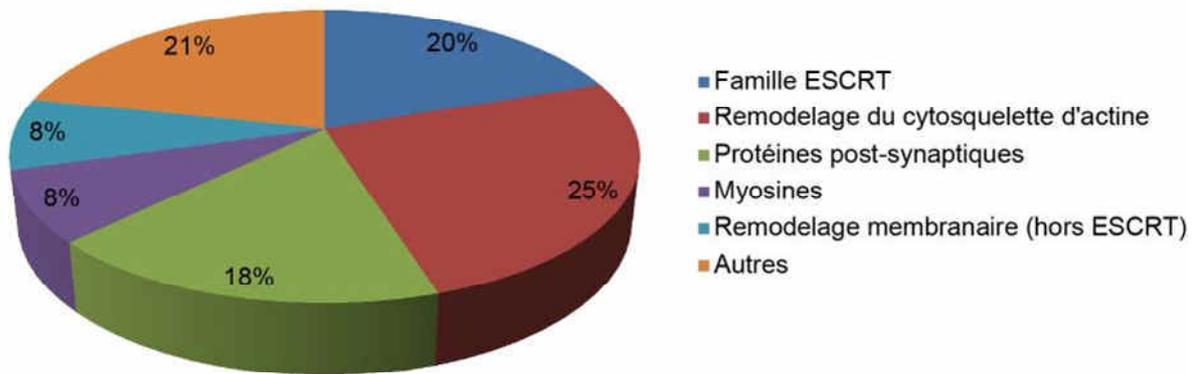
De manière intéressante, les protéines co-précipitées les plus significativement représentées ont pu être classées en plusieurs groupes fonctionnels ou grandes familles de protéines. Les protéines de la famille ESCRT et en particulier 7 des sous-unités du complexe ESCRT-III ont été co-précipitées dans les 3 expériences (Figure 45). Un autre groupe fonctionnel (25% des protéines co-précipitées, Figure 45A) concernait des protéines associées au cytosquelette d'actine. Ces protéines sont toutes impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine requis pour divers mécanismes d'adhésion, de migration et de maintien de l'architecture cellulaire. Parmi ces protéines, nous pouvons isoler des protéines de coiffe de l'actine (CapZ $\alpha$ 1, CapZ $\alpha$ 2 et CapZ $\beta$ ), des membres du complexe Arp2/3 (Arp2, Arp3, P20, P16) et de deux de ses activateurs, les complexes WASH (sous-unités CapZ) et WAVE (Cyfip2) (Figure 45B). En ce qui concerne les protéines spécifiquement synaptiques, la liste contient majoritairement des membres de la partie post-synaptique (18% des partenaires potentiels). Nous retrouvons des sous-unités du récepteur NMDA (GluN1 et GluN2) et des protéines d'ancrage (ShankI,II,III et Homer1). En revanche peu de protéines interviennent directement dans le remodelage des membranes intracellulaires (Dynamin1, AP3, Vesicle Fusing ATPase, Septin2).

**Tableau 8.** Nombre de peptides spécifiques identifiés pour chaque protéine

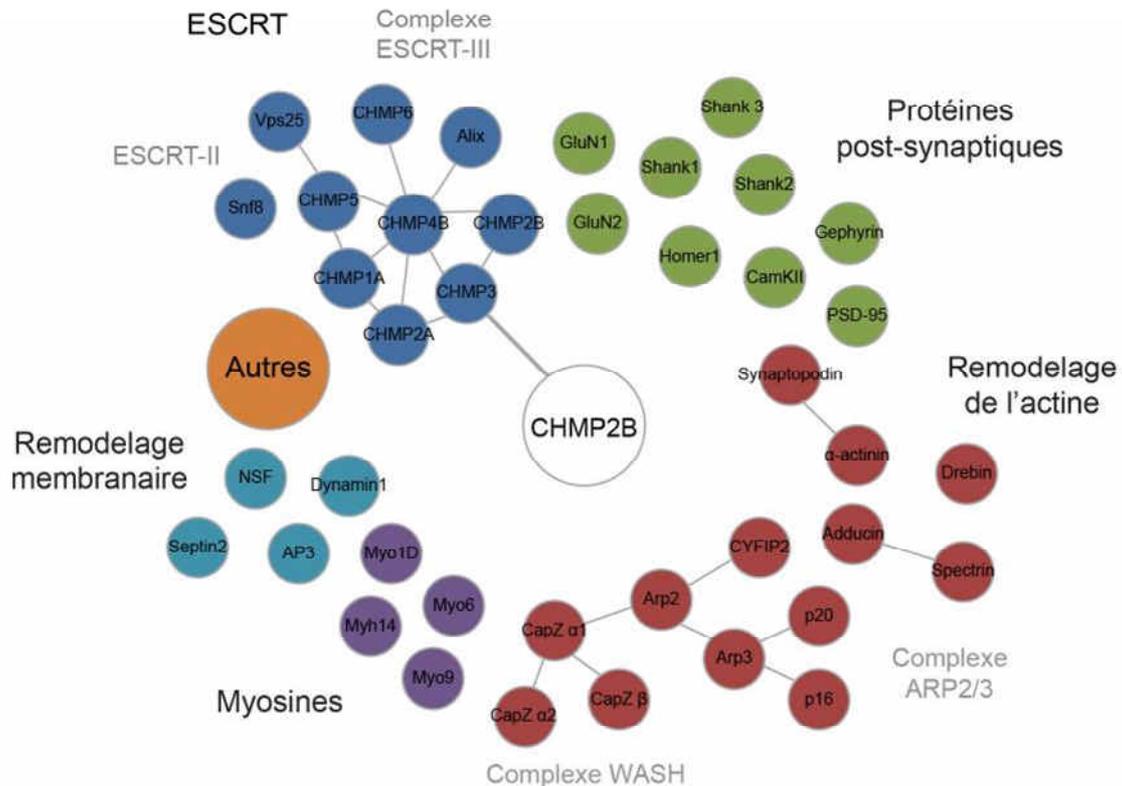
Protéine	Analyse #1		Analyse #2		Analyse #3	
	IP contrôle	IP CHMP2B	IP contrôle	IP CHMP2B	IP contrôle	IP CHMP2B
CHMP2B	1	3		2		2
CHMP2A		7		4		8
CHMP4B	1	9		14		12
CHMP6		1		3		3
CHMP5		3		4		3
CHMP1A		5		4		4
CHMP3		4		3		8
ALIX				2		10
VPS25				2		2
SNF8		2				4
ARP3		5				1
ARP2		4	1	5		2
p20	2	4	1	1		3
p16		5		1		2
CapZ alpha1		5		1		
CapZ alpha2	2	12	2	5		3
CapZ bêta	1	10	2	6		6
Bêta Adducin	6	6	3	11	1	4
Spectrin bêta2	64	174	32	86	1	33
Synaptopodin		9		11		
Alpha Actinin 1	1	13		5		3
Drebin	3	20	2	1		5
Cyfi2				7		4
PSD95	1	12	7	25		3
GluN2		1		10		2
GluN1		10		3		
SHANK1	2	7		7		5
SHANK2		6		9		
SHANK3	5	12		15		1
Homer1	10	16	3	11		6
Gephyrin	5	17	7	8		5
CAMKII gamma	2	4	2	3		4
MYO 6		11		11		9
MYO 9	4	54		23	1	6
MYO1D		25				7
Myh14		12		8		2
Dynamin 1		1	6	11	3	26
Vesicle-fusing ATPase		6	9	40	2	16
Septin2	3	47	2	9		7
AP3			11	18	1	12
PKC bêta				9		2
DCLK1				8		3
dynein 1			2	71	1	5
KIF2A			1	7		4
GAP junction alpha1	1	13	7	44		29
AGAP2		2		7		3
UBL4A		12				10
WDR7				25		10
HXK1			2	9		9
FAS				20		11
BAG6		5		4		35

Les valeurs présentées correspondent aux spectres spécifiques mesurés pour chaque protéine (valeurs de SSC : « specific spectral counting»). Les protéines listées ici ont un rapport de SSC supérieur à 5 entre le l'IP 2B et le contrôle, et ce dans au moins deux des trois analyses réalisées.

A



B



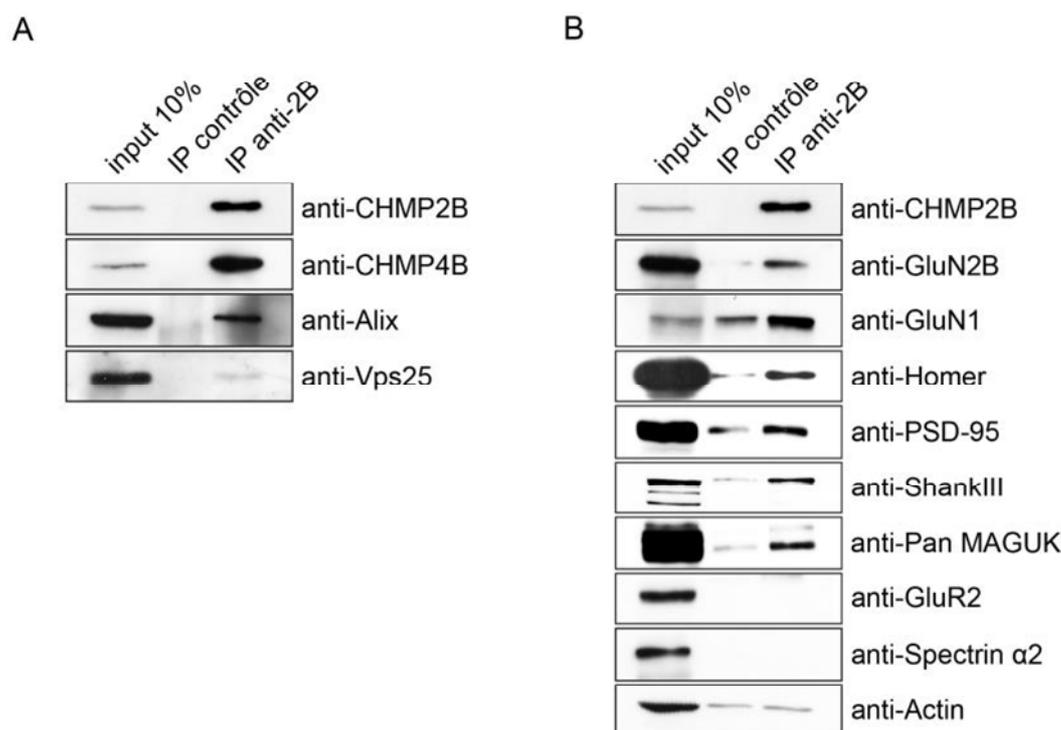
**Figure 45.** Les partenaires de CHMP2B peuvent être classés en groupes fonctionnels ou grandes familles de protéines

(A) Les protéines du tableau 8 sont classées en fonction des groupes fonctionnels auxquels elles appartiennent. La majorité des protéines identifiées (63%) se classent dans 3 groupes fonctionnels : famille ESCRT (20%), cytosquelette d'actine (25%), récepteurs et protéines d'ancrage spécifiques de la post-synapse (18%). Peu de protéines identifiées sont directement impliquées dans le remodelage des membranes intracellulaires (8%).

(B) Vision détaillée des différents groupes. Les complexes protéiques connus sont indiqués en gris et les liens entre protéines correspondent aux interactions validées dans la littérature. Nous pouvons distinguer le complexe ESCRT-III (7 sous-unités), et les complexes de remodelage du cytosquelette WASH et ARP2/3.

### 1.1.3. L'analyse des échantillons par Western-Blot confirme certains des résultats de spectrométrie de masse

Pour confirmer les résultats de spectrométrie de masse, nous avons analysé les échantillons en Western-Blot, en utilisant des anticorps spécifiques de certaines des protéines listées dans le **Tableau 8**. Les anticorps anti-CHMP4B et anti-Alix ont confirmé que la famille ESCRT était spécifiquement associée à CHMP2B (**Figure 46A**). En se basant sur l'intensité des bandes dans l'input, il est intéressant de noter que la quasi-totalité du CHMP4B synaptique semble associée avec CHMP2B. En ce qui concerne les protéines synaptiques, le bruit de fond a été plus important, comme l'ont traduit les bandes contaminantes observées, avec certains anticorps, dans la piste contrôle (**Figure 46B**). Il est donc plus difficile de conclure pour des protéines comme GluN1, ShankIII ou PSD-95, même si dans l'ensemble l'intensité des bandes est beaucoup plus importante dans l'échantillon d'IP CHMP2B que dans l'échantillon témoin. En revanche, nous avons pu confirmer les résultats de MS en ce qui concerne Homer1 et la sous-unité NR2B du récepteur NMDA.



**Figure 46.** L'analyse en Western-Blot des échantillons d'IP confirme les résultats de spectrométrie de masse.

(A, B) Analyse en Western-Blot des échantillons d'IP anti-CHMP2B et contrôle. Les protéines d'intérêt sont immuno-déetectées avec les anticorps spécifiques indiqués. L'association de CHMP2B avec CHMP4B et Alix est validée (A). En ce qui concerne les protéines post-synaptiques (B), l'enrichissement de NR2B et Homer1 dans les échantillons d'IP anti-CHMP2B est confirmée.

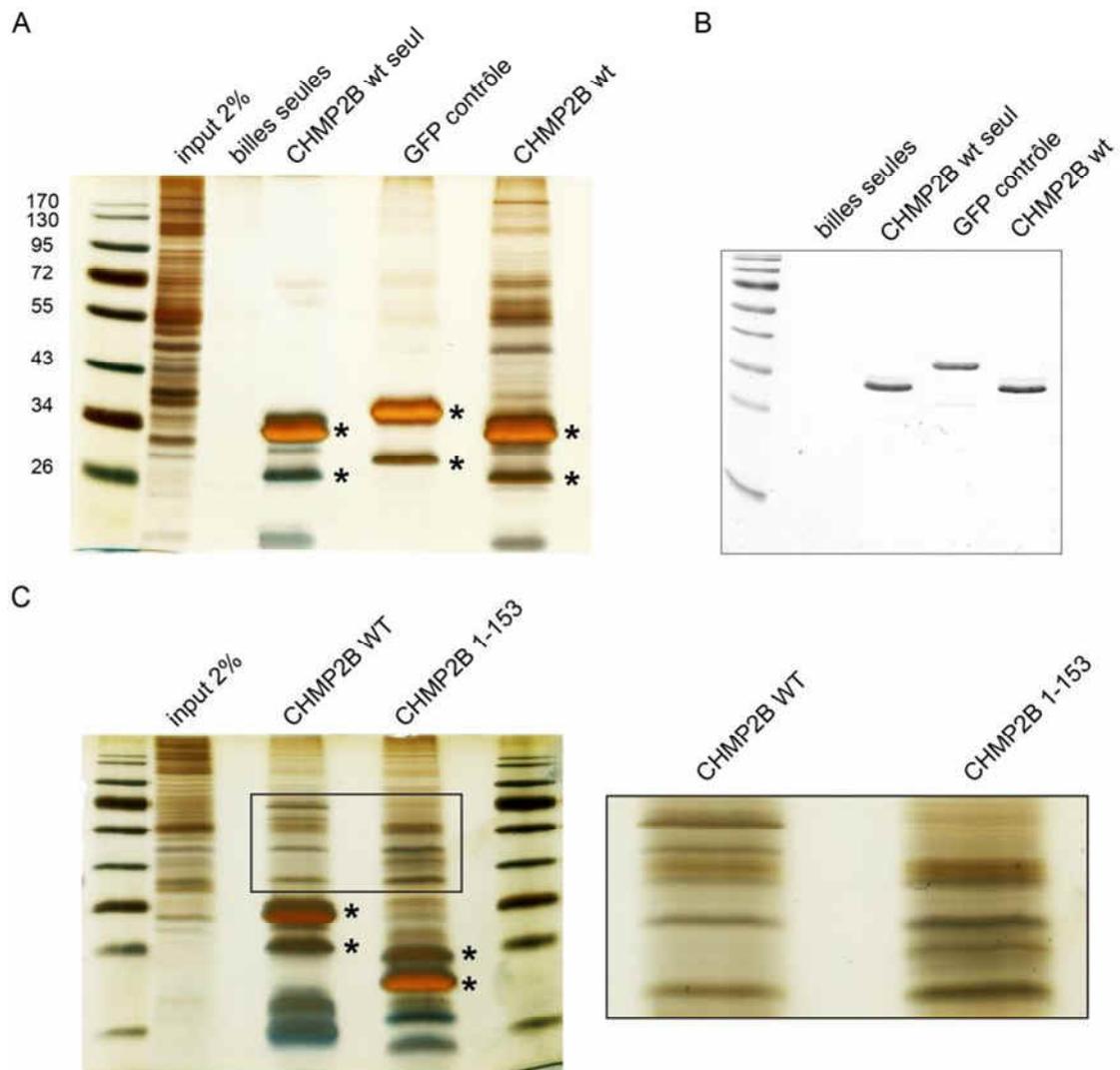
Tous ces résultats confirment que CHMP2B est spécifiquement associé à des sous unités du complexe ESCRT-III dans les synapses. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un complexe ESCRT-III endogène a pu être isolé biochimiquement. CHMP2B ne semble pas

associé avec des protéines du trafic et du remodelage des compartiments intracellulaires. Au contraire, elle précipite préférentiellement avec des protéines d'ancrage et des récepteurs post-synaptiques, ainsi que des protéines associées au cytosquelette d'actine et impliquées dans des phénomènes de remodelage de la membrane. Ces données biochimiques sont en accord avec la localisation ultrastructurale de CHMP2B en périphérie de la PSD ([Article 2](#)). Elles suggèrent qu'un complexe ESCRT-III contenant CHMP2B joue un rôle structural au niveau des épines dendritiques, en coopération avec les filaments d'actine et ses régulateurs.

### 3.3. Chromatographie d'affinité (pull-down)

Dans le but de confirmer les résultats de co-immunoprécipitation, nous avons mis en place une autre technique de chromatographie d'affinité. Celle-ci est basée sur l'utilisation de protéine CHMP2B étiquetée avec une séquence penta-histidine en Cter et produite de manière recombinante en bactérie *E. Coli*. Vu la tendance prononcée de la protéine CHMP2B concentrée à former des agrégats, afin d'obtenir de la protéine monomérique, les extraits de bactérie ont été dénaturés dans un tampon contenant 8M d'urée, CHMP2B a été purifiée par affinité sur des billes de Sépharose Talon®, puis éluée, renaturée par dilution de l'urée et immobilisée à nouveau sur les mêmes billes.

Une expérience de pull-down réalisée à partir de CHMP2B WT immobilisée a permis de fixer spécifiquement des protéines provenant d'un extrait de synaptosomes de rat ([Figure 47A et B](#)). L'analyse comparative de la composition protéique des échantillons GFP et CHMP2B, en spectrométrie de masse, a donné des résultats surprenants. En effet, nous n'avons pas retrouvé de sous-unités du complexe ESCRT-III dans nos échantillons, alors que ces protéines étaient représentées de manière très reproductible dans les immunoprécipitations anti-CHMP2B. Parmi les protéines isolées en IP ([Tableau 9](#)), seules quelques-unes, comme la protéine Alix ou des membres du complexe CapZ, se sont significativement fixées à CHMP2B (liste complète dans le [tableau 9](#)).



**Figure 47.** Une version recombinante de CHMP2B piège spécifiquement des protéines provenant d'un extrait de synaptosomes.

(A) Gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent mettant en évidence les protéines d'un extrait de synaptosomes qui s'associent à CHMP2B dans une expérience de pull-down. De la protéine CHMP2B recombinante, étiquetée en Cter par une séquence hexa-histidine (CHMP2B-His), et de la GFP-His, en contrôle, sont produites en bactérie et puis dénaturées, purifiées et renaturées. 50µg de protéine recombinante sont ensuite immobilisés sur des billes de sépharose Cobalt Talon. Un extrait de synaptosomes (1% DOC, pH 11,0) est incubé sur les billes, et après lavages, les protéines sont éluées dans du tampon Laemmli 1,5 X. Les astérisques correspondent aux protéines CHMP2B-His et GFP-His co-éluées.

(B) Gel SDS-PAGE identique, mais coloré au bleu Coomassie, indiquant que les quantités relatives de protéines recombinantes CHMP2B-His et GFP-His immobilisées sur les billes.

(C) Expérience identique à (A) avec immobilisation de protéine recombinante « full-length » ou tronquée en Cter (1-153). La partie droite correspond à un agrandissement de la zone encadrée. Notez la présence de bandes différentielles entre les deux conditions.

**Tableau 9.** Nombre de peptides spécifiques identifiés pour chaque protéine

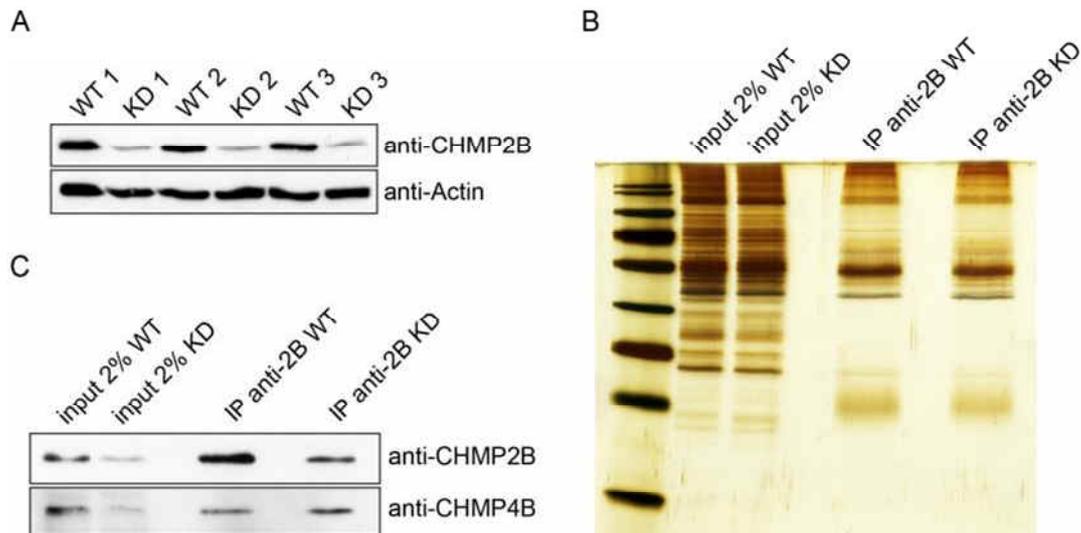
Protéine	GFP-His	CHMP2B-His
CHMP2B	8	50
ALIX		2
ARP3	4	12
CapZ alpha 1		2
CapZ alpha 2	1	4
Béta Adducin		2
Alpha Actinin 1	1	6
Cyfp2		7
PKC bêta		4

Un double tri, basé sur les valeurs de SSC a été effectué parmi la liste des protéines identifiées. Pour chaque expérience seules les protéines avec un  $SSC_{2B} > SSC_{ctrl}$  et un  $SSC_{2B}$  brut  $\geq 2$  (1). un rapport  $SSC_{2B}/SSC_{ctrl} \geq 5$  dans au moins une des expérience.

Les sous-unités ESCRT-III existent sous deux conformations, une conformation inactive, dite fermée et une conformation active, dite ouverte (Bajorek et al., 2009; Shim et al., 2007). La conformation fermée est stabilisée par des interactions intramoléculaires entre la partie Cter et le cœur de la protéine. Ces interactions intramoléculaires empêchent notamment l'oligomérisation des CHMPs et l'association sur les membranes. Pour vérifier si la conformation de CHMP2B pouvait avoir une influence sur la capacité de la protéine à piéger des interacteurs en pull-down, nous avons réalisé la même expérience en utilisant une forme constitutivement active de CHMP2B, tronquée en position 153. De manière intéressante, l'immobilisation de la forme activée a permis d'obtenir un profil d'éluion sensiblement différent (Figure 47C). Ces résultats suggèrent que l'activation artificielle de CHMP2B favorise certaines interactions. A l'inverse certaines bandes sont absentes avec la forme tronquée et semblent donc probablement dépendantes de l'intégrité de la partie Cter. Nous pouvons donc envisager d'optimiser ce protocole et d'utiliser des troncatures séquentielles de CHMP2B, afin de déterminer les interfaces moléculaires directement impliquées dans des interactions avec des partenaires potentiels (voir Discussion).

### 3.4. Immunoprécipitation à partir de cerveaux de souris knockdown pour CHMP2B

Lors des analyses de spectrométrie de masse, la composition de l'échantillon d'intérêt est toujours comparée à celle d'un échantillon témoin. Le choix d'un bon contrôle est donc un élément primordial pour assurer la validité de l'expérience. Dans le cas des IP présentées plus haut, le témoin correspondait à une IP réalisée dans les mêmes conditions et à partir des mêmes extraits, mais en utilisant des anticorps non spécifiques. Le problème vient ici du fait que les anticorps utilisés sont différents et comportent leur propre bruit de fond associé, ce qui se traduit par des faux-positifs en MS. Dans le but d'affiner nos résultats de protéomique, nous avons donc réalisé une expérience d'immunoprécipitation à partir de synaptosomes de souris déficientes ou non en CHMP2B.



**Figure 48.** Immunoprécipitation à partir de souris déplétées en CHMP2B

(A) Analyse en Western-Blot de l'expression de CHMP2B dans des lysats de cerveau de souris sauvages (WT) ou déplétées en CHMP2B (KD). L'expression résiduelle de CHMP2B est de l'ordre de 20%.

(B) Gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent mettant en évidence les protéines co-précipitées dans des IP anti-CHMP2B réalisées à partir de synaptosomes de souris sauvages (WT) ou déplétées en CHMP2B (KD). Notez le peu de différence apparente entre les deux échantillons, en termes de complexité.

(C) Analyse en Western-Blot de l'expérience (B), avec les anticorps indiqués. Bien que la quantité de CHMP2B immunoprécipitée soit réduite, le partenaire CHMP4B reste co-précipité au même niveau.

Les cerveaux de souris knockdown (KD) et sauvages (WT) été envoyés par Arian Isaacs (UCL, Londres) (Ghazi-Noori et al., 2012). Nous disposons de 3 couples de cerveaux, dans le but de reproduire l'expérience. L'analyse de des lysats totaux de cerveau en Western-Blot a indiqué que l'expression de CHMP2B est réduite de 80% dans les souris knockdown (Figure 48A). Nous n'avons pas observé de différence au niveau de la complexité apparente des échantillons (Figure 48B). Cette similarité s'est traduite également au niveau des résultats d'analyse de MS. Nous n'avons pas pu détecter de différence apparente entre les deux échantillons. De manière surprenante, la quantité de CHMP4B co-précipitée était la même pour le WT et le KD, alors même que la quantité de CHMP2B est fortement réduite (Figure 48C). Ces résultats suggèrent que la quantité de CHMP2B subsistant dans le knockdown suffit à piéger tout le CHMP4B disponible. La souris knockdown semble donc difficile à envisager comme contrôle dans la caractérisation biochimique du complexe contenant CHMP2B. Il est important de noter qu'il n'existe pas de véritable knockout pour CHMP2B, l'absence de la protéine étant probablement létale au stade embryonnaire. Il serait intéressant de développer un KO inductible pour pouvoir affiner la caractérisation du rôle de cette protéine au niveau neuronal.

En conclusion, l'ensemble de cette étude biochimique et protéomique a visé à mieux caractériser le macro-complexe synaptique contenant CHMP2B. Nous avons utilisé 3 approches de protéomique, couplées à une analyse des échantillons en spectrométrie de masse. Les résultats obtenus indiquent que CHMP2B est associé à d'autres CHMPs pour former vraisemblablement un complexe ESCRT-III. C'est la première fois que ce type de complexe a pu être purifié et analysé biochimiquement. Nous avons également détecté qu'une large proportion des protéines qui co-précipitent avec CHMP2B appartiennent à des complexes de remodelage du cytosquelette d'actine, particulièrement impliqués dans le développement et le maintien de l'architecture neuronale. Cette approche biochimique nous donne des pistes en ce qui concerne le rôle fonctionnel de CHMP2B dans les neurones et confirme l'hypothèse d'un rôle morphogénétique de CHMP2B au niveau de la membrane plasmique neuronale, en particulier au niveau des épines. Il s'agira maintenant de déterminer quel est ou quels sont les partenaires directs de CHMP2B. Nous développons pour cela une approche de pull-down en utilisant des formes tronquées de CHMP2B, qui permettra d'identifier les interfaces moléculaires impliquées dans les éventuelles interactions.



# Discussion

CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B) est une sous-unité du complexe ESCRT-III, un des composants de la machinerie protéique ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). Cette machinerie très conservée est impliquée dans de nombreux processus cellulaires qui impliquent tous le remodelage de membranes biologiques avec une topologie bien particulière (prise en charge des protéines à dégrader dans les endosomes multivésiculés, abscission finale lors de la cytokinèse, bourgeonnement des virus à la surface cellulaire, autophagie...). La composante ESCRT-III s'assemble de manière transitoire à la surface des membranes et a pour fonction principale de catalyser les phénomènes de courbure et de scission membranaire.

Des mutations de CHMP2B sont associées à des maladies neurodégénératives comme la démence frontotemporale (FTD). Certaines études proposent que la FTD associée à CHMP2B résulterait d'une accumulation toxique d'autophagosomes (Lee et al., 2007) ou d'un blocage de la dégradation des protéines de surface (Urwin et al., 2010). Le travail d'Agnès Belly, au laboratoire, a montré que les mutants pathogènes avaient un effet sur la maturation et le fonctionnement des épines dendritiques (Belly et al., 2010). Dans la FTD, comme dans d'autres maladies neurodégénératives, la mort cellulaire est un évènement tardif, souvent la conséquence d'altérations plus fines du fonctionnement des synapses. Sans remettre totalement en question les résultats précédents, nous proposons donc l'hypothèse que CHMP2B et le complexe ESCRT-III puisse jouer un rôle fonctionnel dans les épines dendritiques.

Les résultats de ce manuscrit de thèse ont été divisés en trois grandes parties. Elles correspondent en réalité à plusieurs aspects complémentaires d'un seul et même travail. Il concerne l'étude du rôle de la protéine CHMP2B et de ses partenaires protéiques dans la physiologie neuronale et en particulier le fonctionnement des épines dendritiques. Il vise également à mieux comprendre comment des dérèglements du fonctionnement de cette protéine peuvent conduire à l'apparition de maladies neurodégénératives.

Nous allons discuter, dans un premier temps, des résultats concernant la capacité de polymérisation et de déformation membranaire de la sous-unité CHMP2B. Nous nous intéresserons, dans une deuxième partie à l'ensemble des résultats concernant l'identification et le rôle fonctionnel du complexe ESCRT-III, dans les neurones. Nous finirons par une conclusion générale de l'ensemble de ce travail de thèse.

## 1. Déformation de la membrane plasmique par la sous-unité CHMP2B

### 1.1. CHMP2B s'associe préférentiellement à la membrane plasmique

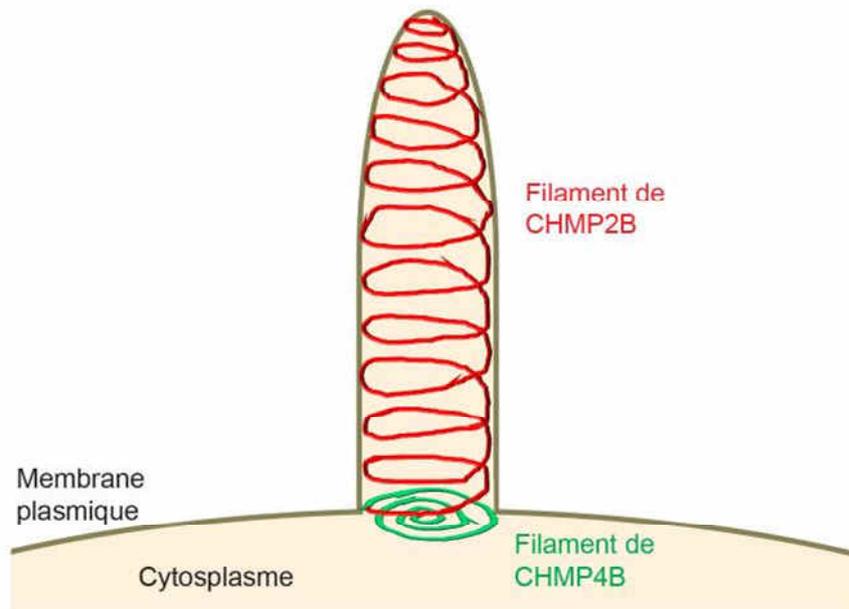
Le complexe ESCRT-III est connu pour s'associer de manière transitoire à la surface des membranes biologiques (membranes intracellulaires et membrane plasmique). La dissociation du complexe est assurée par l'ATPase Vps4. A l'état basal, les sous-unités ESCRT-III sont majoritairement solubles dans le cytosol. Nos résultats montrent que l'extinction de Vps4A et B induit une accumulation de complexes ESCRT contenant CHMP4B au niveau de membranes intracellulaires. Au contraire, la protéine CHMP2B endogène a tendance à s'accumuler à la membrane plasmique. Ces données indiquent que CHMP2B possède des propriétés particulières au sein de la famille ESCRT-III, en s'associant de manière privilégiée à la surface de la membrane plasmique, par rapport aux membranes intracellulaires. Elles suggèrent que CHMP2B prend part à des assemblages protéiques au niveau de la membrane plasmique, qui sont capables d'être dépolymérisés par Vps4.

### 1.2. CHMP2B se polymérise en filaments hélicoïdaux

CHMP4 (A, B et C, chez l'humain) est la sous-unité centrale du complexe ESCRT-III. Lorsqu'elle est surexprimée, elle s'associe massivement aux membranes intracellulaires, ainsi qu'à la membrane plasmique, où elle se polymérise sous forme de filaments circulaires (Hanson et al., 2008; Lin et al., 2005b). La surexpression de CHMP2B a entraîné une accumulation de la protéine au niveau de la membrane plasmique. Un certain nombre de cellules transfectées émettaient également de longues et fines projections membranaires remplies de CHMP2B, mais pas des autres sous-unités ESCRT-III. L'analyse ultrastructurale a montré que ces protrusions étaient des tubes creux de 100 nm de diamètre en moyenne, et que CHMP2B décorait l'intégralité de leur longueur. Les tubes étaient formés par des filaments hélicoïdaux très semblables aux co-polymères constitués par CHMP2A et CHMP3 *in vitro* (Lata et al., 2008) (visibles Figure 31B). La gamme de diamètre et le pas de l'hélice étaient identiques (32 Å pour le pas). Nous pouvons en déduire que CHMP2B est capable de s'homo-polymériser en filaments et qu'elle est capable de déformer la membrane plasmique en de longs et fins tubes. C'est également une spécificité de cette sous-unité, au sein de la famille ESCRT-III. Bien que les autres sous-unités se soient concentrées à la membrane, lorsqu'elles ont été surexprimées, aucune d'elles n'a été capable d'induire de déformation membranaire de cet ordre.

Aucune autre étude précédente n'avait révélé la formation de tubes à la membrane plasmique suite à une surexpression de CHMP2B ou de ses mutants pathogènes (Skibinski et al., 2005; van der Zee et al., 2008). Cette différence s'explique par le fait que les protéines utilisées dans ces travaux portaient une étiquette en N-ter de la protéine. Or, nous avons montré que

l'extrémité N-ter de la protéine est responsable de l'interaction avec la membrane et son intégrité est indispensable pour la formation des tabulations membranaires.



**Figure 52. Les filaments oligomériques de CHMP2B déforment la membrane plasmique**

Représentation schématique de l'ultrastructure des tubes membranaires formés par CHMP2B. CHMP4B se concentre à la base des tubes et forme vraisemblablement un filament circulaire. CHMP2B est le composant majoritaire des tubes. La protéine s'assemble en un polymère hélicoïdal en contact étroit avec la membrane plasmique.

Nous savons qu'ESCRT-III catalyse la déformation des membranes et que certaines sous-unités sont capables de former des filaments *in vitro* et *in vivo*. Il s'agit ici de la première démonstration que les filaments ESCRT-III sont capables de déformer la membrane *in cellula*. Des déformations de la membrane plasmique avaient déjà été observées, en microscopie électronique, dans des cellules COS-7 co-transfectées avec CHMP4B auto-activé et un dominant négatif de Vps4B. CHMP4B se polymérisait à la base, mais la composition des tubes eux-mêmes était inconnue (Hanson et al., 2008) (voir Figure 31A). Dans nos conditions expérimentales, les sous-unités CHMP4A et CHMP4B se concentrent également à la base des tubes, mais ne pénètrent pas à l'intérieur du polymère de CHMP2B (Figure 52). Nous pouvons imaginer que le corps des tubes observés par Hanson ait pu être également constitué de CHMP2B.

D'après les travaux réalisés dans la levure, l'assemblage d'ESCRT-III est supposé séquentiel (Teis et al., 2008). CHMP6 (Vps20) recrute CHMP4 (Snf7), qui se polymérise, puis CHMP3 (Vps24) et CHMP2 (Vps2) sont recrutées. Plusieurs études ont mis en évidence que CHMP4 se polymérisait en filaments circulaires à la surface des membranes (Hanson et al., 2008; Henne et al., 2012; Pires et al., 2009). Nous pouvons imaginer que ces filaments puissent constituer une plateforme pour le recrutement de sous-unités plus en aval.

Le modèle de déformation membranaire par ESCRT-III dit du « dôme » propose que la scission soit la conséquence de la polymérisation des sous-unités CHMP3 et CHMP2, recrutées par CHMP4 au niveau des bourgeons membranaires en formation (Effantin et al., 2013; Fabrikant et al., 2009; Peel et al., 2011). De manière similaire aux co-polymères CHMP2A-CHMP3, nous avons observé des constriction des tubes CHMP2B et des structures en forme de dôme (en cryo-microscopie électronique). La structure des polymères est donc compatible avec un rôle physiologique de CHMP2B dans la déformation et la scission membranaire

Les constriction des tubes s'effectuaient sans modification du pas de l'hélice et nécessitaient donc une modification des contacts latéraux entre sous-unités au sein du polymère. Ces changements pourraient être expliqués par l'intervention de protéines cytosoliques venant interagir avec le polymère. Vps4 est capable d'interagir avec le domaine MIM, en C-ter de CHMP2B (interface exposée dans la lumière du tube) (Stuchell-Brereton et al., 2007). Un mutant ponctuel de CHMP2B incapable d'interagir avec Vps4 ne forme pas de véritables tubes mais uniquement des agrégats dispersés à l'extérieur de la cellule, comme si une fission avait eu lieu. Au contraire, l'expression d'un dominant négatif de Vps4 augmente la capacité des cellules à faire des tubes membranaires. Nous pouvons donc imaginer un rôle double pour Vps4 au sein des polymères ESCRT-III. D'une part elle pourrait avoir un rôle dans l'organisation et la stabilisation des polymères, au travers de ses contacts avec les domaines MIM des CHMPs. D'autre part elle pourrait servir à la dépolymérisation, au travers de son activité ATPasique.

### 1.3. Rôle morphogénétique d'un complexe ESCRT-III contenant CHMP2B à la membrane plasmique ?

Si nous nous référons à la littérature, le rôle de l'homologue de CHMP2A et CHMP2B chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Vps2), dans le contexte de la formation des endosomes multivésiculés, est limité au recrutement de l'ATPase Vps4. Vps2 ne serait pas requise genèse des vésicules internes et ne serait pas décrite comme étant capable de s'homopolymériser (Teis et al., 2008; Wollert et al., 2009). Cependant le fonctionnement du complexe ESCRT chez les mammifères est certainement différent, du fait de la diversité des substrats membranaires et de l'existence de multiples isoformes pour certaines sous-unités. Une étude récente a montré que le sous-complexe constitué de CHMP2 (A et B) et CHMP4 (A, B et C) étaient le seul absolument nécessaires pour le bourgeonnement du VIH à partir de la membrane plasmique (Morita et al., 2011).

Bien que les structures formées par CHMP2B soient la conséquence d'une surexpression, nous pouvons raisonnablement penser qu'elles reflètent une capacité intrinsèque de cette protéine à se polymériser à la membrane plasmique. Le point important concerne la spécificité de substrat membranaire. En effet, de celles que nous ayons testées, CHMP2B est la seule qui s'associe et s'assemble à la membrane plasmique lorsque sa concentration cellulaire augmente (lors de la surexpression). CHMP2B pourrait prendre part à des complexes ESCRT-III à la

membrane plasmique et jouer un rôle non encore décrit dans des processus cellulaires impliquant le remodelage de la surface cellulaire. Nous pouvons imaginer que de tels polymères puissent conduire à la formation de certaines vésicules de surface (mécanisme déjà dépendant de Tsg101, une sous-unité d'ESCRT-I) (Nabhan et al., 2012). CHMP2B pourrait aussi jouer un rôle dans des phénomènes de déformation membranaire indépendants de la fission. Tout comme IRSp53, une protéine à domaine I-BAR, capable de former des tubes lorsqu'elle est surexprimée, CHMP2B pourrait jouer un rôle physiologique dans la formation de protrusions membranaires comme les filopodes (Mattila et al., 2007).

Nous pouvons nous demander quel est le signal du recrutement des sous-unités ESCRT-III à la membrane plasmique. Une étude a récemment mis en évidence que les caractéristiques physiques de la membrane pouvaient constituer un signal de recrutement (Lafaurie-Janvore et al., 2013). Un relâchement de tension membranaire au niveau du pont entre les cellules filles, lors de la cytokinèse, induit le recrutement de CHMP4B. Plus généralement, un des enjeux actuels en ESCRTologie est de mieux comprendre quels facteurs extrinsèques peuvent influencer le recrutement et la polymérisation du complexe ESCRT-III, au même titre que les protéines associées au cytosquelette d'actine régulent son turnover.

## 2. Rôle du complexe ESCRT-III dans la morphogénèse des épines dendritiques

### 2.1. CHMP2B se concentre dans les épines dendritiques

Des mutants de CHMP2B sont responsables de formes familiales de démence frontotemporale (Skibinski et al., 2005; van der Zee et al., 2008). CHMP2B est la seule sous-unité du complexe ESCRT-III associée à une maladie neurodégénérative. Nous avons montré que CHMP2B, ainsi que CHMP4B, la sous-unité cœur du complexe ESCRT-III, sont fortement exprimées dans le cerveau et en particulier dans certaines régions comme le bulbe olfactif, le cortex et l'hippocampe. Le niveau d'expression est corrélé au développement neuronal et synaptique à la fois *in vivo* et sur des neurones en culture. Une étude récente a également mis en évidence, dans des interneurons de la moelle épinière, que les neurones qui exprimaient CHMP2B correspondaient spatialement et temporellement aux neurones qui formaient des premières synapses (Xu et al., 2012). Ils ont montré que l'expression génique de CHMP2B était régulée par un facteur de transcription appelé Lbx1, fortement impliqué dans le développement et la spécification de certaines populations neuronales. Il semblerait que cette régulation soit une spécificité de CHMP2B, au sein des protéines ESCRT-III. L'ensemble de ces données suggère que CHMP2B joue un rôle particulier au cours de la synaptogénèse.

Dans des neurones en culture, la protéine CHMP2B décore l'ensemble des dendrites et forme des clusters à la base et à l'intérieur des épines dendritiques. La microscopie immunoélectronique nous a permis de déterminer que la concentration de CHMP2B est deux fois supérieure dans les épines dendritiques, par rapport au shaft dendritique ou aux boutons axonaux.

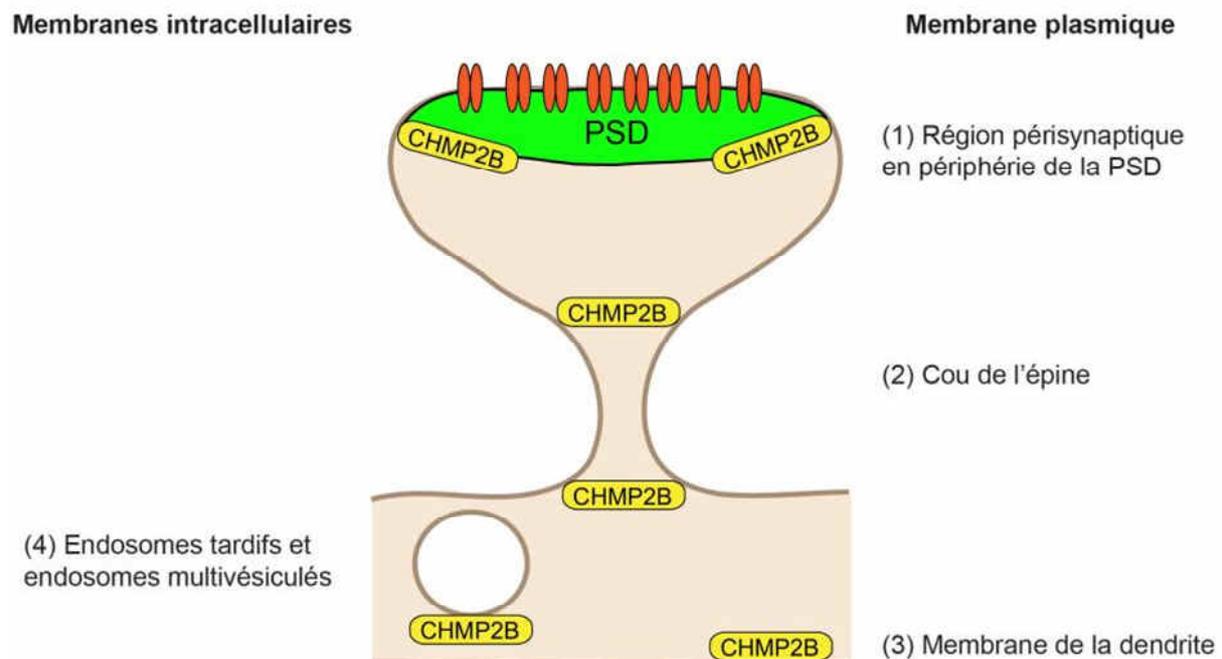
L'analyse biochimique a confirmé que CHMP2B, ainsi que CHMP4B sont enrichies dans des fractions synaptiques. Ce sont en revanche des composants minoritaires des synapses (CHMP2B représente 0,05% des protéines synaptiques, en termes en masse). Ceci peut s'expliquer soit par une faible représentation de ces protéines, soit par le fait qu'elles soient associées seulement à une faible population d'épines dendritiques. Les protéines ESCRT-III ne sont pas des éléments classiquement retrouvés dans les analyses exhaustives de protéomes postsynaptiques (Sheng and Hoogenraad, 2007). Seules CHMP4B et CHMP1A avaient déjà été identifiées comme des composants de la PSD dans plusieurs analyses de spectrométrie de masse (Bayés et al., 2011).

### 2.2. CHMP2B s'associe à la membrane plasmique postsynaptique

Nous avons précédemment mis en évidence que la déplétion en CHMP2B empêchait la maturation des épines dendritiques (Belly et al., 2010). L'un des points centraux de notre hypothèse de travail consistait à déterminer si cet effet était une conséquence d'un

dérèglement du trafic endosomal ou s'il pouvait refléter un rôle non encore décrit de CHMP2B dans la morphogenèse des épines dendritiques.

Dans le tronc dendritique, conformément au rôle originel du complexe ESCRT-III le trafic intracellulaire des protéines, des billes d'or décorent parfois des endosomes tardifs et des endosomes multivésiculés (Figure 53). Dans les épines dendritiques, les compartiments endosomaux tardifs sont relativement rares (Cooney et al., 2002). CHMP2B s'associe préférentiellement au cortex sous-membranaire. La protéine suit deux pics de distribution à l'intérieur des épines. Le premier est situé dans la région pérисynaptique, qui s'étend latéralement par rapport à la PSD, juste sous la membrane postsynaptique. Le second pic est situé verticalement sous la PSD, à des distances plus importantes. Ce second pic est compatible avec une localisation de la protéine au niveau du cou des épines dendritiques (Figure 53). Il est en revanche difficile d'être certain que le marquage se situe à l'intérieur même du cou, du fait de la faible probabilité d'observer cette structure en microscopie électronique.



**Figure 53. CHMP2B est associé à la membrane plasmique dans les épines dendritiques**

Représentation schématique de la localisation de CHMP2B dans les épines dendritiques. Elle est basée sur la distribution des billes d'or en microscopie immunoélectronique. La majorité du marquage suggère une association de CHMP2B avec la membrane plasmique ou à proximité. Le premier pic de distribution se trouve en périphérie de la PSD au niveau de l'espace pérисynaptique. Le second pic se trouve plus à distance et est compatible avec la présence de la protéine au niveau du cou de l'épine, ou à sa base (2). Dans le shaft dendritique CHMP2B se partage en la surface cellulaire (3) et les membranes endosomales (4).

Les sous-unités ESCRT-III sont décrites, dans la littérature, comme étant « de petites protéines cytosoliques capables de s'associer de manière transitoire à la surface membranaire » (Babst et al., 2002b). Elles sont considérées comme monomérique en solution du fait de l'interaction intramolécule entre leur extrémité C-ter et le cœur de la protéine

(Bajorek et al., 2009; Muziol et al., 2006; Zamborlini et al., 2006). Le fractionnement biochimique a mis en évidence que, chez la levure, la proportion de chaque sous-unité associée aux membranes ne dépasse pas 10% (Henne et al., 2012; Teis et al., 2008). Dans les neurones, le constat est très différent pour CHMP2B. La protéine est majoritairement associée aux fractions membranaires et en particulier aux membranes synaptiques. La quantification met en évidence que 50% de la protéine totale est associée aux membranes à l'état basal (données non présentées dans ce manuscrit).

En microscopie optique, les protéines ESCRT-III endogènes sont distribuées de manière diffuse dans le cytosol (Bodon et al., 2011; Shim et al., 2007). Lorsqu'elles sont surexprimées et lorsque la balance activation/inactivation est modifiée (dans le cas de formes tronquées), les protéines s'associent à la surface membranaire et se polymérisent. Ceci se traduit, en microscopie, par la présence d'agrégats de fluorescence à la surface des membranes (comme ce que nous avons pu observer pour CHMP2B suite à la déplétion en Vps4 (Bodon et al., 2011)). Contrairement aux autres types cellulaires, les neurones d'hippocampe matures présentent un profil ponctiforme et clusterisé pour la protéine CHMP2B endogène. Cette agrégation pourrait refléter à la fois l'état polymérique de CHMP2B et son association aux membranes, les deux phénomènes étant intimement liés, pour les sous-unités ESCRT-III (Saksena et al., 2009). La distribution de CHMP2B est au contraire diffuse dans les neurones immatures de 3 jours. Ceci semble refléter une augmentation du degré de polymérisation de CHMP2B, après le début de la spinogénèse, et suggère donc une régulation spécifique de l'activation et de l'assemblage des sous-unités, dans les neurones matures.

Dans les épines dendritiques, les clusters de CHMP2B ne se colocalisent pas avec EEA1, un marqueur des endosomes précoces et Lamp1 un marqueur des lysosomes et endosomes tardifs (Belly et al., 2010). La protéine est majoritairement distribuée à proximité du cortex membranaire, dans les épines dendritiques. De plus, CHMP2B s'assemble spontanément à la membrane plasmique, dans des lignées cellulaires, et c'est une spécificité de cette sous-unité, au sein de la famille ESCRT-III (Bodon et al., 2011). L'ensemble de ces données indiquent que CHMP2B est manifestement associé à la membrane plasmique dans les épines dendritiques.

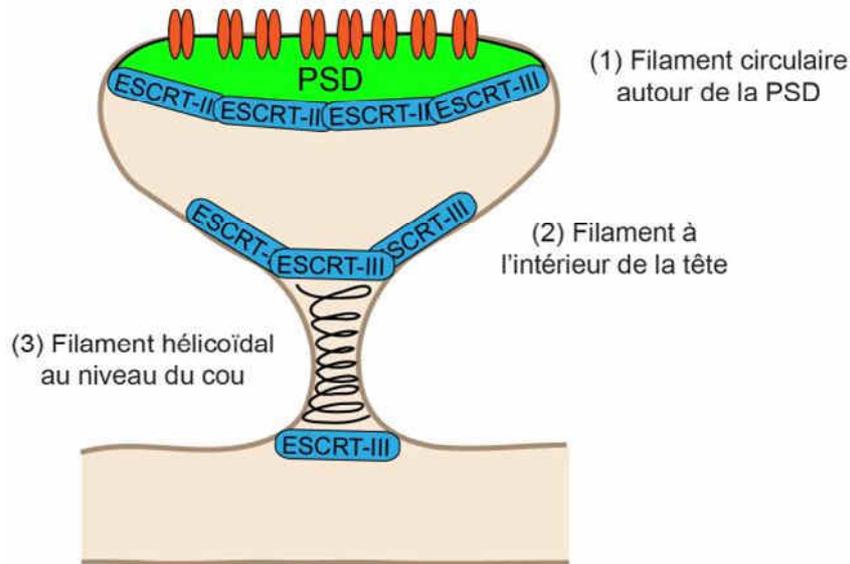
### **2.3. CHMP2B prend part à un complexe ESCRT-III stable et de haut poids moléculaire**

Les assemblages de protéines ESCRT-III se traduisent par la formation de clusters à la surface des membranes qui s'avèrent insolubles dans les détergents non ioniques (Bodon et al., 2011; Lin et al., 2005b; Shim et al., 2007). La solubilisation des synaptosomes dans du TritonX-100 permet également de récupérer les assemblages protéiques constituant le squelette des épines dendritiques et en particulier les éléments de la densité postsynaptique (PSD). Dans nos expériences, une proportion significative de CHMP2B se retrouve avec le matériel insoluble, majoritairement composé de protéines de la PSD. Ce constat est encore plus frappant pour CHMP4B, qui est considérée comme la sous-unité centrale dans la composition des

polymères ESCRT-III. Cette distribution révèle que ces protéines sont présentes sous forme polymérisée dans des fractions synaptiques. En revanche, la solubilisation de ces assemblages dans un détergent plus stringent suggère que CHMP2B et CHMP4B ne sont pas des éléments du cœur de la PSD. Ceci est conforme avec la distribution de CHMP2B en microscopie immunoélectronique, qui était fortement associée à la région pérисynaptique, mais plus rarement à la PSD elle-même.

Pour identifier le statut oligomérique de CHMP2B dans les épines dendritiques, et déterminer la composition de ce complexe, nous avons développé un protocole de purification en deux étapes. Tout d'abord, nous avons solubilisé les assemblages ESCRT-III à partir de membranes synaptiques et réalisé une chromatographie d'exclusion de taille. La chromatographie a démontré qu'une proportion importante de CHMP2B et CHMP4B sont sous-forme polymérique dans les épines dendritiques. Dans nos conditions expérimentales, environ 1/3 du CHMP2B et 2/3 du CHMP4B se retrouvent associés à des assemblages de haut poids moléculaire (>1,5 MDa). Nous avons ensuite purifié le complexe contenant CHMP2B par immuno-affinité. CHMP4B est fortement représenté dans ce complexe. La présence de CHMP4B est la « signature » d'un complexe de type ESCRT-III. En effet, cette sous-unité est considéré comme le composant majoritaire au niveau stœchiométrique (Saksena et al., 2009) et l'élément catalytique majeur pour le remodelage membranaire (Wollert and Hurley, 2010). L'analyse des échantillons en spectrométrie de masse a confirmé le statut « ESCRT-III » du complexe, avec l'association des sous-unités CHMP1A, CHMP2A, CHMP3, CHMP4B, CHMP5 et CHMP6, avec CHMP2B.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'un assemblage ESCRT-III endogène a pu être purifié et analysé. Du fait de sa labilité, le complexe ESCRT-III « canonique » de levure n'avait pu être isolé des membranes endosomales qu'après une étape de crosslink (Teis et al., 2008). Une des particularités du complexe ESCRT-III synaptique est donc sa stabilité. C'est à dire sa capacité à rester sous forme polymérisée. Les remodelages membranaires associés aux compartiments intracellulaires sont caractérisés par leur dynamique. La stabilité du complexe ESCRT-III synaptique semble donc, à nouveau, incompatible avec un rôle au niveau endosomal.



### Figure 54. Localisations et architectures supposées du complexe ESCRT-III dans les épines dendritiques

La localisation est basée sur les données ultrastructurales concernant CHMP2B. L'architecture du complexe est basée sur la morphologie des épines et sur les données de la littérature concernant l'assemblage des polymères ESCRT-III. Le complexe ESCRT-III postsynaptique est en contact étroit avec la membrane plasmique. ESCRT-III pourrait former un filament circulaire autour de la PSD, dans l'espace périssynaptique (1). Le deuxième pic de distribution suggère une localisation plus à distance de la PSD, ce qui est compatible avec la présence d'un filament à la base de la tête (2), ou encore à l'intérieur même du cou de l'épine (3).

Des assemblages stables avaient déjà été observés pour ESCRT-III, en cas de surexpression des sous-unités, du blocage de la dépolymérisation ou de l'utilisation de protéines recombinantes en excès. Les polymères s'organisent en filaments circulaires à la surface membranaire (Hanson et al., 2008) ou filaments hélicoïdaux capables de former des tubes membranaires (Bodon et al., 2011; Lata et al., 2008). De tels filaments ont également été potentiellement observés au niveau de la zone d'abscission, lors de la cytokinèse (Guizetti et al., 2011), suggérant qu'ils constituent un mode d'assemblage physiologique capable de catalyser la déformation des membranes (Guizetti and Gerlich, 2012; Hurley and Hanson, 2010).

Nous proposons l'hypothèse que les sous-unités ESCRT-III, que nous avons identifiées dans le complexe, puissent s'assembler en filaments ESCRT-III dans les épines dendritiques. En nous basant sur la distribution de CHMP2B, en microscopie électronique, et sur les topologies d'assemblage connues pour ESCRT-III, nous pouvons imaginer trois localisations et trois architectures possibles pour des filaments dans les épines dendritiques (Figure 54). La localisation périssynaptique de CHMP2B suggère l'existence d'un filament circulaire autour de la PSD (1). Au niveau du cou, nous pouvons envisager deux possibilités. Un filament hélicoïdal pourrait former un manchon à l'intérieur du cou (2). Des filaments en forme de dôme pourraient s'assembler à la base du cou ou à la base de la tête (3). Nous discuterons du rôle potentiel de ces filaments dans le fonctionnement des épines dans la partie consacrée au modèle de fonctionnement du complexe ESCRT-III (Partie 2.7).

Nous cherchons actuellement à mettre en évidence la présence de filaments ESCRT-III à l'intérieur des épines dendritiques. José Martinez-Hernandez et Karin Pernet-Gallay ont développé une technique de microscopie électronique dite de réplique sur platine. Ils utilisent un protocole similaire à celui qui a permis de décrire l'architecture du cytosquelette dans les épines dendritiques (Korobova and Svitkina, 2010) (Figure 15 de l'Introduction).

#### 2.4. CHMP2B est un élément du squelette postsynaptique

Nous avons identifié que le complexe ESCRT-III synaptique est associé de manière reproductible avec des constituants protéiques du squelette des épines dendritiques. La majorité des partenaires potentiels identifiés (hors ESCRT) appartiennent à la grande famille des régulateurs du cytosquelette d'actine ou sont des protéines d'échafaudage postsynaptiques. Les protéines identifiées sont, pour la plupart, des constituants spécifiques de la postsynapse (Shank, Homer, PSD-95...) ou des protéines enrichies dans les épines dendritiques (Arp3, Cyfip, Adducin...). La liste contient très peu de protéines en lien avec le trafic des récepteurs ou avec les compartiments cellulaires en général (Dynamine, AP3...). Ces résultats viennent confirmer le caractère postsynaptique du complexe ESCRT-III. La nature des partenaires potentiels de CHMP2B est également en lien avec une localisation du complexe à la surface, ou à proximité immédiate, de la membrane plasmique.

Shank est une protéine d'échafaudage particulièrement importante pour l'organisation de la densité postsynaptique. Elle interagit avec Homer (Tu et al., 1999), un partenaire des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR1 and mGluR5) (Tu et al., 1998). Ce mini-complexe s'assemble préférentiellement dans la région pérисynaptique et permet de faire un pont structural et fonctionnel entre les récepteurs métabotropiques et le reste de la densité post-synaptique (Bockaert et al., 2010) (Figure 6). L'association de CHMP2B avec Shank et Homer est donc en accord avec sa distribution préférentielle périphérie de la PSD. Nous n'avons par contre pas été en mesure d'identifier des récepteurs métabotropiques au glutamate dans nos échantillons.

Le cytosquelette d'actine joue un rôle fondamental dans le maintien de la structure et la plasticité des épines dendritiques (Hotulainen and Hoogenraad, 2010; Korobova and Svitkina, 2010). L'assemblage et la dynamique des filaments d'actine sont régulés par une batterie de régulateurs protéiques, qui sont pour la plupart requis pour la morphologie et le fonctionnement des épines (voir Tableau 1 de ce manuscrit). Une relation directe entre ESCRT et le cytosquelette d'actine (ou ESCRT et un régulateur de l'actine) n'a jamais été décrite. Cependant, quelques données préliminaires suggèrent que ces deux machineries pourraient agir en synergie. Des travaux chez la drosophile ont montré qu'une déficience en CHMP2B, ou autres composants d'ESCRT-III, perturbait l'organisation de l'actine corticale (Vaccari et al., 2009). De notre côté, nous avons mis en évidence que des concentrations d'actine-F se localisaient à la base des tubes formés par la surexpression de CHMP2B, dans les cellules HeLa (données non présentées). Les ESCRT sont également impliquées dans la polarisation et l'adhérence cellulaire, des mécanismes faisant intervenir le cytosquelette

d'actine. Les sous-unités ESCRT-III sont requises pour la polarité et l'orientation des fibres d'actine durant la migration des fibroblastes de drosophile (Lobert and Stenmark, 2012). En confirmation de cette relation potentielle entre ESCRT-III et le cytosquelette d'actine, une analyse systématique d'interaction chez la drosophile a identifié que le complexe ESCRT-III était associé au complexe WAVE, au travers de la protéine Brick1 (Guruharsha et al., 2011). Le complexe WAVE a pour fonction principale d'activer le complexe Arp2/3.

Dans les neurones en culture, il semblerait que CHMP2B ait aussi une influence sur la dynamique du cytosquelette d'actine. La potentialisation des épines et le maintien à long terme des épines de type champignon passe par la génération de filaments d'actine stables (Ramachandran and Frey, 2009). Nous avons montré, dans des expériences récentes, que l'extinction en CHMP2B avait tendance à diminuer la stabilité des filaments d'actine postsynaptiques. Ces résultats pourraient expliquer les défauts de maturation et de plasticité associés à la déplétion en CHMP2B (données non présentées ici).

Alix, une protéine associée aux ESCRT, interagit avec et régule le cytosquelette d'actine (Cabezas et al., 2005; Pan et al., 2006). Elle est capable de s'associer directement à CHMP4B et est probablement impliquée dans le recrutement d'ESCRT-III dans le phénomène de bourgeonnement viral (Jouvenet et al., 2011) et lors de la cytokinèse (Carlton and Martin-Serrano, 2007). Alix est également fortement enrichie dans nos échantillons protéique. Elle est un candidat intéressant pour faire le pont entre cytosquelette d'actine et ESCRT-III et ainsi assurer le recrutement du complexe à la postsynapse. Cette hypothèse est actuellement examinée par Marine Laporte, au laboratoire. Elle a également mis en évidence que la souris knockout pour le gène Alix présente des altérations morphologiques du cerveau et une dégénérescence précoce (étude en cours). Ce phénotype cérébral rappelle à certains égards celui qui a pu être observé pour la souris exprimant le mutant CHMP2B<sup>intron5</sup> pathogène (Ghazi-Noori et al., 2012).

## **2.5. Rôle de CHMP2B et du complexe ESCRT-III dans la stabilisation de l'arborisation dendritique et la morphogenèse des épines dendritiques**

La morphologie des épines dendritiques est finement corrélée à l'efficacité de transmission synaptique et conditionne la physiologie neuronale. Les épines dendritiques apparaissent progressivement au cours du développement cérébral et subissent une étape de maturation qui se traduit par une augmentation du nombre d'épines et une expansion globale du volume de leur tête, qui s'accompagne d'une augmentation du nombre de récepteurs AMPA (Alvarez and Sabatini, 2007). Nous avons montré précédemment que CHMP2B était requise pour la maturation morphologique des épines dendritiques, au cours du développement neuronal, dans des neurones d'hippocampe en culture (Belly et al., 2010). Ce résultat a été confirmé *in vivo*. A l'âge de cinq semaines, la souris déficiente en CHMP2B présente des altérations de la morphologie des épines dendritiques, avec une diminution de la proportion d'épines de type mushroom de l'ordre de 50% et une diminution globale de la densité en épines de 33%.

Après cette étape de maturation, et alors que la majorité des épines sont en contact avec une terminaison axonale, le nombre et la morphologie des épines dendritiques se stabilisent à la fois *in vitro* et *in vivo* (Alvarez and Sabatini, 2007). L'utilisation de neurones matures en culture a montré que CHMP2B est également requise pour le maintien des synapses excitatrices déjà présentes. La densité totale de synapses immunologiquement détectables se retrouve diminuée, suite à une l'extinction de CHMP2B. Au niveau fonctionnel, l'extinction entraîne une diminution significative de la fréquence et de l'amplitude des mini-courants excitateurs. Cet effet est valable avant et après la période de maturation des synapses. La diminution de la fréquence traduit une diminution du nombre de synapses fonctionnelles et la diminution de l'amplitude traduit une diminution du nombre de récepteurs au glutamate par épines. Ceci confirme les défauts morphologiques associés à l'absence de CHMP2B.

En résumé, l'ensemble de ces données montre que CHMP2B joue un rôle morphogénétique au niveau des épines dendritiques. Elle semble impliquée dans les processus de gonflement des épines au cours de la spinogenèse des épines à grosse tête. CHMP2B semble également assurer la stabilisation de certaines morphologies d'épines comme les épines à grosse tête, de type champignon, qui sont considérées comme les plus efficaces, en termes de transmission synaptique (Kasai et al., 2003).

Les mécanismes moléculaires décrits comme impliqués dans la morphogenèse des épines sont en partie généralisables à d'autres phénomènes de morphogenèse neuronale (arborisation dendritique, formation des boutons axonaux). Ils sont principalement basés sur le remodelage du cytosquelette d'actine et l'intervention d'effecteurs spécifiques à la surface membranaire. CHMP2B est requise pour la stabilisation de l'arborisation dendritique. Le développement de mutants ponctuels de CHMP2B a montré que le rôle de la protéine dans la morphogenèse dendritique était dépendant, d'une part, de son association avec la bicouche phospholipidique, et d'autre part, de l'interaction CHMP2B-CHMP4B. L'assemblage à la membrane et la présence de CHMP4 étant les « signatures » communément reconnues pour ESCRT-III, ces résultats nous permettent donc de proposer que le rôle morphogénétique de CHMP2B soit dépendant du pouvoir catalytique du complexe ESCRT-III dans la déformation des membranes.

Deux questions peuvent émerger en ce qui concerne le rôle morphogénétique éventuel du complexe ESCRT-III synaptique. Tout d'abord, qu'est ce qui est responsable de sa stabilité ? D'autre part comment son pouvoir morphogénétique est-il régulé pour ne pas conduire à la scission membranaire ?

## **2.6. CHMP2B est requis pour la plasticité structurale et fonctionnelle des épines dendritiques**

Les phénomènes de plasticité synaptique s'accompagnent de changements morphologiques et fonctionnels au niveau des épines dendritiques. La LTP entraîne une expansion du volume de la tête de l'épine associée à une augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la surface

synaptique (Bourne and Harris, 2008). Cette expansion des épines et surtout la stabilisation de la morphologie des épines à grosse tête, de type champignon, permettent le maintien à long-terme de la potentialisation (Bourne and Harris, 2007). Les mécanismes impliqués dans le gonflement et l'architecture postsynaptique sont donc fondamentaux pour la mémorisation et la mise en place de processus cognitifs complexes.

Ces phénomènes de LTP sont dépendants de l'activation des récepteurs NMDA postsynaptiques et de l'entrée  $Ca^{2+}$ , qui s'en suit. L'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  dans la tête de l'épine déclenche des cascades de signalisation qui aboutissent à des modifications concernant l'organisation moléculaire et l'expression génique.

Sur des neurones d'hippocampe en culture, la déplétion en CHMP2B empêche à la fois le gonflement des épines et la potentialisation des courants spontanés associés à la LTP chimique. CHMP2B est donc nécessaire à l'établissement des phénomènes de plasticité synaptique *in vitro*.

Les mécanismes de gonflement des épines lors du développement et lors de la plasticité synaptique de neurones matures font très certainement intervenir les mêmes mécanismes moléculaires. Nous avons vu que CHMP2B joue un rôle dans la maturation des épines et la stabilisation de la morphologie des épines à grosse tête. Cet effet est dépendant de l'association de CHMP2B avec CHMP4B, et donc probablement de l'association de CHMP2B avec le reste du complexe synaptique, que nous avons décrit biochimiquement (en imaginant que comme dans les autres complexes ESCRT-III, CHMP4 soit la sous-unité centrale). L'implication de CHMP2B dans la plasticité structurale et fonctionnelle des épines dendritiques suggère un assemblage dynamique du complexe. Nous pouvons imaginer que le complexe soit capable de s'associer avec les membranes et se polymériser en réponse à l'activité synaptique. Nous avons cherché à voir si la quantité de CHMP2B assemblée en complexe augmentait, suite à une stimulation chimique des neurones en culture. Malgré le manque de reproductibilité de ce type d'expérience, il semblerait que la proportion de CHMP2B qui s'associe aux membranes, et qui s'avère insoluble, est plus élevée dans les neurones stimulés par un protocole de LTP chimique (données non présentées).

D'après les modèles de levure et les expériences *in vitro*, CHMP2 semble être la dernière sous-unité recrutée dans l'ordre d'assemblage du complexe ESCRT-III (Teis et al., 2008; Wollert et al., 2009). Sa position en bout de chaîne pourrait en faire un régulateur de l'architecture ou de la polymérisation d'ESCRT-III. L'intégration du signal d'un régulateur extrinsèque ou une modification post-traductionnelle de CHMP2B pourraient modifier l'activité de la protéine et moduler le complexe ESCRT-III assemblé en aval. Ce rôle régulateur de CHMP2 (Vps2 de levure) a été récemment mis en évidence dans des expériences sur des polymères *in vitro* (Henne et al., 2012). La simple association de Vps2 suffisait à modifier l'architecture tridimensionnelle d'un polymère Snf7 existant.

Le complexe analysé par spectrométrie de masse contient des sous-unités du récepteur NMDA, des protéines d'ancrage de ces récepteurs (Shank, Homer..) et des acteurs majeurs de la plasticité synaptique (CaMKII). Nous pouvons imaginer que CHMP2B se trouve dans la

voie de signalisation du récepteur NMDA. Les expériences de pulldown ont également permis l'identification de petites protéines G (familles Rho, Rac, Arf, Rab et Rap, Arf...), des GEFs et GAPs associées et de leurs effecteurs. De nombreuses petites protéines G jouent un rôle important dans les phénomènes de remodelage membranaire et sont requises pour la plasticité synaptique. Nous pouvons envisager que suite à la stimulation synaptique une protéine G sous forme GTP puisse entraîner l'ouverture de CHMP2B et donc assurer son recrutement dans l'épine dendritique.

## 2.7. Modèle(s) fonctionnel(s)

CHMP2B est requis pour la maturation et la plasticité structurale et fonctionnelle des épines dendritiques. Vraisemblablement, et d'après les données que nous avons, l'effet de CHMP2B s'exercerait au travers de filaments ESCRT-III associés à la membrane plasmique postsynaptique. Ces filaments semblent s'intégrer au sein d'une structure supramoléculaire incluant également du cytosquelette d'actine et des protéines d'échafaudage postsynaptiques. Nous proposons trois modèles pour le fonctionnement du complexe ESCRT-III dans les épines dendritiques (Figure 55).

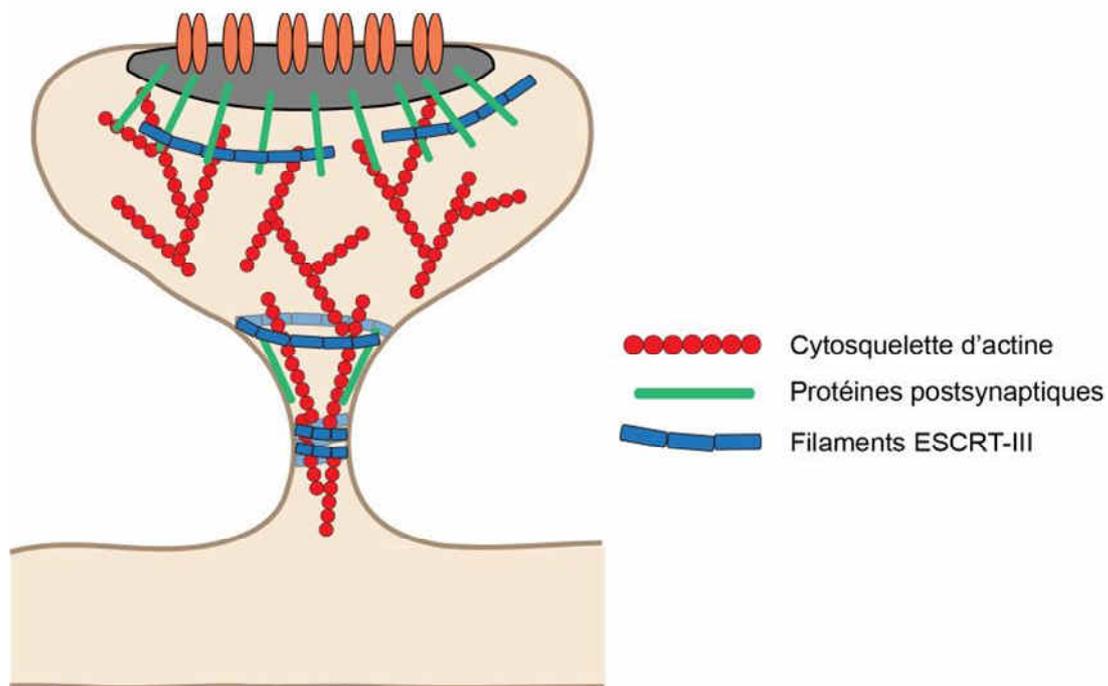
### Modèle d'un filament hélicoïdal au niveau du cou de l'épine

Ce modèle est le plus séduisant, du fait de la ressemblance topologique entre le cou et les tubes membranaires formés par les polymères hélicoïdaux d'ESCRT-III (Bodon et al., 2011; Guizetti et al., 2011; Lata et al., 2008). Le diamètre du cou (100-200 nm, parfois plus) est compatible avec l'intervention des filaments ESCRT-III (100-400 nm pour les tubes formés par CHMP2B). Les bases moléculaires de la structure du cou sont mal connues et reposeraient principalement sur l'association filaments d'actine à courts branchements avec des moteurs moléculaires de type myosine (Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Il est peu probable que le cou soit formé par un homopolymère de CHMP2B car elle est peu représentée par rapport à d'autres protéines synaptiques. De plus, CHMP4B semble être stœchiométriquement plus représenté que CHMP2B dans le complexe ESCRT-III, d'après nos résultats de protéomique.

Le complexe ESCRT-III pourrait former un manchon protéique responsable du maintien de la structure et du diamètre du cou. Le cou participe à compartimentaliser la tête de l'épine et l'isoler du reste de la dendrite. La géométrie du cou est sous la dépendance de l'activité neuronale (Bloodgood, 2005). Elle joue un rôle important dans la diffusion des signaux électriques et biochimiques, des éléments fondamentaux pour permettre la potentialisation synaptique, dans les phénomènes de plasticité (Noguchi et al., 2005). Les mutants pathogènes de CHMP2B, tout comme la déplétion de la protéine, pourraient perturber l'assemblage du complexe ESCRT-III et empêcher la stabilisation des épines à grosse tête et l'établissement de la LTP. l'assemblage du complexe ESCRT-III, pourrait former un tube creux à la surface

membranaire, associé au filaments d'actine longitudinaux du cou (Korobova and Svitkina, 2010) (Figure 55).

Le modèle du cou n'est, en revanche, pas vraiment en accord avec la nature des protéines postsynaptiques co-précipitées avec CHMP2B, qui sont majoritairement des composants de la PSD ou de la tête des épines dendritiques. De plus, à notre connaissance, aucune étude de microscopie électronique ne fait état de l'existence de filaments spécifiques dans la lumière du cou, alors que les épines dendritiques sont des éléments largement étudiés en microscopie électronique, depuis les années 1960.



### Figure 55. Modèles fonctionnels pour le complexe ESCRT-III dans les épines dendritiques

Nous proposons trois possibilités pour le fonctionnement du complexe ESCRT-III dans les épines dendritiques. Filament hélicoïdal au niveau du cou, filament en forme de dôme à la base de la tête ou filament circulaire autour de la PSD. Ce complexes ESCRT-III agirait en synergie avec le cytosquelette d'actine et des protéines d'échafaudage postsynaptiques.

### Modèle d'un filament circulaire à la base de la tête ou à la base du cou

D'après les modèles de déformation membranaire par ESCRT-III, les filaments peuvent également se terminer par une forme de dôme permettent de rapprocher les deux bicouches phospholipidiques (Figure 36) (Fabrikant et al., 2009; Peel et al., 2011). Au niveau des épines dendritiques ce modèle pourrait s'appliquer topologiquement, à la base du cou, ou à la base de la tête (Figure 55). Cette localisation est plausible par rapport à la distribution de CHMP2B en microscopie immunoélectronique. Cependant, dans le modèle du dôme, la fission membranaire est supposée être un phénomène spontané, résultant du rapprochement des deux bicouches lipidiques. Dans le cas des épines, le dôme ne peut pas être complètement fermé sous peine d'aboutir à la scission des épines dendritiques. Le filament ESCRT-III pourrait

également être rigidifié par l'intervention du cytosquelette d'actine. La fission membranaire serait inhibée par la présence de filaments d'actine à l'intérieur du polymère ESCRT-III, comme cela est le cas pour les microtubules polaires, lors de la cytokinèse (Guizetti et al., 2011). Comme pour un filament à l'intérieur du cou, des filaments aux extrémités pourraient jouer un rôle dans la compartimentalisation électrique et biochimique de l'épine dendritique.

### **Modèle d'un filament circulaire autour de la densité postsynaptique**

Ce modèle est à la fois le plus en accord avec nos résultats et le moins intuitif, par rapport à ce que nous connaissons de la machinerie ESCRT. Il propose qu'un filament circulaire d'ESCRT-III puisse faire le tour de la densité postsynaptique (Figure 55). En effet, CHMP2B est majoritairement localisé dans la région pérисynaptique et il s'associe à des protéines d'ancrage périphériques de la PSD comme Shank et Homer. Ce filament circulaire n'aurait pas de propriété mécanistique sur la membrane, mais pourrait contribuer au confinement de molécules, telles que des récepteurs, à l'intérieur de la PSD. La diffusion latérale des récepteurs AMPA et NMDA est beaucoup plus limitée dans la région synaptique que dans les régions pérисynaptique et extrasynaptique (Newpher and Ehlers, 2008; Opazo et al., 2012). L'augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la surface synaptique est un élément fondamental de la potentialisation synaptique (Hayashi et al., 2000). Au cours de la LTP, de nouveaux récepteurs sont exocytés, à partir des réserves intracellulaires (Park et al., 2004). Une proportion importante provient également de la diffusion latérale de récepteurs de surface provenant de l'extérieur de la synapse (Makino and Malinow, 2009). Dans les épines dendritiques potentialisées, les récepteurs semblent rester confinés, à nouveau, dans la membrane postsynaptique (Sharma et al., 2006). Le confinement des récepteurs empêche également la diffusion vers la zone d'endocytose, située dans la région pérисynaptique. Le filament sous membranaire d'ESCRT-III, en association avec les protéines d'ancrage (Shank, Homer, PSD-95), pourrait empêcher les récepteurs postsynaptiques de diffuser latéralement hors de la synapse. Ce phénomène pourrait être régulé au cours du temps en fonction du degré de polymérisation du complexe ESCRT-III. Ce rôle ressemblerait topologiquement au rôle d'ESCRT-I et ESCRT-II dans la clusterisation des récepteurs au niveau de la membrane des endosomes précoces (voir Figure 25 de l'Introduction). Il faut néanmoins noter que le diamètre des vésicules intraluminales est beaucoup plus faible que le diamètre de la PSD.

Les neurones déplétés en CHMP2B semblent porter moins de récepteurs NMDA à la surface, comme le montre la réduction de la composante NMDA, dans la mesure des courants excitateurs spontanés. CHMP2B semble biochimiquement associé aux récepteurs NMDA et pourrait aussi avoir un rôle plus spécifique dans le confinement de ce récepteur particulier au niveau de la PSD.

Ce modèle est le seul dans lequel le complexe ESCRT-III ne jouerait pas de rôle morphogénétique sur la membrane plasmique de l'épine dendritique. Il constituerait donc une nouvelle fonctionnalité pour la machinerie ESCRT, indépendante de la déformation

membranaire, mais uniquement reliée à la capacité du complexe à former un squelette sur la face cytosolique des membranes.

Ces trois modèles ont deux points communs. D'une part, la stabilité des filaments. D'autre part, le fait qu'ils ne catalysent pas de scission membranaire. Ces deux caractéristiques sont probablement reliées entre elles. La stabilité du complexe provient de l'absence de dépolymérisation. CHMP2 a normalement pour fonction de recruter l'ATP Vps4 responsable de la dépolymérisation du complexe. De plus en plus d'évidences suggèrent que Vps4 joue aussi un rôle dans la scission membranaire, via son activité ATPasique. L'analyse de nos échantillons, par spectrométrie de masse, ne détecte ni Vps4A, ni Vps4B, dans le complexe ESCRT-III synaptique. Il est possible que CHMP2B soit associée à un autre effecteur, par compétition avec Vps4, assurant à fois la stabilité et empêchant la scission membranaire. Cette hypothèse à l'avantage d'apporter une explication au comportement des mutants pathogènes reliés à la FTD, qui possèdent une extrémité Nter aberrante ne peuvent pas interagir avec Vps4.

Les hypothèses « endosomale » et « autophagique » du rôle de CHMP2B ne sont pas à exclure, mêmes si elles sont peu compatibles avec nos données de localisation. Des perturbations fines du trafic endosomal postsynaptique pourrait expliquer les résultats que nous avons obtenus. Nous allons donc nous intéresser au trafic des récepteurs au glutamate, dans les épines, suite à la déplétion de CHMP2B.

## 2.8. Perspectives

Ces trois modèles ne sont que des hypothèses, encore très spéculatives pour le moment. Il manque principalement trois données pour avancer sur la fonctionnalité du complexe ESCRT-III postsynaptique : l'identification et la localisation précise des filaments putatifs ; la validation de l'interaction de CHMP2B ou d'une autre sous-unité du complexe ESCRT-III avec un partenaire postsynaptique dont la fonctionnalité est connue ; et enfin la relation entre le complexe et l'activité synaptique.

Comme nous l'avons déjà mentionné, nous cherchons actuellement à mettre en évidence la présence de filaments ESCRT-III dans les épines dendritiques, grâce à la technique de microscopie électronique de réplique sur platine.

Nous avons déjà commencé à étudier les partenaires potentiels identifiés par spectrométrie de masse, pour rechercher lesquels pourraient interagir directement avec CHMP2B. Ce travail a constitué de projet de stage de Vincent Lavilley, étudiant de Master 2 que j'ai encadré cette année. Il a testé l'association de protéines d'intérêt surexprimées dans des lignées cellulaires sur de la protéine CHMP2B recombinante immobilisée sur des billes (protéines testées : Adducin, Arp3, p16, Rap2a, Alix, Cyfip2, CapZ $\alpha$ 2...). Comme l'ont montré nos expériences de pull-down endogène à partir d'extraits de synaptosomes, il semble difficile de reconstruire

des interactions *in vitro* avec des sous-unités ESCRT-III. En effet, dans ces conditions nous sommes incapables de précipiter le complexe ESCRT-III avec CHMP2B. Ce problème provient probablement du fait que l'association aux membranes et la polymérisation sont deux phénomènes intimement liés (Saksena et al., 2009). La présence de lipides semble être nécessaire pour l'ouverture de CHMP2B et pour l'interaction avec ses partenaires. Nous allons donc tenter de développer une technique de pull-down en utilisant de la protéine CHMP2B associée à des liposomes.

A terme, l'identification de partenaires synaptique directs du complexe ESCRT-III permettrait de mieux comprendre comment s'articule le complexe ESCRT-III dans le fonctionnement postsynaptique. Nous pourrions identifier les domaines d'interaction et développer des mutants d'interaction. Cette caractérisation des partenaires sera une étape indispensable pour établir le rôle fonctionnel du complexe ESCRT-III et répondre aux nombreuses questions qui restent en suspens. Comment le complexe est-il recruté dans les épines dendritiques ? Quels sont ses effecteurs ? Est-il régulé par l'activité synaptique ? Quel est sa relation avec le cytosquelette d'actine postsynaptique ?

L'approche biochimique aura aussi pour objectif de déterminer quels mécanismes sont altérés par les mutants pathogènes responsables de la démence frontotemporale (FTD) ou de la sclérose latérale amyotrophique. De manière très probable, les mutants liés à la FTD, du fait de leur extrémité C-terminale tronquée, doivent avoir perdu la capacité d'interagir avec des partenaires. Le laboratoire a développé une souris mutante CHMP2B<sup>intron5</sup> en collaboration avec le laboratoire de J.P. Loeffler (Strasbourg). Nous devrions recevoir les animaux très prochainement et pouvoir identifier les altérations éventuelles de l'assemblage du complexe ESCRT-III chez ces souris (analyse du complexe par chromatographie d'exclusion de taille et immunoprécipitations).

Un autre point important de la suite du projet concernera l'étude du rôle du complexe ESCRT-III dans les phénomènes de plasticité synaptique et plus généralement sa relation avec l'activité synaptique. Nous disposerons très prochainement des souris déficientes en CHMP2B développées par A. Isaacs (UCL, Londres). Ces souris nous permettront notamment de réaliser des expériences de LTP sur tranche. Cependant, cette souris conserve 20% du taux d'expression normal de CHMP2B, ce qui peut être suffisant pour masquer un éventuel effet fonctionnel. Un knockout total du gène *chmp2b* serait vraisemblablement létal (c'est le cas pour *chmp4b*). Le développement d'un knockout inductible et spécifique des neurones semble être la bonne alternative pour toutes les expériences fonctionnelles.

Une partie importante de ce travail de thèse a concerné le développement d'une autre technique pour déterminer le rôle du complexe ESCRT-III dans les épines dendritiques. Nous avons envisagé de déstabiliser le complexe ESCRT-III synaptique de façon aiguë dans des neurones vivants et d'évaluer l'effet sur la morphologie et la plasticité des épines dendritiques (projet de stage de Master 2 d'Elise Goyet ; travail non présenté dans ce manuscrit). Nous avons mis au point des petites séquences peptidiques de CHMP2B capable de déstabiliser sont interaction avec le complexe ESCRT-III *in vitro*. Ces peptides, couplés à des peptides de pénétration cellulaire (CPP, cell penetrating peptides) sont capables de rentrer à l'intérieur des

cellules. L'effet déstabilisant des peptides de CHMP2B n'a pas pu être validé dans les neurones, pour le moment, probablement à cause de problèmes d'internalisation des peptides. Cette technique sera certainement à développer dans la suite du projet, que ce soit pour la déstabilisation du complexe ESCRT-III lui-même ou pour la déstabilisation de l'interaction avec un autre partenaire synaptique. En effet, elle permettrait de tester les effets de la déstabilisation du complexe avec une résolution temporelle (quelques secondes ou minutes) incomparable avec l'expression de mutants ou l'utilisation de shRNA (parfois plusieurs jours d'expression). D'autre part les propriétés des CPP autorisent une utilisation sur des modèles plus intégrés, comme la tranche organotypique, ou même directement sur l'animal, par injection intracérébrale.

### 3. Conclusion générale (de l'ensemble du travail de thèse)

Ce projet de thèse est à cheval sur deux thématiques de recherche : « ESCRTologie » d'une part (ou comprendre comment s'assemble la machinerie ESCRT et en particulier le complexe ESCRT-III) et « Synaptologie », d'autre part (ou comprendre comment fonctionnent les synapses et comment elles contribuent à des phénomènes comme la mémoire et l'apprentissage). Ce travail a apporté des enseignements dans ces deux thématiques.

Contrairement aux dires de la littérature, CHMP2B n'est pas une sous-unité accessoire. Elle dispose de capacités uniques de polymérisation et de déformation de la membrane plasmique. Elle prend également part à un complexe ESCRT-III particulier dans les épines dendritiques, caractérisé par son apparente stabilité et son association avec la membrane plasmique.

Ce complexe ESCRT-III est également associé avec le squelette protéique postsynaptique. Il est nécessaire pour le gonflement des épines dendritiques, la stabilisation des épines à grosse tête et les phénomènes de plasticité synaptique. Nous proposons l'hypothèse que ce complexe s'assemble en filaments ESCRT-III pour catalyser des phénomènes de déformation de la membrane postsynaptique, ou servir au confinement des récepteurs au glutamate, au sein de la densité postsynaptique.

Le fonctionnement synaptique, et le fonctionnement des épines dendritiques en particulier, sont très activement étudiés. Ce projet s'articule dans une thématique de recherche qui vise à mieux comprendre le fonctionnement des synapses et leur implication dans les phénomènes de mémorisation et d'apprentissage. Ceci dans le but de mieux appréhender comment des dysfonctionnements synaptiques peuvent conduire à l'apparition de pathologies. L'étude de la protéine pathogène CHMP2B, directement responsable de la démence frontotemporale, et de son rôle fonctionnel dans les épines dendritiques, pourrait donc amener des enseignements précieux, pour la compréhension et le traitement précoce d'autres pathologies neurodégénératives.

# Références bibliographiques

## A

- Abe, K., Chisaka, O., Van Roy, F., and Takeichi, M. (2004). Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nat. Neurosci.* *7*, 357–363.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2007a). The cytoskeleton. In *Molecular Biology of the Cell* 5Ed, pp. 965–1052.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2007b). Intracellular vesicular traffic. In *Molecular Biology of the Cell* 5Ed, pp. 749–812.
- Allison, R., Lumb, J.H., Fassier, C., Connell, J.W., Ten Martin, D., Seaman, M.N.J., Hazan, J., and Reid, E. (2013). An ESCRT-spastin interaction promotes fission of recycling tubules from the endosome. *J. Cell Biol.* *202*, 527–543.
- Alvarez, V.A., and Sabatini, B.L. (2007). Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* *30*, 79–97.
- Anderton, B.H., Callahan, L., Coleman, P., Davies, P., Flood, D., Jicha, G.A., Ohm, T., and Weaver, C. (1998). Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes. *Prog. Neurobiol.* *55*, 595–609.
- Antonny, B. (2011). Mechanisms of membrane curvature sensing. *Annu. Rev. Biochem.* *80*, 101–123.
- Araya, R., Jiang, J., Eisenthal, K.B., and Yuste, R. (2006a). The spine neck filters membrane potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 17961–17966.
- Araya, R., Eisenthal, K.B., and Yuste, R. (2006b). Dendritic spines linearize the summation of excitatory potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 18799–18804.
- Arellano, J.I., Benavides-Piccione, R., Defelipe, J., and Yuste, R. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front. Neurosci.* *1*, 131–143.

## B

- Babst, M., Sato, T.K., Banta, L.M., and Emr, S.D. (1997). Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J.* *16*, 1820–1831.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J., and Emr, S.D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* *17*, 2982–2993.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., and Emr, S.D. (2002a). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* *3*, 283–289.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., and Emr, S.D. (2002b). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* *3*, 271–282.
- Bache, K.G., Brech, A., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* *162*, 435–442.
- Bache, K.G., Stuffers, S., Malerod, L., Slagsvold, T., Raiborg, C., Lechardeur, D., Walchli, S., Lukacs, G.L., Brech, A., and Stenmark, H. (2006). The ESCRT-III subunit hVps24 is required for degradation but not silencing of the epidermal growth factor receptor. *Mol Biol Cell* *17*, 2513–2523.
- Bacia, K., Schwille, P., and Kurzchalia, T. (2005). Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 3272–3277.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., et al. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* *14*, 677–685.
- Bajorek, M., Schubert, H.L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D.M., Stubblefield, W.M., Uter, N.T., Myszka, D.G., Hill, C.P., and Sundquist, W.I. (2009). Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 754–762.

- Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A.D., Rollinson, S., et al. (2006). Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* *442*, 916–919.
- Baldys, A., and Raymond, J.R. (2009). Critical role of ESCRT machinery in EGFR recycling. *Biochemistry* *48*, 9321–9323.
- Bankaitis, V.A., Johnson, L.M., and Emr, S.D. (1986). Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 9075–9079.
- Barelli, H., and Antonny, B. (2009). Cell biology: Detached membrane bending. *Nature* *458*, 159–160.
- Bayés, A., van de Lagemaat, L.N., Collins, M.O., Croning, M.D.R., Whittle, I.R., Choudhary, J.S., and Grant, S.G.N. (2011). Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density. *Nat. Neurosci.* *14*, 19–21.
- Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Bouron, A., Sadoul, R., and Goldberg, Y. (2010). CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J. Cell Sci.* *123*, 2943–2954.
- Bird, P.I., Trapani, J.A., and Villadangos, J.A. (2009). Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 871–882.
- Blackstone, C., O’Kane, C.J., and Reid, E. (2011). Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 31–42.
- Blanpied, T.A., Scott, D.B., and Ehlers, M.D. (2002). Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* *36*, 435–449.
- Bliss, T. V., and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* *361*, 31–39.
- Bliss, T. V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* *232*, 331–356.
- Van Blitterswijk, M., Vlam, L., van Es, M.A., van der Pol, W.L., Hennekam, E.A., Dooijes, D., Schelhaas, H.J., van der Kooij, A.J., de Visser, M., Veldink, J.H., et al. (2012). Genetic Overlap between Apparently Sporadic Motor Neuron Diseases. *PLoS One* *7*, e48983.
- Bloodgood, B.L. (2005). Neuronal Activity Regulates Diffusion Across the Neck of Dendritic Spines. *Science* (80-. ). *310*, 866–869.
- Bockaert, J., Perroy, J., Bécamel, C., Marin, P., and Fagni, L. (2010). GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *50*, 89–109.
- Bodon, G., Chassefeyre, R., Pernet-Gallay, K., Martinelli, N., Effantin, G.G., Lutje Hulsik, D., Belly, A.A., Goldberg, Y., Chatellard-Causse, C., Blot, B.B., et al. (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.
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F.M., Wegiel, J., Yu, W.H., and Nixon, R.A. (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer’s disease. *J. Neurosci.* *28*, 6926–6937.
- Boura, E., Rózycki, B., Chung, H.S., Herrick, D.Z., Canagarajah, B., Cafiso, D.S., Eaton, W.A., Hummer, G., and Hurley, J.H. (2012). Solution structure of the ESCRT-I and -II supercomplex: implications for membrane budding and scission. *Structure* *20*, 874–886.
- Bourne, J., and Harris, K.M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 381–386.
- Bourne, J.N., and Harris, K.M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* *31*, 47–67.
- Brown, T.C., Correia, S.S., Petrok, C.N., and Esteban, J.A. (2007). Functional compartmentalization of endosomal trafficking for the synaptic delivery of AMPA receptors during long-term potentiation. *J. Neurosci.* *27*, 13311–13315.
- Bryant, N.J., and Stevens, T.H. (1998). Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 230–247.

## C

- Cabezas, A., Bache, K.G., Brech, A., and Stenmark, H. (2005). Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J. Cell Sci.* *118*, 2625–2635.
- Cajal, S.R. y (1888). Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trim. Histol. Norm. Patol.* *1*, 1–10.
- Calabrese, B., Wilson, M.S., and Halpain, S. (2006). Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)*. *21*, 38–47.
- Carlin, R.K., Grab, D.J., Cohen, R.S., and 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.
- Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science (80- )*. *316*, 1908–1912.
- Carlton, J.G., Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2008). Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 10541–10546.
- Catalá, I., Ferrer, I., Galofré, E., and Fábregues, I. (1988). Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in dementia. A quantitative Golgi study on biopsy samples. *Hum. Neurobiol.* *6*, 255–259.
- Cheng, D., Hoogenraad, C.C., Rush, J., Ramm, E., Schlager, M.A., Duong, D.M., Xu, P., Wijayawardana, S.R., Hanfelt, J., Nakagawa, T., et al. (2006). Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol. Cell. Proteomics* *5*, 1158–1170.
- Chernomordik, L. V, and Kozlov, M.M. (2005). Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell* *123*, 375–382.
- Chiu, C.Q., Lur, G., Morse, T.M., Carnevale, N.T., Ellis-Davies, G.C.R., and Higley, M.J. (2013). Compartmentalization of GABAergic inhibition by dendritic spines. *Science* *340*, 759–762.
- Choi, J., Ko, J., Racz, B., Burette, A., Lee, J.-R., Kim, S., Na, M., Lee, H.W., Kim, K., Weinberg, R.J., et al. (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.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., and McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* *334*, 33–46.
- Cooney, J.R., Hurlburt, J.L., Selig, D.K., Harris, K.M., and Fiala, J.C. (2002). Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J. Neurosci.* *22*, 2215–2224.
- Cotter, D., Mackay, D., Chana, G., Beasley, C., Landau, S., and Everall, I.P. (2002). Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb. Cortex* *12*, 386–394.
- Cruts, M., Gijselink, I., van der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenberghe, R., Dermaut, B., Martin, J.-J., et al. (2006). Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* *442*, 920–924.

## D

- Dailey, M.E., and Smith, S.J. (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.* *16*, 2983–2994.
- DeKosky, S.T., and Scheff, S.W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* *27*, 457–464.
- Demoor, J. (1896). La plasticité morphologique des neurones cérébraux. (Liège: H. Vaillant-Carmanne).
- Derkach, V., Barria, A., and Soderling, T.R. (1999). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 3269–3274.

Dobro, M.J., Samson, R.Y., Yu, Z., McCullough, J., Ding, H.J., Chong, P.L.-G., Bell, S.D., and Jensen, G.J. (2013). Electron cryotomography of ESCRT assemblies and dividing *Sulfolobus* cells suggests that spiraling filaments are involved in membrane scission. *Mol. Biol. Cell* 24, 2319–2327.

## E

Effantin, G., Dordor, A., Sandrin, V., Martinelli, N., Sundquist, W.I., Schoehn, G., and Weissenhorn, W. (2013). ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers in vitro and act synergistically during HIV-1 budding. *Cell. Microbiol.* 15, 213–226.

Ehlers, M.D. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28, 511–525.

Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S., and Malinow, R. (2007). PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4176–4181.

Einstein, G., Buranosky, R., and Crain, B.J. (1994). Dendritic pathology of granule cells in Alzheimer's disease is unrelated to neuritic plaques. *J. Neurosci.* 14, 5077–5088.

Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T.A., Hurley, J.H., and Lippincott-Schwartz, J. (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.

Elia, N., Fabrikant, G., Kozlov, M.M., and Lippincott-Schwartz, J. (2012). Computational model of cytokinetic abscission driven by ESCRT-III polymerization and remodeling. *Biophys. J.* 102, 2309–2320.

Ethell, I.M., and Pasquale, E.B. (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog. Neurobiol.* 75, 161–205.

## F

Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J.D., Briggs, J.A., Weissenhorn, W., and Kozlov, M.M. (2009). Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol* 5, e1000575.

Ferrante, R.J., Kowall, N.W., and Richardson, E.P. (1991). Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *J. Neurosci.* 11, 3877–3887.

Ferrer, I. (1999). Neurons and their dendrites in frontotemporal dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10 Suppl 1, 55–60.

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

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

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

Foster, M., and Sherrington, S. (1897). *A Textbook of Physiology*, 7th edn, part 3.

Freire, M. (1978). Effects of dark rearing on dendritic spines in layer IV of the mouse visual cortex. A quantitative electron microscopical study. *J. Anat.* 126, 193–201.

Furutani, Y., Matsuno, H., Kawasaki, M., Sasaki, T., Mori, K., and Yoshihara, Y. (2007). Interaction between telencephalin and ERM family proteins mediates dendritic filopodia formation. *J. Neurosci.* 27, 8866–8876.

## G

- García-López, P., García-Marín, V., and Freire, M. (2010). Dendritic spines and development: towards a unifying model of spinogenesis--a present day review of Cajal's histological slides and drawings. *Neural Plast.* *2010*, 769207.
- Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Côté, M., Rich, R.L., et al. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* *107*, 55–65.
- Geschwind, D.H., and Levitt, P. (2007). Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 103–111.
- Ghazi-Noori, S., Froud, K.E., Mizielinska, S., Powell, C., Smidak, M., Fernandez de Marco, M., O'Malley, C., Farmer, M., Parkinson, N., Fisher, E.M., et al. (2012). Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain* *135*, 819–832.
- Glantz, L.A., and Lewis, D.A. (2000). Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* *57*, 65–73.
- Gray, E.G. (1959a). Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* *183*, 1592–1593.
- Gray, E.G. (1959b). Axosomatic and axodendritic synapses of the cerebral cortex. *J. Anat. Lond.* *93*, 420–433.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 317–323.
- Grutzendler, J., Kasthuri, N., and Gan, W.-B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* *420*, 812–816.
- Guizetti, J., and Gerlich, D.W. (2012). ESCRT-III polymers in membrane neck constriction. *Trends Cell Biol.* *22*, 133–140.
- Guizetti, J., Schermelleh, L., Mäntler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Müller-Reichert, T., and Gerlich, D.W. (2011). Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* *331*, 1616–1620.
- Guruharsha, K.G., Rual, J.-F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., Wong, C., Rhee, D.Y., Cenaj, O., et al. (2011). A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell* *147*, 690–703.

## H

- Hanley, J.G. (2008). AMPA receptor trafficking pathways and links to dendritic spine morphogenesis. *Cell Adh. Migr.* *2*, 276–282.
- Hanley, J.G. (2010). Endosomal sorting of AMPA receptors in hippocampal neurons. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 460–465.
- Hanson, P.I., and Cashikar, A. (2012). Multivesicular body morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *28*, 337–362.
- Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J.E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol* *180*, 389–402.
- Harris, K.M., Jensen, F.E., and Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci.* *12*, 2685–2705.
- Hayashi, M.K., Tang, C., Verpelli, C., Narayanan, R., Stearns, M.H., Xu, R.-M., Li, H., Sala, C., and Hayashi, Y. (2009). The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. *Cell* *137*, 159–171.
- Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., and Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* *287*, 2262–2267.

- Hebb, D. (1949). *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory* (Wiley).
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D. (2011). The ESCRT Pathway. *Dev. Cell* *21*, 77–91.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Zhao, Y., and Emr, S.D. (2012). The Endosomal Sorting Complex ESCRT-II Mediates the Assembly and Architecture of ESCRT-III Helices. *Cell* *151*, 356–371.
- Hering, H., Lin, C.-C., and Sheng, M. (2003). Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* *23*, 3262–3271.
- Higashi, Y., Murayama, S., Pentchev, P.G., and Suzuki, K. (1993). Cerebellar degeneration in the Niemann-Pick type C mouse. *Acta Neuropathol.* *85*, 175–184.
- Hinton, V.J., Brown, W.T., Wisniewski, K., and Rudelli, R.D. (1991). Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* *41*, 289–294.
- Holtmaat, A.J.G.D., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L., Shepherd, G.M., Zhang, X., Knott, G.W., and Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* *45*, 279–291.
- Hooli, B. V., Kovacs-Vajna, Z.M., Mullin, K., Blumenthal, M.A., Mattheisen, M., Zhang, C., Lange, C., Mohapatra, G., Bertram, L., and Tanzi, R.E. (2013). Rare autosomal copy number variations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry*.
- Horvath, C.A.J., Vanden Broeck, D., Boulet, G.A. V, Bogers, J., and De Wolf, M.J.S. (2007). Epsin: inducing membrane curvature. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 1765–1770.
- Hotulainen, P., and Hoogenraad, C.C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* *189*, 619–629.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* *52*, 831–843.
- Hurley, J.H., and Hanson, P.I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 556–566.
- Hutsler, J.J., and Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res.* *1309*, 83–94.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* *393*, 702–705.

## I

- Irwin, S.A., Patel, B., Idupulapati, M., Harris, J.B., Crisostomo, R.A., Larsen, B.P., Kooy, F., Willems, P.J., Cras, P., Kozlowski, P.B., et al. (2001). Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am. J. Med. Genet.* *98*, 161–167.
- Isaacs, A.M., Johannsen, P., Holm, I., and Nielsen, J.E. (2011). Frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutations. *Curr. Alzheimer Res.* *8*, 246–251.

## J

- Jaworski, J., Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortland, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S.A., Di Stefano, P., Demmers, J., et al. (2009). Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* *61*, 85–100.
- Jiang, M., and Chen, G. (2006). High Ca<sup>2+</sup>-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat. Protoc.* *1*, 695–700.
- Jones, E.G., and Powell, T.P. (1969). Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *J. Cell Sci.* *5*, 509–529.
- Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P.D., and Simon, S.M. (2011). Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat. Cell Biol.* *13*, 394–401.

## K

- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., and Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* *26*, 360–368.
- Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T., and Maki, M. (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.
- Katoh, K., Shibata, H., Hatta, K., and Maki, M. (2004). CHMP4b is a major binding partner of the ALG-2-interacting protein Alix among the three CHMP4 isoforms. *Arch Biochem Biophys* *421*, 159–165.
- Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* *106*, 145–155.
- Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* *162*, 413–423.
- Kaufmann, W.E., and Moser, H.W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb. Cortex* *10*, 981–991.
- Kennedy, M.J., and Ehlers, M.D. (2006). Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* *29*, 325–362.
- Kim, B.Y., Olzmann, J.A., Barsh, G.S., Chin, L.-S., and Li, L. (2007). Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1129–1142.
- Kim, I.H., Racz, B., Wang, H., Burianek, L., Weinberg, R., Yasuda, R., Wetsel, W.C., and Soderling, S.H. (2013). Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities. *J. Neurosci.* *33*, 6081–6092.
- Kneussel, M., and Wagner, W. (2013). Myosin motors at neuronal synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 233–247.
- Korobova, F., and Svitkina, T. (2010). Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* *21*, 165–176.
- Kostelansky, M.S., Schluter, C., Tam, Y.Y.C., Lee, S., Ghirlando, R., Beach, B., Conibear, E., and Hurley, J.H. (2007). Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* *129*, 485–498.
- Kozlov, M.M., McMahon, H.T., and Chernomordik, L. V (2010). Protein-driven membrane stresses in fusion and fission. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 699–706.
- Kwon, H.-B., and Sabatini, B.L. (2011). Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature* *474*, 100–104.

## L

- Lafaurie-Janvore, J., Maiuri, P., Wang, I., Pinot, M., Manneville, J.-B., Betz, T., Balland, M., and Piel, M. (2013). ESCRT-III Assembly and Cytokinetic Abscission Are Induced by Tension Release in the Intercellular Bridge. *Science* (80-. ). *339*, 1625–1629.
- Landis, D.M., and Reese, T.S. (1983). Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J. Cell Biol.* *97*, 1169–1178.
- Lang, C., Barco, A., Zablow, L., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., and Zakharenko, S.S. (2004). Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16665–16670.
- Langelier, C., von Schwedler, U.K., Fisher, R.D., De Domenico, I., White, P.L., Hill, C.P., Kaplan, J., Ward, D., and Sundquist, W.I. (2006). Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J Virol* *80*, 9465–9480.
- Larson, J., Lynch, G., Games, D., and Seubert, P. (1999). Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res.* *840*, 23–35.

- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H.G., and Weissenhorn, W. (2008). Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* (80- ). *321*, 1354–1357.
- Lee, J.A., and Gao, F.B. (2009). Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia. *J Neurosci* *29*, 8506–8511.
- Lee, J.A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* *17*, 1561–1567.
- Lee, S.M., Chin, L.-S., and Li, L. (2012). Charcot-Marie-Tooth disease-linked protein SIMPLE functions with the ESCRT machinery in endosomal trafficking. *J. Cell Biol.* *199*, 799–816.
- Lenz, M., Crow, D.J.G., and Joanny, J.-F. (2009). Membrane buckling induced by curved filaments. *Phys. Rev. Lett.* *103*, 038101.
- Li, L., and Cohen, S.N. (1996). Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell* *85*, 319–329.
- Lin, B., Kramár, E.A., Bi, X., Brucher, F.A., Gall, C.M., and Lynch, G. (2005a). Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus. *J. Neurosci.* *25*, 2062–2069.
- Lin, Y., Kimpler, L.A., Naismith, T. V, Lauer, J.M., and Hanson, P.I. (2005b). Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J Biol Chem* *280*, 12799–12809.
- Lindas, A.C., Karlsson, E.A., Lindgren, M.T., Ettema, T.J., and Bernander, R. (2008). A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 18942–18946.
- Lobert, V.H., and Stenmark, H. (2012). The ESCRT machinery mediates polarization of fibroblasts through regulation of myosin light chain. *J. Cell Sci.* *125*, 29–36.
- Logan, M.R., and Mandato, C.A. (2006). Regulation of the actin cytoskeleton by PIP2 in cytokinesis. *Biol. Cell* *98*, 377–388.
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., and Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* *305*, 719–721.

## M

- Machesky, L.M., and Gould, K.L. (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 117–121.
- Makino, H., and Malinow, R. (2009). AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* *64*, 381–390.
- Malinow, R., Madison, D. V, and Tsien, R.W. (1988). Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature* *335*, 820–824.
- Martinelli, N., Hartlieb, B., Usami, Y., Sabin, C., Dordor, A., Miguet, N., Avilov, S. V, Ribeiro, E.A., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2012). CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B. *J. Mol. Biol.* *419*, 75–88.
- Mathivanan, S., and Simpson, R.J. (2009). ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* *9*, 4997–5000.
- Matsuno, H., Okabe, S., Mishina, M., Yanagida, T., Mori, K., and Yoshihara, Y. (2006). Telencephalin slows spine maturation. *J. Neurosci.* *26*, 1776–1786.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* *429*, 761–766.
- Mattila, P.K., Pykäläinen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V.O., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Lappalainen, P. (2007). Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J. Cell Biol.* *176*, 953–964.
- Matus, A., Ackermann, M., Pehling, G., Byers, H.R., and Fujiwara, K. (1982). High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 7590–7594.

- Maxfield, F.R., and McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 121–132.
- McCullough, J., Colf, L.A., and Sundquist, W.I. (2013). Membrane Fission Reactions of the Mammalian ESCRT Pathway. *Annu. Rev. Biochem.*
- McMahon, H.T., and Gallop, J.L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438, 590–596.
- Miller, M., and Peters, A. (1981). Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.* 203, 555–573.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075.
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.Y., Morham, S.G., Gygi, S.P., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* 26, 4215–4227.
- Morita, E., Colf, L.A., Karren, M.A., Sandrin, V., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I. (2010). Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12889–12894.
- Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., and Sundquist, W.I. (2011). ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe* 9, 235–242.
- Morita, M., Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Hosler, B., Sapp, P., Englund, E., Mitchell, J.E., Habgood, J.J., de Belleruche, J., Xi, J., et al. (2006). A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology* 66, 839–844.
- Morlot, S., and Roux, A. (2013). Mechanics of dynamin-mediated membrane fission. *Annu. Rev. Biophys.* 42, 629–649.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774–776.
- Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 183–194.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* 20, 4050–4058.
- Muziol, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R.B., Zamborlini, A., Usami, Y., Gottlinger, H., and Weissenhorn, W. (2006). Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell* 10, 821–830.

## N

- Nabhan, J.F., Hu, R., Oh, R.S., Cohen, S.N., and Lu, Q. (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 4146–4151.
- Neto, H., Collins, L.L., and Gould, G.W. (2011). Vesicle trafficking and membrane remodelling in cytokinesis. *Biochem. J.* 437, 13–24.
- Newpher, T.M., and Ehlers, M.D. (2008). Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron* 58, 472–497.
- Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R., and Kasai, H. (2005). Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron* 46, 609–622.

## O

- Odorizzi, G. (2006). The multiple personalities of Alix. *J. Cell Sci.* 119, 3025–3032.

Ogura, T., and Wilkinson, A.J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* 6, 575–597.

Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A., and Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.* 7, 1104–1112.

Opazo, P., Sainlos, M., and Choquet, D. (2012). Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 453–460.

Ostroff, L.E., Fiala, J.C., Allwardt, B., and Harris, K.M. (2002). Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* 35, 535–545.

## P

Palade, G.E., and Palay, S.L. (1954). Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat. Rec.* 118, 335–336.

Palay, S.L., and Palade, G.E. (1955). The fine structure of neurons. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 69–88.

Pan, S., Wang, R., Zhou, X., He, G., Koomen, J., Kobayashi, R., Sun, L., Corvera, J., Gallick, G.E., and Kuang, J. (2006). Involvement of the conserved adaptor protein Alix in actin cytoskeleton assembly. *J. Biol. Chem.* 281, 34640–34650.

Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651–657.

Park, M., Penick, E.C., Edwards, J.G., Kauer, J.A., and Ehlers, M.D. (2004). Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305, 1972–1975.

Park, M., Salgado, J.M., Ostroff, L., Helton, T.D., Robinson, C.G., Harris, K.M., and Ehlers, M.D. (2006). Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52, 817–830.

Parkinson, N., Ince, P.G., Smith, M.O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P.M., Morrison, K.E., Pall, H.S., Hardiman, O., Collinge, J., et al. (2006). ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 67, 1074–1077.

Pashkova, N., Gakhar, L., Winistorfer, S.C., Sunshine, A.B., Rich, M., Dunham, M.J., Yu, L., and Piper, R.C. (2013). The yeast Alix homolog Bro1 functions as a ubiquitin receptor for protein sorting into multivesicular endosomes. *Dev. Cell* 25, 520–533.

Patt, S., and Gerhard, L. (1993). A Golgi study of human locus coeruleus in normal brains and in Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 19, 519–523.

Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N., and Weissenhorn, W. (2011). Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem. Sci.* 36, 199–210.

Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., VanLeeuwen, J.-E., and Woolfrey, K.M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 14, 285–293.

Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., et al. (2009). A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure* 17, 843–856.

Popov, V., Medvedev, N.I., Davies, H.A., and Stewart, M.G. (2005). Mitochondria form a filamentous reticular network in hippocampal dendrites but are present as discrete bodies in axons: a three-dimensional ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.* 492, 50–65.

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

Purves, D. (2004). *Neuroscience*, 3rd Edition (Sinauer Associates).

## Q

Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344.

## R

- Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445–452.
- Raiborg, C., Bache, K.G., Gillooly, D.J., Madhus, I.H., Stang, E., and Stenmark, H. (2002). Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat. Cell Biol.* 4, 394–398.
- Ramachandran, B., and Frey, J.U. (2009). Interfering with the actin network and its effect on long-term potentiation and synaptic tagging in hippocampal CA1 neurons in slices in vitro. *J. Neurosci.* 29, 12167–12173.
- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A., and Stevens, T.H. (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.
- Razi, M., and Futter, C.E. (2006). Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Mol. Biol. Cell* 17, 3469–3483.
- Reid, E., Connell, J., Edwards, T.L., Duley, S., Brown, S.E., and Sanderson, C.M. (2005). The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Hum Mol Genet* 14, 19–38.
- Rohrer, J.D., Ahsan, R.L., Isaacs, A.M., Nielsen, J.E., Ostergaard, L., Scahill, R., Warren, J.D., Rossor, M.N., Fox, N.C., and Johannsen, P. (2009). Presymptomatic generalized brain atrophy in frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutation. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 27, 182–186.
- Rollinson, S., Rizzu, P., Sikkink, S., Baker, M., Halliwell, N., Snowden, J., Traynor, B.J., Ruano, D., Cairns, N., Rohrer, J.D., et al. (2009). Ubiquitin associated protein 1 is a risk factor for frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiol. Aging* 30, 656–665.
- De Roo, M., Klauser, P., Mendez, P., Poglia, L., and Muller, D. (2008). Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cereb. Cortex* 18, 151–161.
- Rostaing, P., Real, E., Siksou, L., Lechaire, J.-P., Boudier, T., Boeckers, T.M., Gertler, F., Gundelfinger, E.D., Triller, A., and Marty, S. (2006). Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography. *Eur. J. Neurosci.* 24, 3463–3474.
- Rothman, J.H., and Stevens, T.H. (1986). Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* 47, 1041–1051.
- Roussignol, G., Ango, F., Romorini, S., Tu, J.C., Sala, C., Worley, P.F., Bockaert, J., and Fagni, L. (2005). Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J. Neurosci.* 25, 3560–3570.
- Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? *J Cell Sci* 122, 2179–2183.
- Rusten, T.E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L.M.W., Nezis, I.P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J.-P., Brech, A., Bilder, D., et al. (2007). ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr. Biol.* 17, 1817–1825.

## S

- Sacktor, T.C. (2012). Memory maintenance by PKM $\zeta$ --an evolutionary perspective. *Mol. Brain* 5, 31.
- Saksena, S., and Emr, S.D. (2009). ESCRTs and human disease. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 167–172.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., and Emr, S.D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136, 97–109.
- Sala, C., Pièch, V., Wilson, N.R., Passafaro, M., Liu, G., and Sheng, M. (2001). Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31, 115–130.
- Samson, R.Y., Obita, T., Freund, S.M., Williams, R.L., and Bell, S.D. (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science* (80-. ). 322, 1710–1713.
- Von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.P., Cimbara, D.M., et al. (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* 114, 701–713.

- Selemon, L.D., and Goldman-Rakic, P.S. (1999). The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* *45*, 17–25.
- Sette, P., Nagashima, K., Piper, R.C., and Bouamr, F. (2013). Ubiquitin conjugation to Gag is essential for ESCRT-mediated HIV-1 budding. *Retrovirology* *10*, 79.
- Sharma, K., Fong, D.K., and Craig, A.M. (2006). Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Mol. Cell. Neurosci.* *31*, 702–712.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 823–847.
- Shestakova, A., Hanono, A., Drosner, S., Curtiss, M., Davies, B.A., Katzmann, D.J., and Babst, M. (2010). Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III. *Mol Biol Cell* *21*, 1059–1071.
- Shim, S., Kimpler, L.A., and Hanson, P.I. (2007). Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic* *8*, 1068–1079.
- Shirk, A.J., Anderson, S.K., Hashemi, S.H., Chance, P.F., and Bennett, C.L. (2005). SIMPLE interacts with NEDD4 and TSG101: evidence for a role in lysosomal sorting and implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Neurosci. Res.* *82*, 43–50.
- Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S., and Wang, Y. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* *257*, 201–206.
- Skibinski, G., Parkinson, N.J., Brown, J.M., Chakrabarti, L., Lloyd, S.L., Hummerich, H., Nielsen, J.E., Hodges, J.R., Spillantini, M.G., Thusgaard, T., et al. (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* *37*, 806–808.
- Sleegers, K., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. (2010). Molecular pathways of frontotemporal lobar degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* *33*, 71–88.
- Smith, D.L., Pozueta, J., Gong, B., Arancio, O., and Shelanski, M. (2009). Reversal of long-term dendritic spine alterations in Alzheimer disease models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16877–16882.
- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., et al. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat. Neurosci.* *8*, 1051–1058.
- Sotelo, C. (1990). Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J. Exp. Biol.* *153*, 225–249.
- Sotelo, C. (2003). Viewing the brain through the master hand of Ramón y Cajal. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 71–77.
- Spacek, J., and Harris, K.M. (1997). Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J. Neurosci.* *17*, 190–203.
- Stefanowska, M. (1897). Sur les appendices des dendrites. *Bull. Des Séances Société R. Des Sci. Médicales Nat. Bruxelles.*
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., and Göttlinger, H.G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* *114*, 689–699.
- Stuchell-Breteron, M.D., Skalicky, J.J., Kieffer, C., Karren, M.A., Ghaffarian, S., and Sundquist, W.I. (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* *449*, 740–744.
- Stuffers, S., Brech, A., and Stenmark, H. (2009). ESCRT proteins in physiology and disease. *Exp Cell Res* *315*, 1619–1626.
- Suetsugu, S., Toyooka, K., and Senju, Y. (2010). Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 340–349.
- Swann, J.W., Al-Noori, S., Jiang, M., and Lee, C.L. (2000). Spine loss and other dendritic abnormalities in epilepsy. *Hippocampus* *10*, 617–625.
- Sweet, R.A., Henteleff, R.A., Zhang, W., Sampson, A.R., and Lewis, D.A. (2009). Reduced dendritic spine density in auditory cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* *34*, 374–389.

## T

- Tada, T., Simonetta, A., Batterton, M., Kinoshita, M., Edbauer, D., and Sheng, M. (2007). Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. *Curr. Biol.* *17*, 1752–1758.
- Takashima, S., Becker, L.E., Armstrong, D.L., and Chan, F. (1981). Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res.* *225*, 1–21.
- Tamai, K., Tanaka, N., Nara, A., Yamamoto, A., Nakagawa, I., Yoshimori, T., Ueno, Y., Shimosegawa, T., and Sugamura, K. (2007). Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *360*, 721–727.
- Tanikawa, S., Mori, F., Tanji, K., Kakita, A., Takahashi, H., and Wakabayashi, K. (2012). Endosomal sorting related protein CHMP2B is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions in  $\alpha$ -synucleinopathy. *Neurosci. Lett.* *527*, 16–21.
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S.D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell* *15*, 578–589.
- Teis, D., Saksena, S., Judson, B.L., and Emr, S.D. (2010). ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J.* *29*, 871–883.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* *30*, 572–580.
- Théry, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 569–579.
- Thomas, G.M., and Huganir, R.L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 173–183.
- Trinchese, F., Liu, S., Battaglia, F., Walter, S., Mathews, P.M., and Arancio, O. (2004). Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann. Neurol.* *55*, 801–814.
- Tsang, H.T., Connell, J.W., Brown, S.E., Thompson, A., Reid, E., and Sanderson, C.M. (2006). A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics* *88*, 333–346.
- Tsay, D., and Yuste, R. (2004). On the electrical function of dendritic spines. *Trends Neurosci.* *27*, 77–83.
- Tu, J.C., Xiao, B., Yuan, J.P., Lanahan, A.A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D.J., and Worley, P.F. (1998). Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* *21*, 717–726.
- Tu, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M., et al. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* *23*, 583–592.

## U

- Urwin, H., Authier, A., Nielsen, J.E., Metcalf, D., Powell, C., Froud, K., Malcolm, D.S., Holm, I., Johannsen, P., Brown, J., et al. (2010). Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 2228–2238.
- Usami, Y., Popov, S., Weiss, E.R., Vriesema-Magnuson, C., Calistri, A., and Gottlinger, H.G. (2012). Regulation of CHMP4/ESCRT-III Function in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Budding by CC2D1A. *J Virol.*

## V

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

## W

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V, Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.

Watts, G.D.J., Wymer, J., Kovach, M.J., Mehta, S.G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M.P., and Kimonis, V.E. (2004). Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat. Genet.* 36, 377–381.

Wegner, A.M., Nebhan, C.A., Hu, L., Majumdar, D., Meier, K.M., Weaver, A.M., and Webb, D.J. (2008). N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J. Biol. Chem.* 283, 15912–15920.

Wemmer, M., Azmi, I., West, M., Davies, B., Katzmann, D., and Odorizzi, G. (2011). Bro1 binding to Snf7 regulates ESCRT-III membrane scission activity in yeast. *J. Cell Biol.* 192, 295–306.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., and Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093–1097.

Wollert, T., and Hurley, J.H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464, 864–869.

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

Woodman, P.G., and Futter, C.E. (2008). Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 408–414.

## X

Xiao, J., Chen, X.-W., Davies, B.A., Saltiel, A.R., Katzmann, D.J., and Xu, Z. (2009). Structural basis of Ist1 function and Ist1-Did2 interaction in the multivesicular body pathway and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 20, 3514–3524.

Xie, Y., Vessey, J.P., Konecna, A., Dahm, R., Macchi, P., and Kiebler, M.A. (2007). The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Curr. Biol.* 17, 1746–1751.

Xu, J., Nonogaki, M., Madhira, R., Ma, H.-Y.Y., Hermanson, O., Kioussi, C., and Gross, M.K. (2012). Population-Specific Regulation of Chmp2b by Lbx1 during Onset of Synaptogenesis in Lateral Association Interneurons. *PLoS One* 7, e48573.

## Y

Yamazaki, Y., Takahashi, T., Hiji, M., Kurashige, T., Izumi, Y., Yamawaki, T., and Matsumoto, M. (2010). Immunopositivity for ESCRT-III subunit CHMP2B in granulovacuolar degeneration of neurons in the Alzheimer's disease hippocampus. *Neurosci. Lett.* 477, 86–90.

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

Yorikawa, C., Shibata, H., Waguri, S., Hatta, K., Horii, M., Katoh, K., Kobayashi, T., Uchiyama, Y., and Maki, M. (2005). Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting. *Biochem J* 387, 17–26.

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

Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S.R., Popova, E., Palu, G., and Gottlinger, H. (2006). Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19140–19145.

Van der Zee, J., Urwin, H., Engelborghs, S., Bruyland, M., Vandenberghe, R., Dermaut, B., De Pooter, T., Peeters, K., Santens, P., De Deyn, P.P., et al. (2008). CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Hum. Mol. Genet.* 17, 313–322.

## Z

Zhou, Q., Homma, K.J., and Poo, M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44, 749–757.

Zimmerberg, J., and Kozlov, M.M. (2006). How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 9–19.

Ziv, N.E., and Smith, S.J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17, 91–102.

Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., and Gan, W.-B. (2005). Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 46, 181–189.

## Résumé

CHMP2B est une sous-unité du complexe ESCRT-III, un complexe cytosolique très conservé, responsable du remodelage des membranes biologique, dans divers processus cellulaires. Des mutations de *CHMP2B* sont associées à une forme familiale de démence frontotemporale. Une étude précédente a mis en évidence que les mutants pathogènes de CHMP2B altèrent la morphologie des épines dendritiques, un phénomène potentiellement à l'origine de la maladie. **Ce travail de recherche a pour objectif de décrire le rôle de CHMP2B, et du complexe ESCRT-III, dans la structure et le fonctionnement des épines dendritiques.** Dans des lignées cellulaires, nous avons démontré que CHMP2B a la propriété de s'associer préférentiellement à la membrane plasmique, de se polymériser en filaments hélicoïdaux et de former de longs et fins tubes membranaires. Ce résultat indique que CHMP2B est directement impliqué dans le remodelage de la membrane plasmique. Dans les neurones, CHMP2B se concentre dans des régions sous-membranaires proches de la PSD. Une analyse biochimique a montré que CHMP2B et CHMP4B sont associées à d'autres sous-unités, pour former un complexe ESCRT-III postsynaptique particulièrement stable. Nous avons identifié par spectrométrie de masse que ce complexe interagit également avec des protéines d'échafaudage postsynaptiques et des protéines de remodelage du cytosquelette d'actine. La déplétion de CHMP2B par RNAi, dans des neurones en culture, affecte la complexité de l'arborisation dendritique, la morphologie des épines dendritiques et empêche le gonflement des épines associé à la LTP. Des expériences de récupération, avec des mutants ponctuels, indiquent que le rôle de CHMP2B dans le maintien de l'arborisation dendritique est dépendant à la fois de de son association avec ESCRT-III et la bicouche phospholipidique. **Nous proposons une nouvelle fonctionnalité pour un complexe ESCRT-III contenant CHMP2B, dans les processus de remodelage de la membrane postsynaptique associés à la maturation et à la plasticité des épines dendritiques.**

## Abstract

CHMP2B is a subunit of ESCRT-III, a highly conserved cytosolic protein machinery, responsible for membrane remodeling in diverse cellular mechanisms. Mutations in *CHMP2B* are responsible for a familial form of frontotemporal dementia. A previous study highlighted that FTD-related mutants of CHMP2B impair the morphological maturation of dendritic spines, a process that may underlie neurodegeneration in this disease. **The goal of this research work is directed towards understanding the role of CHMP2B and ESCRT-III in dendritic spines structure and function.** In cell lines, we demonstrated that CHMP2B associates preferentially with the plasma membrane, polymerizes in helical filaments and forms long and thin membrane protrusions. This result indicates that CHMP2B is directly involved in plasma membrane remodeling. In neurons, CHMP2B concentrates in specific sub-membrane microdomains close to the PSD. Biochemical analysis revealed that CHMP2B and CHMP4B associate with other subunits to form a remarkably stable postsynaptic ESCRT-III complex. Mass-spectrometry indicated that this complex also interacts with postsynaptic scaffolds and proteins involved in actin cytoskeleton remodeling. RNAi depletion of CHMP2B, in cultured neurons, alters stability of dendrite branching and morphology of dendritic spines, and impairs spine head growth, normally associated with LTP. Rescue experiments, with point mutants, indicated that CHMP2B activity in dendrite branching is dependent on its capacity to both bind phospholipids and oligomerize with ESCRT-III. **We propose a novel functionality for an ESCRT-III complex containing CHMP2B, in maturation-dependent and plasticity-dependent processes of dendritic spine morphogenesis.**