



HAL
open science

Etude de la dynamique des adhésions neuronales N-cadhérine et L1 dans la croissance axonale et la synaptogenèse

Caroline Pruvost Née Dequidt

► **To cite this version:**

Caroline Pruvost Née Dequidt. Etude de la dynamique des adhésions neuronales N-cadhérine et L1 dans la croissance axonale et la synaptogenèse. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Victor Segalen - Bordeaux II, 2007. Français. NNT: . tel-00164823

HAL Id: tel-00164823

<https://theses.hal.science/tel-00164823>

Submitted on 23 Jul 2007

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

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

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologiques et Médicales

Option : Neurosciences et Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 mai 2007

Par Caroline Anne DEQUIDT PRUVOST

Née le 4 juin 1980 à Nancy (54)

Etude de la dynamique des adhésions neuronales N-cadhérine et L1
dans la croissance axonale et la synaptogenèse

Membres du Jury

Pr Jochen LANG	Président
Pr Laurent FAGNI	Examineur
Dr Hélène FERACCI	Examineur
Pr René-Marc MEGE	Rapporteur
Dr Valérie CASTELLANI	Rapporteur
Dr Catherine FAIVRE-SARRAILH	Membre invité
Dr Olivier THOUMINE	Directeur de thèse

Cette thèse a été effectuée dans le laboratoire « Physiologie Cellulaire de la Synapse », C.N.R.S. U.M.R. 5091, dirigé par Christophe Mulle, dans l'équipe de Daniel Choquet.

Remerciements

Je dois bien sûr remercier en premier lieu Olivier Thoumine qui a dirigé ma thèse, et qui s'est montré présent du début à la fin. Il n'a jamais été avare de son temps, pour des conseils, des explications ou une discussion sur les données, il a supporté mes petits défauts et il m'a soutenue. Je remercie aussi tous les membres de l'équipe et du laboratoire. Pierre Gonzalez, notre technicien, Jérôme Baussart, notre gestionnaire, et les ingénieurs, Delphine Bouchet-Tessier, Christelle Breillat, Elizabeth Normand, Béatrice Tessier, Françoise Rossignol, Alice Vimoney sont des personnes qui ont rendu ce travail possible, notamment en effectuant des cultures primaires de neurones d'hippocampe de qualité. Christelle Breillat m'a aussi particulièrement épaulé pour la biologie moléculaire. Les chefs, bien sûr, notamment Daniel Choquet, un chef motivant par son enthousiasme et la qualité de sa réflexion scientifique, Agnès Hémar, d'une bonne humeur et d'une disponibilité impressionnantes et Christophe Mulle, énergique et souriant. Et je remercie également tous les autres membres du laboratoire avec qui j'ai interagi. Parmi ceux-ci, je pense évidemment à Jean-Luc Pruvost, pour ses corrections et ses conseils, mais surtout pour son soutien moral et sa présence. Hors du laboratoire, je souhaite remercier nos collaborateurs, en particulier Thierry Galli et des membres de son équipe (Lydia Danglot, Philipp Alberts), Maria Passafaro et Laura Saglietti, ainsi que Julien Falk. Je n'oublie les membres du jury, qui sont souvent par ailleurs des personnes avec qui l'équipe a travaillé et travaillera encore : René-Marc Mège, Jochen Lang, Laurent Fagni, Hélène Feracci, Valérie Castellani et Catherine Faivre-Sarrailh.

Résumé

Lors des processus développementaux d'élongation axonale et de synaptogenèse, les protéines d'adhésion telles les cadhérines ou les Ig-CAM jouent des rôles fondamentaux en permettant la formation de contacts entre neurones. Pour étudier la dynamique de ces contacts et leurs rôles dans ces processus, nous avons mis en œuvre des techniques d'imagerie sur des neurones primaires d'hippocampe (clivage thrombine, FRAP, pinces optiques, quantum-dots), ceux-ci étant associés à un système semi-artificiel de microsphères recouvertes de protéines d'adhésion purifiées (N-cadhérine et L1). En utilisant une construction L1 portant une étiquette GFP extracellulaire clivable à la thrombine, j'ai pu préciser l'implication des processus de diffusion membranaire et d'exo- endocytose dans la dynamique des contacts L1-dépendants et obtenir des données quantitatives relatives à l'interaction homophile L1. J'ai également contribué à caractériser la liaison extracellulaire entre N-cadhérine et GluR2, sous-unité des récepteurs AMPA, et l'influence de l'expression de la N-cadhérine sur la mobilité de GluR2. L'interaction entre ces deux protéines pourrait être impliquée dans la formation et/ou la maturation des synapses.

Mots-clefs

Adhésion, Neurone, Hippocampe, Cône de croissance, L1, L1-CAM, Ig-CAM, Trafic membranaire, TI-VAMP, Synapse, Synaptogenèse, N-cadhérine, GluR2, AMPAR, Diffusion, FRAP, Pincés optiques, Quantum-Dots

Summary

During the developmental process of axonal elongation and synaptogenesis, adhesion proteins such as cadherins and Ig-CAMs play a fundamental role by mediating neuronal contacts. In order to study the dynamics of these contacts and their role in these processes, we used imaging techniques : thrombin cleavage, FRAP, optical tweezers, quantum-dots, to observe live hippocampal primary neurons, which were associated to a semi-artificial system of microspheres coated with purified adhesion proteins (N-cadherin and L1). Using a L1 construct bearing an extracellular thrombin cleavable GFP, I could determine how the processes of diffusion and exo- endocytosis were involved in the dynamics of L1-dependant contacts and obtain quantitative data concerning L1 homophilic interaction. I also contributed to characterise the extracellular link between N-cadherin and GluR2, an AMPAR subunit, and the influence of N-cadherin expression on GluR2 mobility. The interaction between these two proteins could be implicated in the formation and/or the maturation of synapses.

Key words

Adhesion, Neuron, Hippocampus, Growth cone, L1, L1-CAM, Ig-CAM, Membrane traffic, TI-VAMP, Synapse, Synaptogenesis, N-cadherin, GluR2, AMPAR, Diffusion, FRAP, Optical tweezers, Quantum-Dots

TABLE DES MATIERES

<u>Remerciements</u>	2
<u>Résumé</u>	3
<u>ABREVIATIONS</u>	6
<u>INTRODUCTION</u>	7
<u>I- Les protéines d'adhésion du neurone dans le système nerveux central : rôle et diversité</u>	7
<u>I.A- Enjeux</u>	7
<u>I.B- Les protéines d'adhésion</u>	10
<u>II- Le cône de croissance et L1-CAM, une Ig-CAM</u>	24
<u>II.A- Physiologie du cône de croissance du neurone d'hippocampe</u>	24
<u>II.B- Trafic cellulaire et adressage de L1-CAM dans le cône</u>	35
<u>III- Relations entre protéines d'adhésions et récepteurs aux neurotransmetteurs ; implication dans la synaptogenèse</u>	43
<u>III.A- Mécanismes de la synaptogenèse</u>	43
<u>III.B- Place de la N-cadhérine dans ce processus</u>	53
<u>MATERIELS ET METHODES</u>	67
<u>Etude de la dynamique des contacts homophiles L1</u>	83
<u>I/ RESULTATS</u>	83
<u>1- Article I : "Fast turnover of L1 adhesions in neuronal growth cones involving both surface diffusion and exo/endocytosis of L1 molecules"</u>	83
<u>2- EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES</u>	87
<u>II/ DISCUSSION</u>	90
<u>ARTICLE</u>	93
<u>Etude de l'interaction entre la N-cadhérine et GluR2</u>	107
<u>I/ RESULTATS</u>	107
<u>1- Article II : "Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation"</u>	109
<u>2- EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES</u>	110
<u>II/ DISCUSSION</u>	111
<u>ARTICLE</u>	113
<u>Conclusion générale</u>	138
<u>Références bibliographiques</u>	140
<u>Liste des publications et communications</u>	160

ABBREVIATIONS

ABP : AMPA receptor Binding Protein
CASK : Calcium/Calmodulin dependent Serine protein Kinase
CNR : Cadherin-related Neuronal Receptor protein
COSE : Cell Outgrowth Secretory Endosome : Endosome de sécrétion permettant la croissance neuritique
DIC : Contraste interférentiel différentiel
Domaines C, T et P : Domaines central, de transition et périphérique du cône de croissance
EC : Extracellulaire. Désigne les domaines extracellulaires répétés des cadhérines.
FGF : Fibroblast Growth Factor
GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GRIP : Glutamate Receptor Interacting Protein
JNM : Jonction neuro-musculaire
L1 : L1 Cell Adhesion Molecule, L1-CAM
LTP : Long-term potentiation. Potentiation à long terme
MAGUK : Membrane Associated Guanylate Kinase homologues. Ces protéines sont souvent impliquées dans l'échafaudage post-synaptique.
MEC : Matrice extra-cellulaire
MT : Microtubules.
Ncad : N-cadhérine
N-CAM : Neural Cell Adhesion Molecule
NgCAM : Neurone-glia Cell Adhesion Molecule
PDZ (postsynaptic density-95 (PSD-95)/Discs large/zona occludens-1) : Domaine protéique commun à ces trois protéines, permettant une interaction avec des partenaires possédant un site de liaison spécifique. Ces domaines, présent souvent en tandem sur une même molécule, sont des acteurs de la mise en place d'un réseau sous-membranaire de protéines, parmi lesquelles des protéines membranaires et des protéines de signalisation.
PICK : Protein that Interact with C Kinase
PPV : Plasmalemma Precursor Vesicles, vésicules précurseurs de la membrane plasmique
PSA : Acide poly-sialique, groupement glycosilé de taille importante porté par la molécule N-CAM.
PSD95 : Post-Synaptic Density protein 95
RGD : Séquence de trois acides aminés permettant la liaison à l'intégrine : Arg-Gly-Asp
Site ERM : Site de liaison à un groupe de protéines : Ezrine, Radixine, Moesine
SNC : Système nerveux central
TGN : Réseau trans-golgien (Trans Golgi Network)

INTRODUCTION

I- Les protéines d'adhésion du neurone dans le système nerveux central : rôle et diversité

I.A- Enjeux

I.A.1- Les protéines d'adhésion

Les protéines d'adhésion sont des protéines membranaires qui possèdent un domaine extracellulaire présentant une spécificité d'interaction avec une molécule identique (adhésion homophile) ou différente (adhésion hétérophile avec une autre protéine de la membrane, ou adhésion à la matrice extracellulaire). Par ces contacts, une cellule peut se lier et interagir avec ses voisines. Ces protéines sont diverses mais présentent des caractères communs : elles sont souvent transmembranaires, et réalisent des interactions, par leur partie intracellulaire, avec des protéines cytosoliques (cytosquelette, protéines de signalisation) ; leur partie extracellulaire est longue (plusieurs centaines d'acides aminés en général) et souvent constituée de domaines répétés (domaines extracellulaires (EC) pour les cadhérines (Yagi and Takeichi, 2000), domaines immunoglobuline (Ig) ou fibronectine pour les Ig-CAM, par exemple (Walsh and Doherty, 1997)).

Cependant, les protéines dites d'adhésion sont caractérisées par des affinités diverses vis-à-vis de leur ligand naturel, et elles ne sont pas toutes aussi adhésives. En terme d'affinité chimique, on peut définir une constante d'association, k_{on} (en $M^{-1}s^{-1}$) et une constante de dissociation k_{off} (en s^{-1}); le rapport entre ces deux constantes constitue la constante d'affinité K_a (en M^{-1}). Selon le contexte, les protéines d'adhésion peuvent être adhésives ou répulsives, comme le montre l'exemple de ephrin et EphR, couple de protéines qui a d'abord été défini comme chimiorépulsif, mais que l'on retrouve face à face au niveau de la synapse (Torres et al., 1998).

De la même façon, les protéines dites d'adhésion ont été définies au départ à cause du lien indirect ou direct qu'elles entretenaient avec des processus de cohésion, comme cela a été montré dans le cadre de travaux sur des cancers (Fawcett and Harris, 1992), mais elles se révèlent toutes être des acteurs importants de la signalisation cellulaire. Il ne s'agit donc pas d'une simple « colle moléculaire » (Buckley et al., 1998).

C'est par cette fonction de signalisation intracellulaire que ces protéines jouent un rôle dans les processus impliqués dans le développement du système nerveux central ((Scheiffele, 2003), (Kiryushko et al., 2004)).

I.A.2- Rôle des protéines d'adhésion

Chez les métazoaires, les cellules sont organisées en tissus, d'autant plus qu'elles sont mieux différenciées et spécialisées. Les systèmes adhésifs permettent la cohésion mécanique entre cellules et rendent ainsi possible une interaction fonctionnelle. Ils sont également impliqués dans la motilité des cellules, dans la morphologie des cellules et des tissus, dans la régulation de la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.

Dans le système nerveux central des vertébrés, les protéines d'adhésion sont des acteurs importants du développement précoce du cerveau et des neurones, et elles jouent aussi un rôle dans des fonctions cérébrales complexes comme la mémoire et l'apprentissage (Sakisaka and Takai, 2005). Elles sont impliquées dans les relations entre neurones et cellules gliales (interaction avec les astrocytes et les cellules de Schwann), et dans les relations entre neurones, axone-axone ou axone-dendrite.

Dans le neurone, les protéines d'adhésion interviennent à plusieurs étapes de la différenciation et de la maturation. Elles contribuent à la croissance axonale, pouvant soit en être le moteur, soit prendre part aux systèmes de signalisation du guidage axonal (Mueller, 1999); elles facilitent ou inhibent la fasciculation. Ce rôle dans le guidage a été étudié depuis longtemps, comme le montrent les multiples expériences de croissance axonale sur différents substrats adhésifs entre 1970 et 1990 (Dickson, 2002).

Elles interviennent également dans la synaptogénèse au sens large, c'est-à-dire dans les étapes précoces de formation des synapses, la maturation et la plasticité synaptiques (Dalva et al., 2007). Leur implication dans ces processus n'est encore que partiellement déterminée, mais elles pourraient intervenir à plusieurs niveaux ((Yamagata et al., 2003), fig.1) :

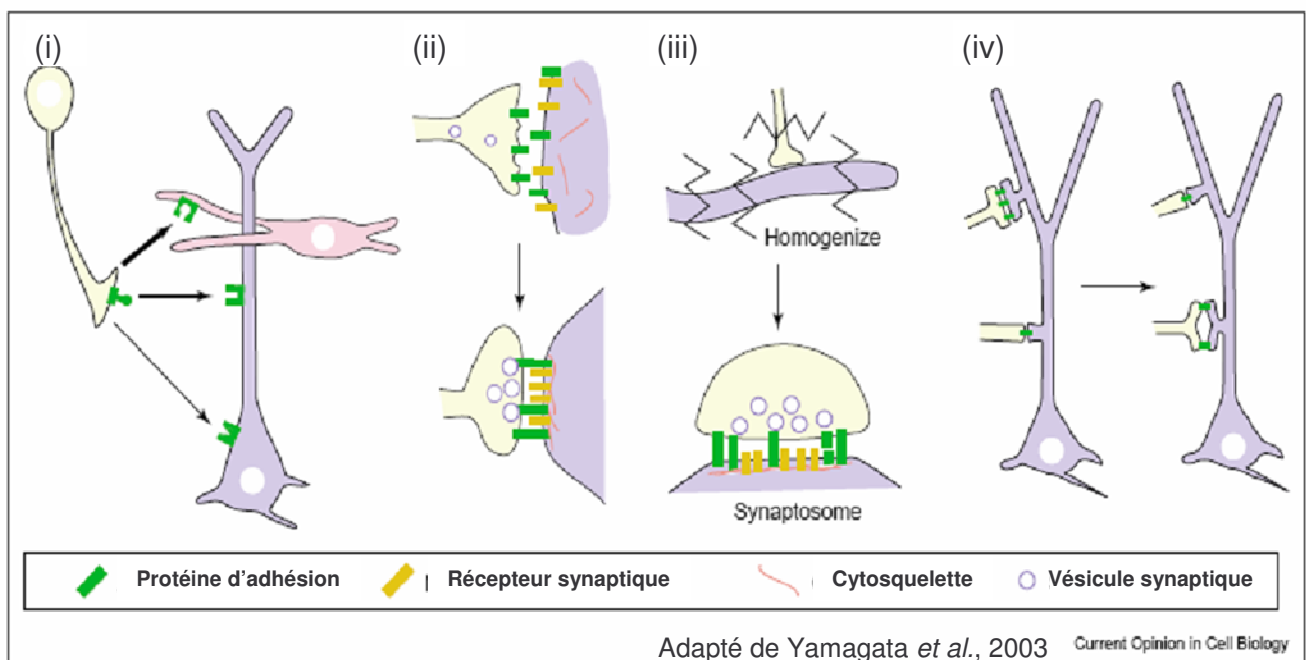


Figure 1

Rôles potentiels des molécules d'adhésion à la synapse

i La reconnaissance de la cible

Lors d'un contact précoce entre neurones, les protéines d'adhésion sont en première ligne pour reconnaître les protéines d'adhésion du neurone cible, et si elles ont une certaine affinité entre elles, pour stabiliser au moins temporairement ce contact. Ce mécanisme clef-serrure est proche de celui impliqué dans la signalisation lors de la croissance axonale, et pourrait relever des mêmes systèmes.

ii La maturation des synapses

Lorsqu'un contact précoce se stabilise, la mise en place de la zone active et de la densité post-synaptique et le recrutement des partenaires synaptiques pourraient être permis par l'interaction directe ou indirecte des protéines d'adhésion avec d'autres protéines de la synapse, par exemple par leurs domaines intracellulaires.

iii Le maintien de l'intégrité des jonctions et la stabilisation des synapses

Il s'agit notamment de conserver les constituants de la zone active et de la densité post-synaptique en vis-à-vis. Dans les synapses matures, cette cohésion est telle qu'en fractionnant mécaniquement le neurone, ou bien en présence de détergents, on obtient des synaptosomes, structures contenant la zone présynaptique et la zone postsynaptique (Gray and Whittaker, 1962).

iv La plasticité synaptique

La modification de la « force » de la conduction synaptique, passe notamment par la régulation de la quantité des constituants de la synapse. Par la modification de la forme des épines dendritiques (morphogénèse), le recrutement plus ou moins important de protéines d'échafaudage de la synapse, les protéines d'adhésion peuvent contrôler cette plasticité.

Le rôle des protéines d'adhésion dans la relation avec les autres composants du système nerveux central ou SNC (matrice extracellulaire et glies), est également important, mais sera peu développé ici.

I.A.3- Rôle particulier des protéines d'adhésion du neurone

En raison de la complexité des relations cellulaires existant dans le SNC, les systèmes adhésifs ont une tâche ardue. En effet, un neurone donné doit pouvoir contacter des cellules qui ne sont pas proches géographiquement, et se garder d'établir des liens avec des neurones de structures voisines.

Il est possible que la structure arborescente du neurone soit permise par le caractère relativement peu adhésif de sa surface par rapport à d'autres cellules et à la matrice extracellulaire qui l'entoure. Ainsi, pour cultiver des neurones (par exemple issus de l'hippocampe) sur une lamelle, il faut nécessairement fonctionnaliser sa surface (par exemple, par de la polylysine à grande concentration). De même, si on met ces mêmes neurones en contacts avec des billes de latex, l'adhésion ne s'effectue que si la bille est recouverte d'une protéine d'adhésion adéquate (N-cadhérine ou L1, par exemple) ; des cellules de lignées (fibroblastes, HEK ou Cos7 par exemple) ou des cellules gliales montrent un caractère adhésif beaucoup

plus général et moins spécifique.

Les protéines d'adhésion des neurones sont-elles plus diverses, plus spécifiques, que celles des autres cellules ?

Certains auteurs ((Redies and Takeichi, 1996), (Shapiro and Colman, 1999), (Hirano et al., 2003), (Serizawa et al., 2006)) émettent l'hypothèse que les molécules d'adhésions qu'exprime chaque neurone à sa surface pourraient jouer le rôle d'une véritable « carte d'identité », un code adhésif du neurone, et des types différents de neurones pourraient être définis par les protéines d'adhésion qu'ils possèdent. C'est ce que semblent montrer des expériences d'agrégation préférentielle de neurones issus de régions distinctes du cerveau, de façon dépendante du calcium ou non ((Gotz et al., 1996), (Wizenmann and Lumsden, 1997), (Whitesides and LaMantia, 1995)).

Plusieurs de ces protéines d'adhésion sont très polymorphes, car elles sont codées par plusieurs gènes et subissent un épissage alternatif important (Neves et al., 2004). Leur spécificité et leurs fonctionnalités fines sont modulées par de nombreuses modifications post-transcriptionnelles (épissages alternatifs, phosphorylations, clivages protéiques, ...) et des co-activations. La diversité et la complexité des systèmes adhésifs restent des obstacles à la détermination de leur rôle exact et à l'élucidation des mécanismes généraux régissant la croissance axonale et la formation des synapses.

I.B- Les protéines d'adhésion

I.B.1- Aperçu des molécules d'adhésions du système nerveux central

La première molécule d'adhésion qui fut caractérisée dans le cerveau est N-CAM ((Thiery et al., 1977), (Rutishauser et al., 1978)). Depuis, avec l'essor de la biologie moléculaire, la caractérisation des protéines d'adhésion du SNC s'est accélérée, avec en 1983 la découverte de la première cadhérine, l'uvomoruline (E-cadhérine) (Peyrieras et al., 1983), en 1986 la première mention de l'intégrine (Buck et al., 1986). Par la suite, de nombreux autres membres des trois familles principales de protéines d'adhésion que représentent ces trois protéines sont découverts. Il faut ajouter à cette liste le couple ephrin/EphR (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998) et le couple neurexine/neurologine (Ichtchenko et al., 1995). Une grande partie de ces molécules, sinon toutes, ont un rôle dans le développement du système nerveux central.

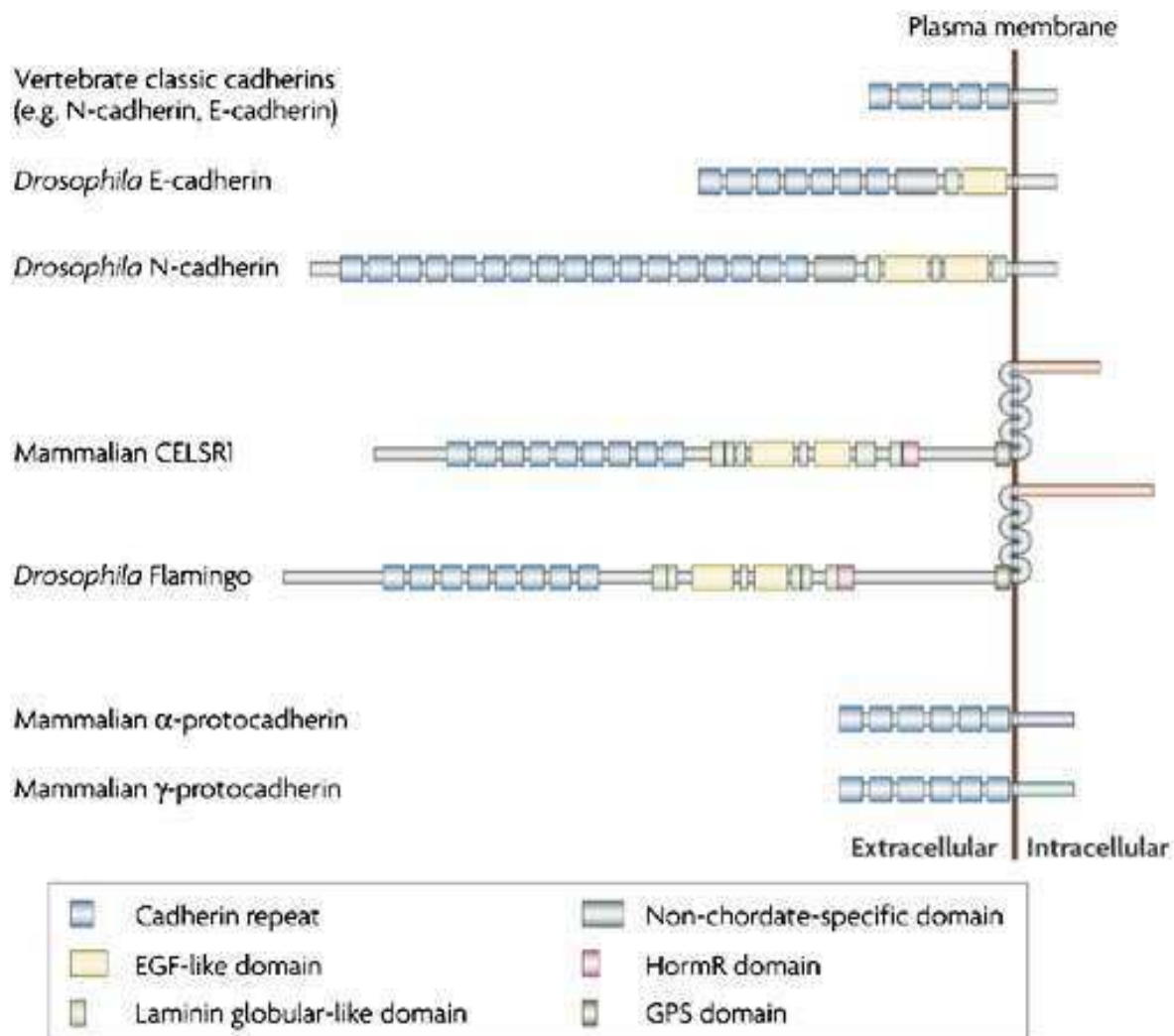
Cadhérines ((Takeichi, 2006), fig.2)

Les cadhérines classiques peuvent être classées en deux types :

typeI : N-cadhérine, E-cadhérine, P-cadhérine et R-cadhérine, qui sont assez ubiquitaires dans l'organisme.
 typeII : cadhérine-5 à cadhérine-12, cadhérine-18 à cadhérine-20. Elles sont plus spécifiques du SNC en général.

Il faut aussi mentionner les homologues découverts chez la drosophile DE- et DN-cadhérine de la E- et de la N-cadhérine des vertébrés. Ils sont structurellement différents mais semblent avoir des fonctions proches de celles de leurs homologues.

On connaît également les cadhérines non-classiques : les protocadhérines parmi lesquelles les CNR (cadherin-related neuronal receptor proteins) ou protocadhérine- α et les Celsr.



Dessin schématique des membres de la superfamille des cadhérines chez les vertébrés et de leurs homologues chez la drosophile.

Figure 2

Tiré de Takeichi, 2006
 Nature Reviews Neuroscience

Ig-CAM et molécules à domaines immunoglobulines ((Hortsch, 2000), fig. 3)





sous-famille de L1

L1 (et ses homologues Ng-CAM et Sax-7), Nr-CAM, CHL1 (close homologue of L1) qui ne montre pas de caractère d'adhésion homophile, neurofascine ; neurogliane et tractine (invertébrés)

Autres membres proches de la superfamille des Ig-CAM

N-CAM, (homologue de fascieline II chez la drosophile et apCAM chez l'aplysie), Tag-1 (transiently expressed axonal glycoprotein 1)/Axonine-1 (ancrée GPI), contactine/F11 (Murai et al., 2002), DCC (deleted in colon cancer), Ds-CAM (down syndrome cell adhesion molecule), aBGP, Ben/DM-Grasp, hémoline (invertébrés)

Domaines présents

-  domaine Immunoglobuline
-  domaine Fibronectine (FN)
-  domaine riche en proline, alanine, thréonine (domaine PAT)
-  domaine riche en leucine

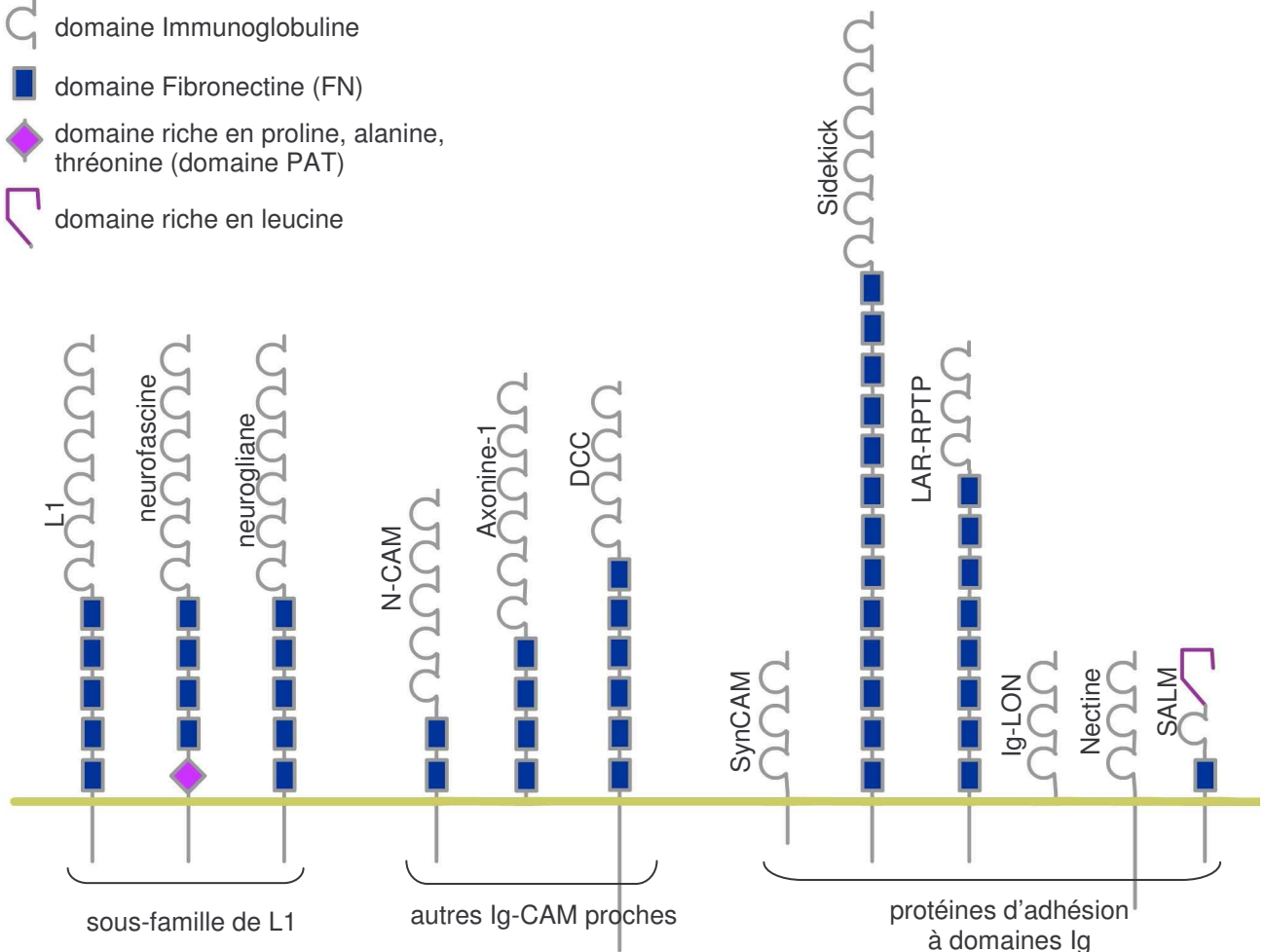


Figure 3

Quelques membres représentatifs de la superfamille des Ig-CAM

Autres molécules d'adhésion à domaines Ig

SynCAM (proche de Necl-2 nectin-like molecule), SYG-1 et SYG-2 (SYnaptoGenesis abnormal), Sidekick, Necl-1, LAR-RPTP, Dasm1 (shi04), P84 et son ligand IAP (Mi et al., 2000).

famille des Ig-LON (à ancre GPI) ((Miyata et al., 2003), (Yamagata et al., 2003)): LAMP (délimite les zones du cortex en relation avec le système limbique), OBCAM, kilon, CEPU-1

Nectines : nectine-1 et nectine-3 ((Mizoguchi et al., 2002), (Takai and Nakanishi, 2003)), molécules

d'adhésion plutôt hétérophiles.

SALM (Synaptic Adhesion Like Molecule) (Wang et al., 2006) et NGL2 (Netrin G2 Ligand) (Kim et al., 2006), deux molécules récemment révélées par des expériences de double-hybride avec des composants synaptiques, possédant un domaine transmembranaire, un domaine Ig et un domaine LRR (leucine rich repeats).

Les autres molécules (fig. 4)

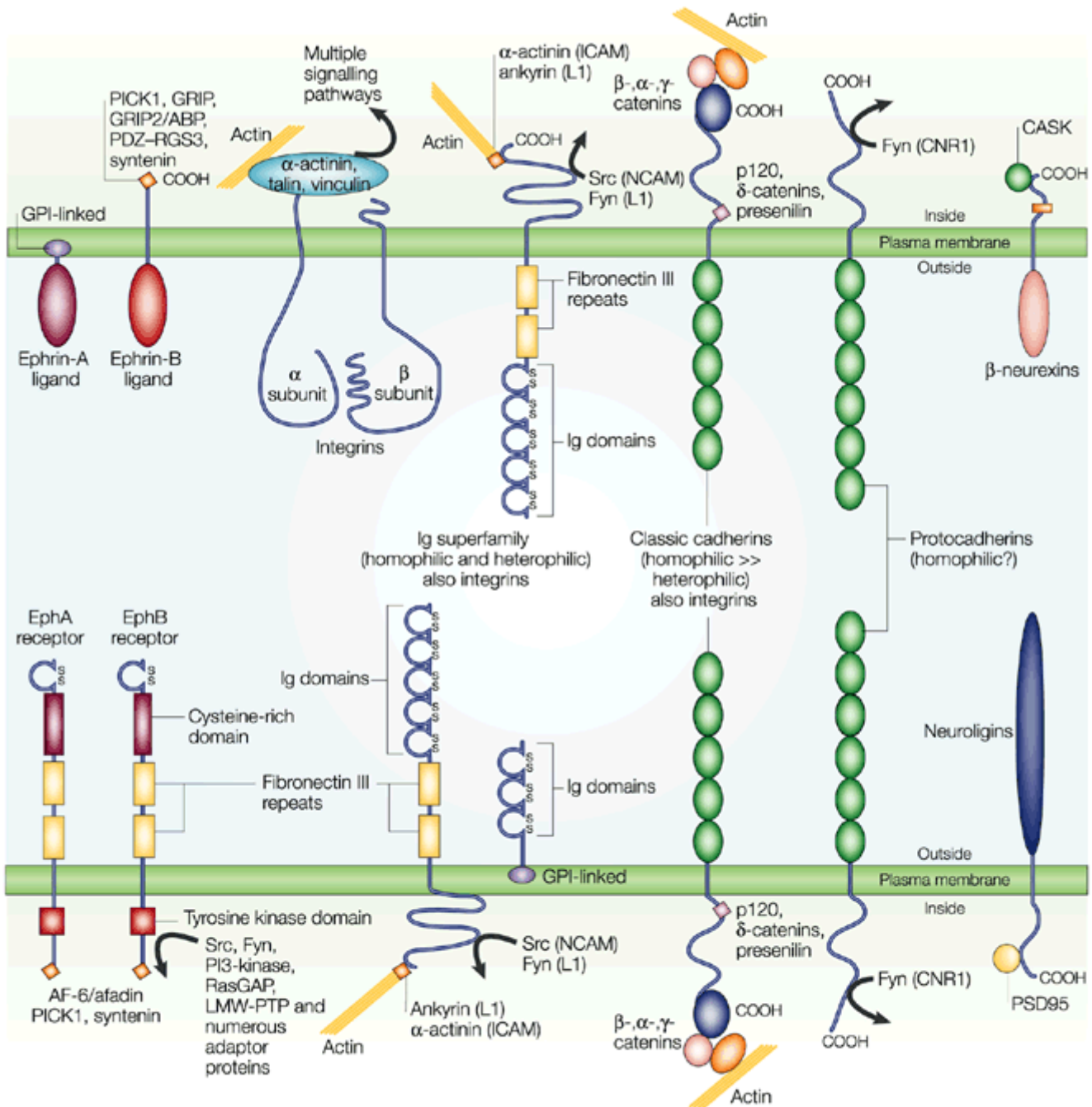


Schéma des protéines d'adhésion responsables de la reconnaissance au contact entre neurones et de leurs partenaires.

Tiré de Benson *et al.*, 2001
Nature Reviews | Neuroscience

Figure 4

ICAM : Intercellular Cell Adhesion Molecule; LMW-PTP : Low Molecular Weight PhosphoTyrosine Phosphatase; PDZ-RGS : Regulator of G protein Signalling; RasGAP : Ras GTPase-Activating Protein

Intégrines

Elles sont impliquées dans la formation de la jonction neuromusculaire (JNM) (Beumer et al., 2002), et auraient un rôle dans la formation des couches du cortex cérébral ((Anton et al., 1999), (Graus-Porta et al., 2001), (Benson et al., 2001)). Elles seraient également impliquées dans la maturation de synapses du SNC, notamment de l'hippocampe, alors que leurs ligands traditionnels de la matrice extracellulaire ne résident pas dans la fente synaptique (Chavis and Westbrook, 2001).

Couple neurexine-neuroligine

La neuroligine possède des domaines homologues aux domaines estérase, et serait localisée aux sites post-synaptiques. Les neurexines possèdent des domaines LNS (Laminin A/G, Neurexin, Sex hormone-binding globulin) ((Song et al., 1999), (Graf et al., 2004), (Chih et al., 2005)). Elles sont codées par trois gènes produisant chacun une forme longue à 6 domaines LNS (α) et une forme courte à un domaine LNS (β) (Lise and El-Husseini, 2006). Ces molécules seraient des acteurs majeurs de la synaptogenèse (cf IIIa).

EphR (à domaine tyrosine-kinase) et ephrine

Les récepteurs Eph sont de deux types : A (à ancre GPI) et B (transmembranaire) ((Kullander and Klein, 2002), (Martinez and Soriano, 2005)). Ces molécules, actives dans l'angiogenèse, étaient connues pour le caractère répulsif de leur interaction, mais elles peuvent également, selon leur concentration ou la présence d'autres facteurs, être adhésives. Le couple EphB/ephrineB intervient dans la synaptogenèse (Dalva et al., 2007).

I.B.2- Les Ig-CAM

Ces protéines responsables d'une adhésion cellulaire indépendante du calcium, possèdent des domaines homologues aux domaines immunoglobulines des anticorps. Leur expression est modulée par des processus d'épissage alternatif, voire de maturation génétique (comme ceux qui existent pour les anticorps) dans le cas de DsCAM. Elles peuvent montrer une très grande diversité (Stallcup and Beasley, 1985b). Nous nous sommes essentiellement intéressés à l'une des molécules principales de cette famille : L1.

L1 fut d'abord nommé, dès 1984 (Rathjen and Schachner, 1984), d'après un anticorps dont on avait nommé l'antigène L1. Il est homologue à NILE, NGF-inducible large external) chez le rat, qui avait été découvert plus précocement (McGuire et al., 1978). Cette protéine, encore appelée 8D9, est homologue à NgCAM (neuron-glia cell adhesion molecule) chez le poulet, et à SAX-7 chez *C. elegans*. L1 est le membre fondateur d'une sous-famille des Ig-CAM (Rathjen and Schachner, 1984), et plusieurs études ont démontré le rôle des membres de cette sous-famille dans la croissance, la fasciculation et le guidage axonaux ((Walsh and Doherty, 1997), (Brummendorf et al., 1998)). Ces protéines (L1, CHL1, neurofascin, NrCAM, neurogliane,

et tractine) se trouvent essentiellement au niveau des axones, ce qui n'est pas le cas de N-CAM ((Bartsch et al., 1989), (Persohn and Schachner, 1990)). Leur domaine extracellulaire est constitué de 6 motifs Ig et de 4 ou 5 motifs FNIII. Leur domaine intracellulaire est conservé en grande partie, avec notamment un site de liaison à l'ankyrine, protéine qui lie L1 à la spectrine (Brummendorf et al., 1998). Ces molécules appelées molécules d'adhésion sont engagées dans des interactions homophiles, mais aussi hétérophiles (Hortsch, 1996).

La gravité des pathologies liées à L1 nous renseigne sur le rôle important de la molécule, malgré l'apparente redondance du génome pour ces Ig-CAM qui sont nombreuses et dont les fonctions se superposent partiellement. Les individus présentant une mutation pour le gène L1, situé en Xq28 dans le génome, montrent une combinaison d'une ou plusieurs des pathologies suivantes : hydrocéphalie liée à l'X avec sténose de l'aqueduc de Sylvius (une naissance sur 30000), syndrome MASA, paraplégie spastique de type 1, agénésie du corps calleux ((Fransen et al., 1997), (Yamasaki et al., 1997)). Le modèle murin de ces pathologies, knock-out pour le gène L1, présente des anomalies essentiellement au niveau du tractus cortico-spinal, du cervelet, de l'aqueduc de Sylvius et des ventricules (Fransen et al., 1998). L1 est aussi responsable de pathologies fœtales liées à l'alcoolisme dans le FAS (fœtal alcoholic syndrome) ((Ramanathan et al., 1996), (Tang et al., 2006)). Ces phénotypes sont dus essentiellement à des défauts du tractus cortico-spinal et du corpus callosum ((Mueller, 1999), (Brummendorf et al., 1998), (Wong et al., 1995)), ce qui rend compte du rôle principal de L1 dans le guidage axonal.

Description moléculaire de la protéine

L1 possède environ 1300 acides aminés (200 KDa), dont 114 sont cytoplasmiques (fig. 5).

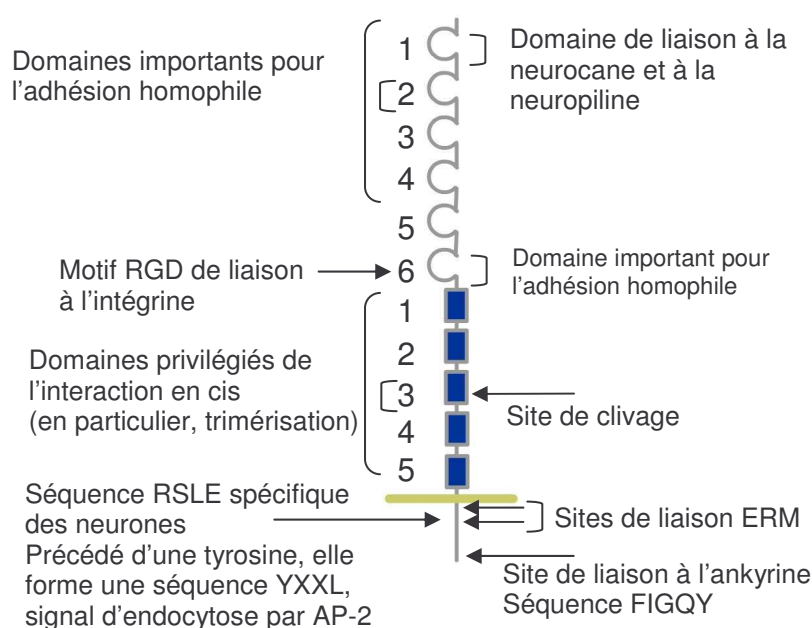


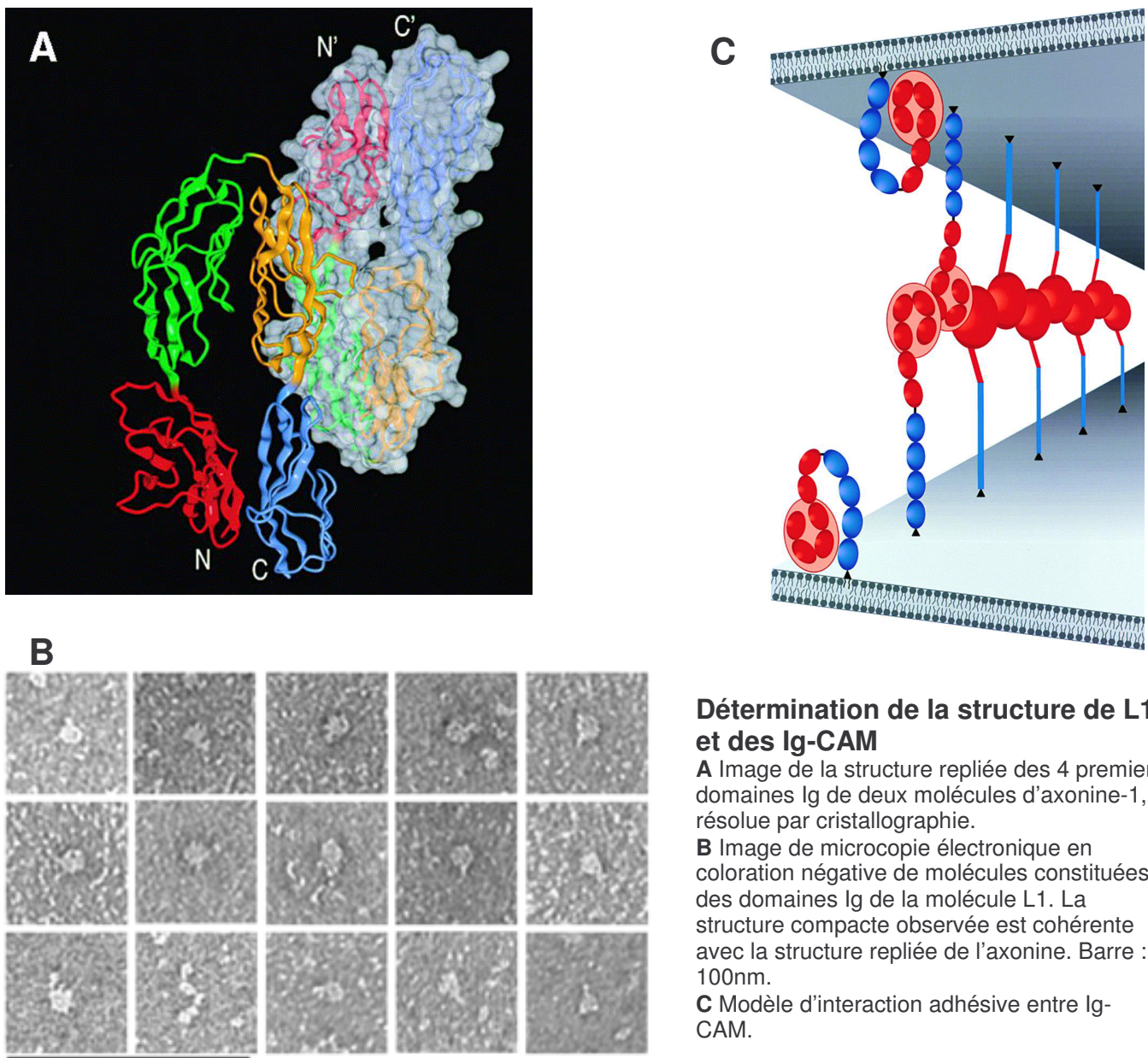
Figure 5

Domaines protéiques identifiés pour la molécule L1

Motifs extracellulaires :

Les motifs permettant l'adhésion homophile sont les domaines Ig, avec des différences selon le type de neurone considéré. Les domaines Ig2 et Ig6 semblent particulièrement impliqués dans l'adhésion et la croissance neuritique dépendante de L1 ((Zhao and Siu, 1995), (Zhao et al., 1998), (Itoh et al., 2004)). La molécule L1 est capable d'interagir avec une molécule identique en *trans*, mais également en *cis*. Une interaction par le 3ème domaine FNIII serait responsable de la trimérisation de la molécule ((Hall et al., 2000), (Silletti et al., 2000)).

En fait, les quatre premiers domaines Ig (Haspel et al., 2000) semblent former une structure qui adopte une conformation repliée (Schurmann et al., 2001) avec une interaction privilégiée entre les domaines 1 et 4 et les domaines 2 et 3 de la molécule ((De Angelis et al., 1999), (Freigang et al., 2000)). Les domaines extracellulaires de deux molécules interagissant en *trans* pourraient alors se superposer (fig. 6).



Détermination de la structure de L1 et des Ig-CAM

A Image de la structure repliée des 4 premiers domaines Ig de deux molécules d'axoine-1, résolue par cristallographie.

B Image de microscopie électronique en coloration négative de molécules constituées des domaines Ig de la molécule L1. La structure compacte observée est cohérente avec la structure repliée de l'axoine. Barre : 100nm.

C Modèle d'interaction adhésive entre Ig-CAM.

Figure 6

Adapté de Freigang *et al.*, 2000, Cell et de Schürmann *et al.*, 2001, Molecular Biology of the Cell

L1 se lie de façon stable en *Cis* avec la neuropiline-1, par le domaine Ig 1, et forme ainsi un complexe récepteur de la sémaphorine Sem3A ((Castellani et al., 2000), cf IIa). L1 porte sur le domaine Ig6 une séquence Arginine-Glycine-Asparagine (RGD) d'interaction avec l'intégrine, impliquée dans l'extension neuritique et la synaptogénèse ((Haspel et al., 2000), (Yip and Siu, 2001)). Les intégrines spécifiques de cette interaction sont $\alpha 1\beta 5$ et $\alpha v\beta 3$.

L1 peut interagir également d'autres Ig-CAM : N-CAM, F11/contactine, Tag-1/Axonin-1 ; ces interactions hétérophiles en *Cis* (Hortsch, 1996) permettent l'intégration du processus adhésif sans partenaire homophile (Hortsch, 2000). L1 interagit également avec des protéoglycanes (neurocane et phosphacane), CD24 (Kleene et al., 2001), des protéines de la matrice extracellulaire (laminine, té nascine), et des tyrosines kinases : le récepteur au FGF et les récepteurs aux éphrines (Zisch and Pasquale, 1997), par exemple EphB2. Enfin, L1 peut former des interactions non spécifiques avec la matrice extracellulaire par ses groupements glycosylés.

Mentionnons également que L1 peut être clivé, avec un site de clivage par PC5a et la plasmine potentiellement au niveau du 3ème domaine FNIII ((Nayeem et al., 1999), (Kalus et al., 2003)), et une sensibilité aux métalloprotéases comme ADAM10 (Mechtersheimer et al., 2001). Ce clivage peut entraîner le disséminement du domaine extracellulaire de L1 (Stoeck et al., 2006). Ces processus auraient un rôle dans la fonction de L1 dans le guidage axonal (Maretzky et al., 2005), mais il reste à savoir dans quelle proportion la protéine est affectée par un tel clivage *in vivo*.

Motifs intracellulaires d'interaction (Crossin and Krushel, 2000) :

La molécule L1, ainsi que les autres Ig-CAM en général, possèdent un domaine RSLE spécifique dans le neurone (qui subit un épissage alternatif dans les cellules non-neuronales) (Takeda et al., 1996) flanqué par une tyrosine phosphorylable, qui permet l'endocytose dépendante de la clathrine via la protéine AP-2 (Kamiguchi et al., 1998). Une sérine, située immédiatement en position carboxyterminale de la séquence YRSLE, phosphorylable par la caséine kinase II (CKII), joue également un rôle dans le contrôle du trafic ((Wong et al., 1996), (Nakata and Kamiguchi, 2007)). L1 possède un domaine FIGQY de liaison à l'ankyrine, protéine de liaison au cytosquelette cortical d'actine/spectrine. Ce domaine d'interaction, très conservé dans la famille des Ig-CAM, est régulé par phosphorylation ((Garver et al., 1997), (Gil et al., 2003)). Par ce domaine, Nr-CAM et la neurofascine, mais pas L1, sont localisés au segment initial avec les canaux sodiques qui se lient eux aussi à l'ankyrine ((Ango et al., 2004), (Boiko et al., 2007)). Il existe également deux sites de liaison ERM (Cheng et al., 2005). L'un, le site RSLE, commun à la liaison à AP2, lie l'ezrine (Dickson et al., 2002), et l'autre est juxtamembranaire. Autre exemple de l'importance des régulations de L1 par phosphorylation cytoplasmique (Schultheis et al., 2006), l'activation du récepteur au FGF est nécessaire aux réponses dépendantes de L1 et N-CAM ((Williams et al., 1994), (Walsh and

Doherty, 1997)). Cette interaction entre protéine d'adhésion et tyrosine kinase a des répercussions sur le guidage axonal (Saffell et al., 1997).

Les autres Ig-CAM

Certaines spécificités des différents membres de la famille des Ig-CAM (Mueller, 1999) peuvent nous éclairer soit par homologie, soit par comparaison, sur le rôle de L1.

L'exemple bien étudié du développement du système rétino-tectal du poulet ((de la Rosa et al., 1990), (Yamagata and Sanes, 1995), (Hortsch, 2000), (Demyanenko and Maness, 2003)) est représentatif à la fois de la spécificité de localisation spatiale et temporelle des différentes protéines adhésives, dont, entre autres, NgCAM/L1, NrCAM, et la neurofascine, et également des rôles divers qu'elles peuvent jouer dans le développement du SNC. Cependant il existe entre ces protéines assez proches une certaine redondance qui explique la complexité des phénotypes des individus dont un des gènes est déficient, et rend difficile l'analyse précise du rôle de chacune.

Deux autres membres de la sous-famille de L1, la neurofascine et Nr-CAM, sont des marqueurs spécifiques du segment proximal de l'axone (Davis et al., 1996), et ils contrôlent l'innervation précise des neurones de Purkinje (Ango et al., 2004). Ces protéines ne possèdent pas de séquence RSLE. En outre, la neurofascine, selon son variant d'épissage, peut réguler la croissance axonale (Koticha et al., 2005). Il existe une affinité hétérophile entre neurofascine et Nr-CAM mais pas entre L1 et Nr-CAM. A titre d'exemple de la spécificité induite par ces protéines, il a été montré chez le poulet ((Perrin et al., 2001), (Benson et al., 2001)) que les interactions hétérophiles entre axonine et Nr-CAM d'une part, et entre contactine et Ng-CAM, contrôlent la spécificité de certaines connexions de la moelle épinière.

N-CAM est structurellement assez différent de L1 (Stallcup and Beasley, 1985b) : il possède un domaine Ig en moins, il est l'objet d'un épissage alternatif extensif, et il porte un groupement glycosylé (PSA ou poly-sialic acid) très volumineux sur son domaine IgG5, qui limite l'interaction homophile de la molécule. N-CAM a un rôle clair dans la maturation synaptique. PSA-NCAM est concentré au niveau de certaines synapses ((Uryu et al., 1999), (Bruses et al., 2002)). Elle favorise la différenciation synaptique et la potentiation à long terme dans l'hippocampe (Dityatev et al., 2004). N-CAM induit une agrégation des vésicules du réseau trans-golgien aux zones de contacts entre neurones (Sytnyk et al., 2002), préfigurant peut-être le recrutement de constituants synaptiques (Sytnyk et al., 2004).

Dans la JNM, la déficience en N-CAM induit une synaptogenèse retardée et une mauvaise maturation (Ziv and Garner, 2004). Sa liaison à FGF-R lui confère un rôle dans la croissance axonale et dans la plasticité synaptique (Cambon et al., 2004). N-CAM est également impliqué dans la fasciculation dans l'hippocampe (Cremer et al., 1997).

SYG-1/SYG-2 (invertébrés) et Sidekick (vertébrés) sont des protéines d'adhésion qui déterminent la spécificité synaptique. SYG-1, qui possède 3 domaines Ig, et SYG-2, qui possède 7 domaines Ig et un domaine FNIII, ont été isolés à partir d'un criblage génétique pour des mutants de *C. elegans* possédant un défaut de localisation des synapses ((Shen and Bargmann, 2003), (Shen et al., 2004)). SYG1-1 interagit avec SYG-2, et sans cette interaction, la formation des synapses ne s'effectue pas correctement. Sidekick, protéine contenant 13 domaines FNIII et 6 domaines Ig, pourrait avoir un rôle similaire au niveau de la rétine du poulet ((Yamagata et al., 2002), (Sakisaka and Takai, 2005)).

DsCAM interagit avec GRIP et la liprine- α en coopération avec le complexe N-cadhérine/caténine. DsCAM possède de nombreux variants d'épissage ((Wojtowicz et al., 2004), (Neves et al., 2004)) et serait également impliqué dans le guidage axonal (Chen et al., 2006). Chez les invertébrés, l'homologue de NCAM, la fasciclineII, joue un rôle important dans la synapse de la JNM (Martin and Kandel, 1996), permettant l'établissement d'un équilibre dépendant de l'AMPc entre fasciculation et plasticité synaptique ((Davis et al., 1996), (Schuster et al., 1996b), (Schuster et al., 1996a)). ApCAM est impliqué dans la maturation de la synapse sensorielle (Yamagata et al., 2003) ; par son internalisation, elle rend possible la plasticité synaptique ((Bailey et al., 1992), (Mayford et al., 1992)).

Ce passage en revue rapide des fonctions de quelques unes des Ig-CAM souligne leur rôle à la fois dans le guidage axonal et l'établissement et la maturation des connexions spécifiques entre neurones.

Rôle de L1 dans la maturation synaptique

Ce travail a pour objectif l'étude de la dynamique des contacts L1-L1 dans le cône de croissance. Il s'agit donc de se concentrer sur des étapes précoces du développement, pour lesquelles L1 joue un rôle dans la progression, la fasciculation et le guidage de l'axone (cf IIb). Cependant, pour dresser un portrait plus complet de la molécule, il faut évoquer également des rôles de L1 et des IgCAM dans des processus plus tardifs du développement, c'est-à-dire la synaptogenèse, qui nous intéresse particulièrement, et la plasticité synaptique.

On peut d'abord associer L1 à une fonction de modulation plastique du SNC en se basant sur sa localisation : chez l'adulte, les membres de la sous-famille L1 se trouvent principalement dans l'hippocampe et le cervelet ((Brummendorf and Rathjen, 1994), (Fransen et al., 1998), (Horinouchi et al., 2005)), structures qui ont la particularité de rester plastiques même après la fin du développement embryonnaire. Cependant L1 ne semble pas localisé à la synapse (Schuster et al., 2001). L1 serait impliqué dans la LTP ((Luthi et al., 1994), (Luthi et al., 1996)), et dans mémoire spatiale (Fransen et al., 1998), bien que son rôle

dans ces processus soit moins clair que celui de NCAM (Bliss et al., 2000).

Il est possible qu'en tant que molécule d'adhésion, L1 intervienne dans la LTP seulement de manière indirecte, par diminution des processus de fasciculation. Par exemple, une activité synaptique soutenue induirait une internalisation de la molécule concourant à la mise en place de la LTP (Itoh et al., 2005). Des articles récents ont montré une présence de L1 dans des synapses immatures ou orphelines, par exemple dans les fibres collatérales de Schaeffer, et la maturation de ces synapses serait permise par le clivage de L1 par la neuropsine (Nakamura et al., 2006). Ce mécanisme serait important pour la plasticité dépendante des récepteurs NMDA (Matsumoto-Miyai et al., 2003).

L1 possède également un rôle dans la mise en place de la synapse inhibitrice de l'interneurone de l'hippocampe (Saghatelian et al., 2004). La protéine permet une localisation sub-cellulaire spécifique des synapses GABA, par sa liaison à l'ankyrine (Huang, 2006).

I.B.3- Les cadhérines

Les cadhérines sont une famille de molécules d'adhésion qui interviennent dans les relations entre cellules essentiellement par leur capacité à établir une interaction homophile. Elles sont définies par la présence d'au moins un domaine d'homologie appelé domaine EC (pour ExtraCellulaire) (Tepass et al., 2000). On dénombre dans cette famille plus d'une centaine de membres organisés en 7 sous-familles ((Kiryushko et al., 2004), (Takeichi, 2006)).

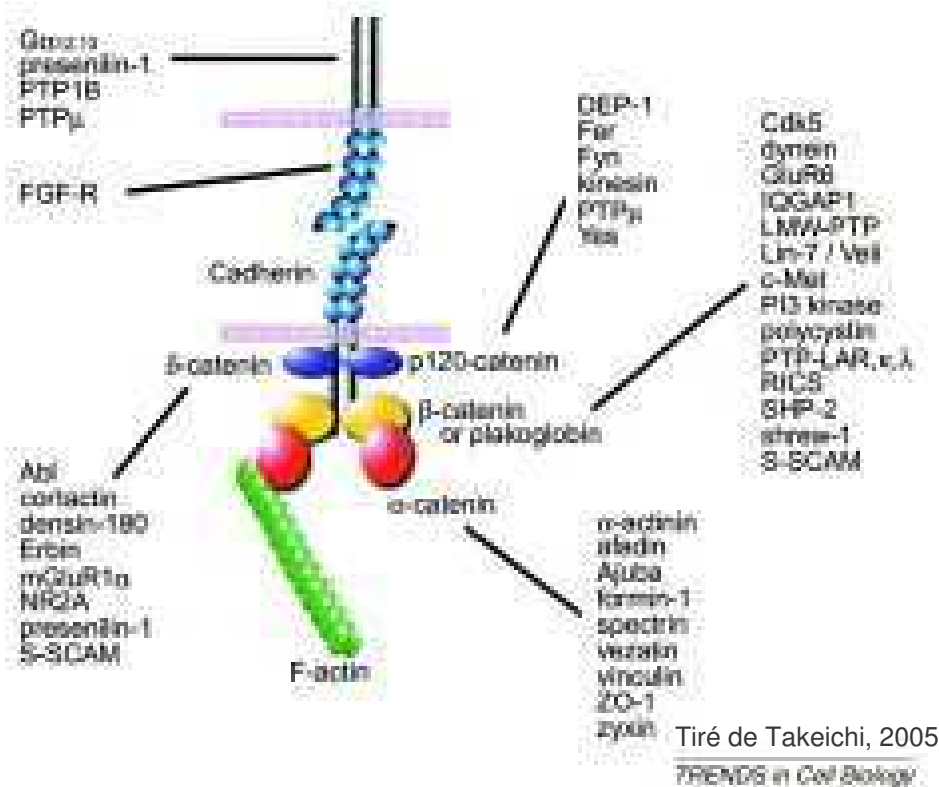
Dès les premières mentions de ces molécules (Hatta and Takeichi, 1986), les cadhérines ont été caractérisées comme des protéines présentes à la surface des cellules de vertébrés permettant une adhésion cellulaire dépendante du calcium. En plus de l'interaction qu'elles peuvent former avec des molécules qui leur font face (en *trans*), les cadhérines sont capables de s'associer en dimère en *cis* et également de s'agréger en une structure adhésive complexe. Elles constituent ainsi les protéines d'adhésion principales associées aux jonctions de la *zonula adherens* riche en actine présente sur les cellules épithéliales (Yap et al., 1997), mais elles prennent également part à des contacts adhésifs diffus.

Description moléculaire des cadhérines classiques

Les cadhérines classiques sont des protéines membranaires d'environ 750 acides aminés, comprenant 5 domaines extracellulaires ou domaines EC d'environ 110 acides aminés chacun, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire bien conservé. Chaque domaine EC est composé de sept brins β organisés en deux feuillets (Overduin et al., 1995).

Le calcium se lie entre les domaines EC, au niveau de séquences conservées, et cette liaison

maintient une structure de la protéine qui est également indispensable à la liaison homophile (Shapiro et al., 1995). Le mécanisme d'adhésion implique que les brins des deux cadhérines qui interagissent s'échangent et s'intercalent (Harrison et al., 2005). Ce mécanisme n'est pas encore tout à fait élucidé, puisque certaines équipes font l'hypothèse d'une interaction des domaines EC 1 (Shapiro et al., 1995), au moins dès les premières étapes de l'adhésion, alors que d'autres privilégient l'interaction de la protéine dans son ensemble (Sivasankar et al., 1999).



Composants élémentaires du complexe cadhérine-caténine

Sont indiquées sur le schéma les protéines connues pour interagir avec chaque molécule du complexe.

Figure 7

L'intégrité du domaine cytoplasmique des cadhérines, et notamment la formation du complexe cadhérine-caténine (fig. 7), est nécessaire au maintien du caractère adhésif de la molécule. Les cadhérines classiques se lient à la β-caténine dans sa partie la plus carboxyterminale, interaction régulable par la phosphorylation d'une tyrosine de la β-caténine (Ozawa, 1998), et à la caténine p120 à proximité du domaine transmembranaire ((Shibamoto et al., 1995), (Wheelock and Johnson, 2003)). La β-caténine lie à son tour l'α-caténine (Hirano et al., 1992), qui s'attache par ailleurs à l'actine (Drees et al., 2005), et cette liaison dynamique au cytosquelette (Lambert et al., 2002) est nécessaire pour renforcer le complexe adhésif (Vasioukhin et al., 2000). Le complexe adhésif cadhérine peut réguler activement la réorganisation du réseau d'actine par la modulation de la cortactine et de Arp2/3, initiateurs de la polymérisation. La protéine p120 joue également un rôle dans l'organisation du réseau d'actine par l'activation des protéines G Rho (Goodwin and Yap, 2004).

Les cadhérines sont des protéines d'adhésion qui ont la particularité de pouvoir former et réguler des interactions fortes entre cellules voisines qui partagent une aire de contact importante. Précisons que les deux types de cadhérines sont définis sur la base d'homologies de séquence au sein de chaque groupe. Grâce à leurs propriétés adhésives, les cadhérines participent à la polarité et à la mobilité cellulaires ((Takeichi, 1991), (Tepass et al., 2000), (Taniguchi et al., 2006)). Par leur diversité et leur expression dans le SNC, les cadhérines ont des fonctions importantes dans plusieurs étapes du développement du système nerveux. A titre d'exemple, il faut mentionner que chaque membre de la sous-famille de type II des cadhérines classiques est exprimé dans une sous-population neuronale, que ces sous-populations forment un réseau synaptiquement interconnecté, et que ces cadhérines sont localisées aux synapses (Suzuki et al., 1997). L'une d'elle, la cadhérine 6B, est liée au recrutement de protéines à domaines PDZ dans certains neurones (Honjo et al., 2000).

Les différentes cadhérines se distinguent par leur domaine EC1 (le plus aminoterminal), qui détermine la spécificité de l'adhésion ((Serafini, 1999), (Klingelhofer et al., 2000)). Parmi ces cadhérines classiques, la N-cadhérine est exprimée dans le tissu neuroépithélial durant le développement (Hatta and Takeichi, 1986). On le retrouve chez l'adulte dans les neurones du SNC, mais aussi dans les muscles, notamment le cœur (Hatta et al., 1987), où son rôle est critique pour la survie de l'organisme (Luo et al., 2001). Son implication dans les étapes précoces du développement rend difficile l'étude de sa fonction dans des phénomènes plus tardifs. Cependant, cette fonction a été confirmée dans plusieurs processus distincts du développement du SNC. La N-cadhérine joue un rôle important dans la croissance axonale par la modulation de l'adhésivité du neurone à son substrat ((Bixby and Zhang, 1990), (Riehl et al., 1996), et article soumis, Bard et al.), et dans la connectivité spécifique du neurone à sa cible ((Inoue and Sanes, 1997), (Masai et al., 2003)). Plusieurs articles soulignent que la N-cadhérine serait également impliquée dans des processus plus tardifs, notamment dans la morphogenèse dendritique ((Togashi et al., 2002), (Tanabe et al., 2006)), mécanisme de la plasticité synaptique (cf IIIb).

Les cadhérines classiques sont impliquées dans des interactions hétérophiles et des processus de signalisation. La N-cadhérine interagit avec les intégrines, LAR-RPTP et le FGF-R ((Cepek et al., 1994), (Kypta et al., 1996), (Williams et al., 1994)). L'adhésion homophile N-cadhérine est également régulée par une adhésion par les nectines. Les nectines interagissent avec l'afadine en intracellulaire, et celle-ci se lie aux α -caténines ((Tachibana et al., 2000), (Beaudoin, 2006), (Togashi et al., 2006)). Enfin, il faut noter que la N-cadhérine régule l'activité transcriptionnelle des caténines, notamment de la β -caténine, en les séquestrant à la membrane (Goodwin and Yap, 2004).

Les autres protéines de la famille des cadhérines (protocadhérines, Celsr, Fat) se distinguent par le nombre de domaine EC, et la nature du domaine intracellulaire. Leurs caractères adhésifs et leur dépendance au calcium ne sont pas encore bien établis. Les Celsr (ou Flamingo chez la drosophile) possèdent sept segments transmembranaires. Ces protéines ont, à l'instar des cadhérines classiques, un rôle dans la croissance neuritique ((Gao et al., 2000), (Shima et al., 2004), (Tissir et al., 2005)) et la spécificité des connexions entre neurones (Lee et al., 2003). Le gène Fat serait également impliqué dans le développement neuronal ((Nakayama et al., 2002), (Ciani et al., 2003)), bien que son rôle reste mal connu.

Les protocadhérines sont une famille de protéines possédant des domaines extracellulaires similaires à ceux des cadhérines mais pas de liaison aux caténines. Cette famille de protéines regroupe une soixantaine de membres répartis en 3 groupes distincts : Pcdh- α , β , γ , (Wu and Maniatis, 1999) et quelques autres gènes dans le génome. Les mécanismes d'épissage et de traduction des protocadhérines génèrent une énorme diversité (Wang et al., 2002). Les variants d'épissage sont de plus exprimés dans des régions spécifiques du cerveau, ou même des neurones particuliers ((Hirano et al., 2002), (Phillips et al., 2003), (Esumi et al., 2005)).

On rencontre des protocadhérines à la synapse (Kohmura et al., 1998) : les CNR (cadherin-related neuronal receptors), qui partagent environ 23% d'homologie avec le domaine extracellulaire des cadhérines. Certains CNR seraient des récepteurs d'une protéine extracellulaire impliquée dans la maturation synaptique, la reeline. Cette interaction activerait la protéine Fyn à fonction tyrosine kinase avec laquelle les CNR interagissent par leur domaine intracellulaire (Senzaki et al., 1999). L'ensemble de ces observations : variabilité, localisation et rôle synaptiques, ont conduit les chercheurs à s'interroger sur une implication plus générale des protocadhérines dans les mécanismes de reconnaissance et de spécificité des connexions synaptiques ((Frank et al., 2005), (Weiner et al., 2005)).

I.B.4- Rôle respectif des différentes molécules d'adhésion – Intérêt du sujet

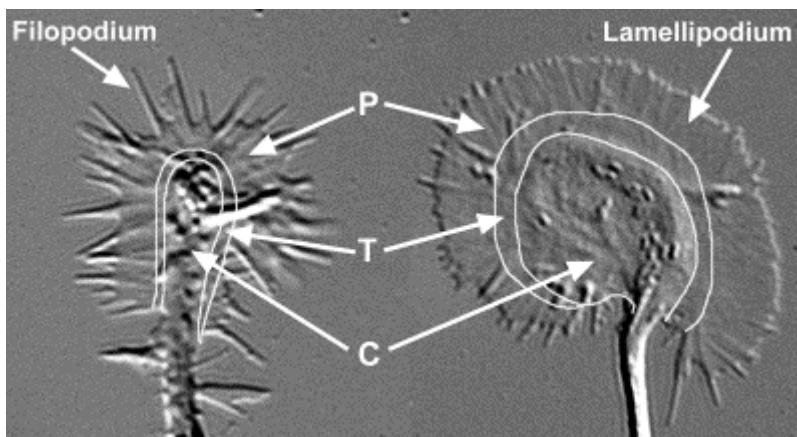
De nombreuses revues récentes ((Yamagata et al., 2003), (Ziv and Garner, 2004), (Washbourne et al., 2004), (Sakisaka and Takai, 2005), (Waites et al., 2005), (Gerrow and El-Husseini, 2006), (Akins and Biederer, 2006)) attribuent aux molécules d'adhésion du SNC un rôle particulier dans la croissance axonale et la synaptogenèse. Depuis longtemps, les biologistes cherchent à comparer la contribution respective des différentes molécules d'adhésion (Doherty and Walsh, 1991), plus particulièrement pour la synaptogenèse, dans le but peut-être d'identifier une molécule clef qui pourrait être responsable de la formation des synapses du SNC ((Biederer et al., 2002) (SynCAM), (Bamji et al., 2003) (cadhérine), (Graf et al., 2004) (neurexine), (Godenschwege et al., 2006) (L1)). L'idée qui en résulte est l'implication différente de ces

molécules diverses dans des types cellulaires différents et à des étapes différentes de ces processus de maturation neuronale. Dans cette étude, je m'attache à mieux comprendre la dynamique des adhésions homophiles L1 dans le cône de croissance, et à discerner un rôle possible de la N-cadhérine dans la synaptogenèse par l'étude des relations entre la N-cadhérine et GluR2, une sous-unité des récepteurs au glutamate de type AMPA.

II- Le cône de croissance et L1-CAM, une Ig-CAM

II.A- Physiologie du cône de croissance du neurone d'hippocampe

II.A.1- Le cône de croissance : une structure fortement motile et extrêmement sensible



Images de cônes de croissance en microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC)

On observe à l'extrémité des axones des cônes de croissance de forme diverses. Deux exemples sont ici présentés, l'un, à gauche, portant de nombreux filopodes, et l'autre présentant un lamellipode. On peut néanmoins définir généralement deux zones dans les cônes : une zone périphérique (P) et une zone centrale (C). Ces deux zones sont séparées par une zone de transition (T)

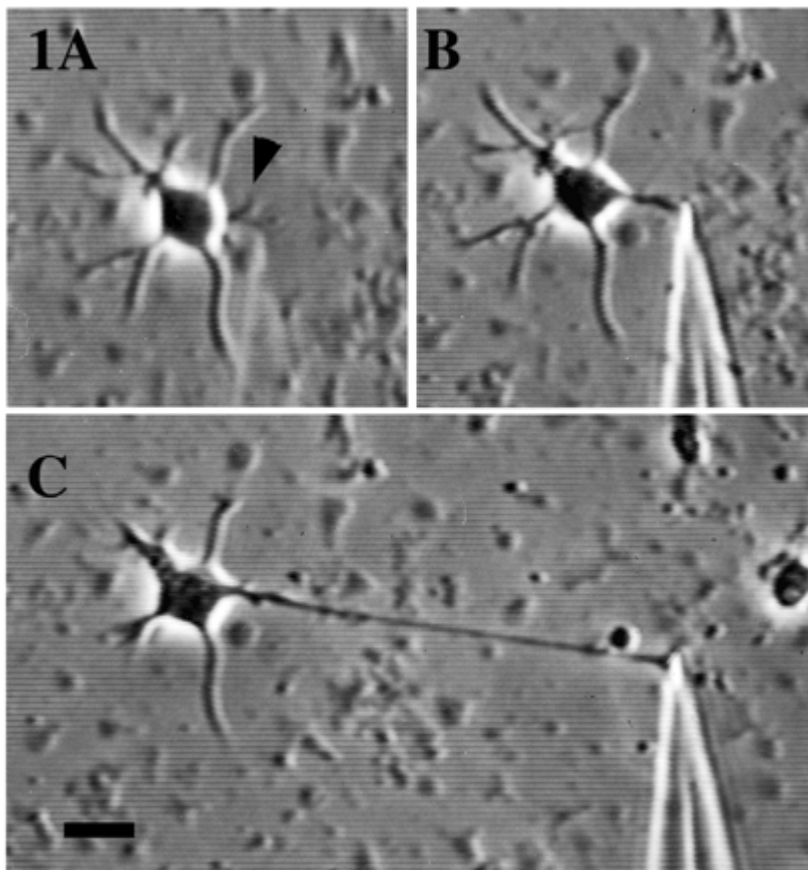
Figure 8

Tiré de Dent, 2003, Neuron

Le cône de croissance est une structure dynamique présente à l'extrémité distale des neurites et en particulier de l'axone (Martinez-Arca et al., 2001), composée d'un domaine central auquel s'accrochent une série des filopodes et de lamellipodes motiles qui forment le domaine périphérique (fig. 8). Ces structures fines projetées en avant de l'axone sont des senseurs remarquables des molécules de l'environnement. Les facteurs auxquels ils sont sensibles sont soit des signaux solubles : pH, concentration en calcium, mais aussi molécules spécifiques (sémaphorines, FGF, ...) ((Mueller, 1999), (Dickson, 2002)), soit des molécules présentes sur une cellule contactée par le cône de croissance, des protéines de la matrice extracellulaire ou des protéines de la membrane, et parmi celles-ci, les protéines d'adhésion. Toutes ces molécules-signal peuvent avoir un rôle soit positif ou attractif, soit négatif ou répulsif, ou bien l'un ou l'autre selon le contexte

(Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

Le cône, qui porte lui-même sur sa membrane des récepteurs pour ces facteurs solubles et des protéines d'adhésion pouvant interagir avec d'autres, est donc un senseur de l'environnement chimique et adhésif dans lequel s'engage l'axone, et sa mobilité lui permet de venir au contact des cellules qu'il approche. Une observation de la croissance neuritique et de la formation des premiers contacts entre neurones d'hippocampe en culture (Cooper and Smith, 1992) met en lumière le rôle principal des filopodes et des lamellipodes dans l'établissement des contacts entre neurones. Le cône de croissance est aussi un senseur mécanique (stéréotropisme) (Bray, 1979). Si on exerce sur lui une contrainte de traction, on provoque la différenciation du neurite en axone ((Dennerll et al., 1989), (Heidemann et al., 1990), (Lamoureux et al., 2002), fig. 9). Là encore, des protéines d'adhésion pourraient être en jeu, comme la N-cadhérine, à travers son interaction avec l'actine (Geiger et al., 2001). De même, si l'on retient l'extrémité du cône de croissance avec un micromanipulateur une bille recouverte de N-cadhérine, on voit une accumulation temporaire d'actine au site de contact (expérience préliminaire, effectuée au sein de l'équipe). Ces données témoignent que le cône est sensible aux forces mécaniques.



Elongation d'un neurite secondaire par l'application d'une tension mécanique

A Neurone avant l'expérimentation. La flèche signale le neurite auquel l'aiguille sera attachée.

B Le même neurone après 30 min, au début de la traction par l'aiguille.

C Le même neurone après 6h, à la fin de l'expérience de traction.

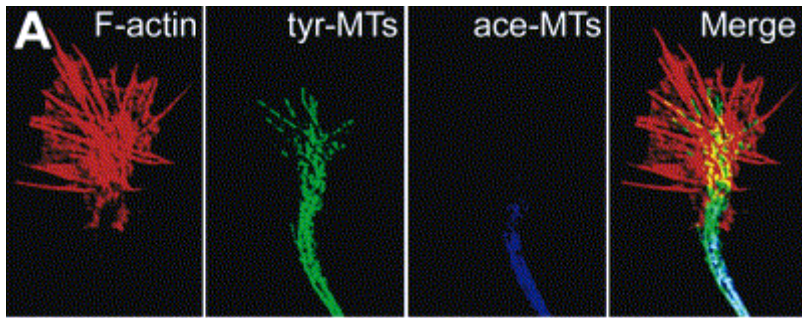
Barre : 20 μ m.

Tiré de Lamoureux, 2002
Journal of Cell Biology

Figure 9

En réponse à ces informations, c'est toute l'organisation du cône qui est mobilisée. L'extension axonale et la réorientation du cône sont des mécanismes complexes faisant intervenir de façon coordonnée le cytosquelette, le trafic membranaire et les systèmes adhésifs.

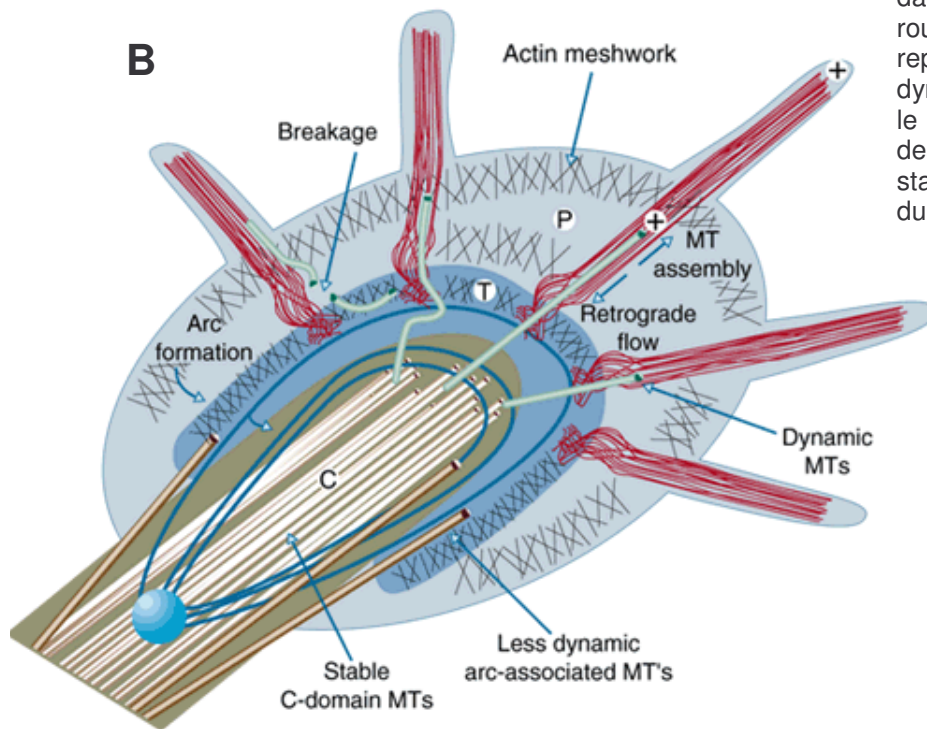
Le cône de croissance est une structure riche en actine (fig. 10). Celle-ci se polymérise à la périphérie



Organisation du cytosquelette dans le cône de croissance

A Cône de croissance de neurone d'hippocampe marqué à la phalloïdine (F-actin) et avec des anticorps spécifiques des microtubules tyrosinés (tyr-MTs) et des microtubules acétylés (ace-MTs).

B Modèle de l'organisation du cytosquelette dans le cône de croissance. Les faisceaux de F-actine dans les filopodes sont représentés en rouge, et le réseau cortical d'actine est représenté en noir. Des microtubules dynamiques (en vert) polymérisant dans le domaine périphérique coexistent avec des faisceaux de microtubules, plus stables, situés dans le domaine central du cône de croissance.



Adapté de Dent, 2003, *Neuron*
et de Rodriguez *et al.*, 2003
Nature Cell Biology

Figure 10

du cône de croissance, et se dépolymérise à sa base : il y a donc un flux permanent d'actine polymérisée vers la base du cône (Bray and Chapman, 1985) dont le moteur est la myosine ((Lin et al., 1996), (Dent and Gertler, 2003), (Gallo, 2006)), en particulier la myosine II ((Brown and Bridgman, 2003), fig. 11). La progression du cône de croissance est rendue possible par l'insertion préférentielle des composants de la membrane au niveau du cône (Kamiguchi, 2003) et le mécanisme de progression autonome de l'actine : « actin thermal ratchet » (Mitchison and Cramer, 1996), qui contribue de façon non négligeable au flux d'actine (Medeiros et al., 2006). Dans les conditions classiques de progression du cône de croissance en culture (sans facteur attracteur ni répulsif), la locomotion du cône est assurée par le couplage du flux rétrograde du cytosquelette d'actine à un support fixe, la lamelle, par des protéines transmembranaires qui interagissent à la fois avec l'extérieur et avec l'actine, directement ou non (Suter and Forscher, 2000). C'est le cas des protéines de la famille de L1 qui interagissent avec l'actine par une liaison à l'ankyrine (Hortsch, 2000) ou à l'eitrine (Dickson et al., 2002).

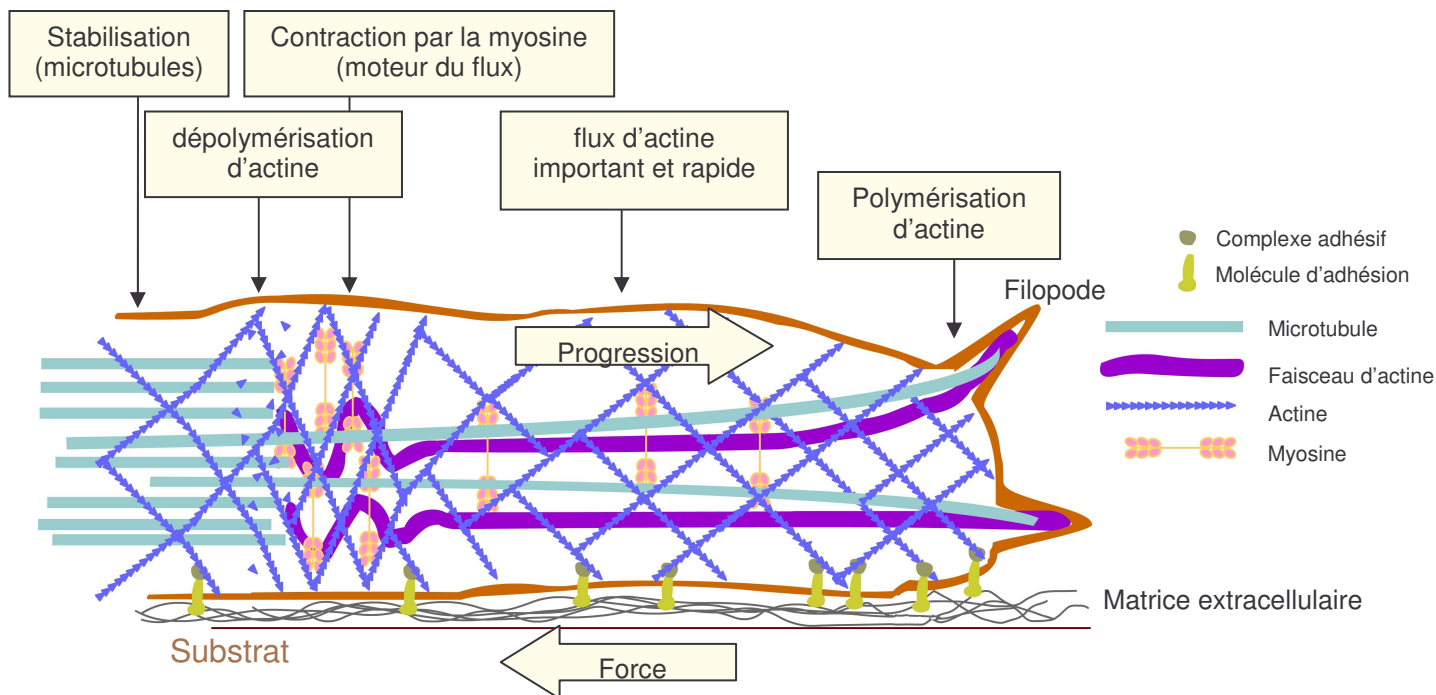


Figure 11 **Modèle de l'établissement du flux rétrograde d'actine dans le cône de croissance et la génération de forces sur le substrat**

Le flux rétrograde d'actine, en liaison avec les protéines d'adhésion, est considéré comme le moteur classique de la motilité cellulaire : les protéines d'adhésion lient le flux d'actine à des ligands extracellulaires immobilisés (Hu et al., 2007). Elles transmettent donc la force de l'actine au substrat qui exerce alors une force équivalente sur le neurite, ce qui permet sa progression. Dans le cône (Lin and Forscher, 1995), les protéines d'adhésion peuvent ainsi réguler le guidage et la progression de l'axone.

Les études menées notamment dans l'équipe de Paul Forscher sur ApCAM, homologue de N-CAM chez l'aplysie, éclairent les relations entre adhésion et flux rétrograde d'actine ((Suter and Forscher, 1998), (Suter and Forscher, 2000), fig. 12). Les auteurs utilisent un micromanipulateur pour maintenir des billes recouvertes d'ApCAM ou d'anti-ApCAM immobiles à la périphérie de cônes de croissance de neurones d'aplysie. L'adhésion des billes entraîne une augmentation de l'extension du cône vers le site de contact, et une accumulation d'actine. Une petite bille témoin placée entre la bille mécaniquement restreinte et le domaine central du cône de croissance ne montre plus de mouvement rétrograde : l'adhésion entraîne une diminution du flux d'actine dans l'axe du contact. Enfin, l'observation de l'interaction de cônes de croissance (Lin and Forscher, 1995) ou du mouvement des billes témoins montre que la vitesse de progression du cône est inversement corrélée à la vitesse du flux rétrograde d'actine. Il faut noter que l'effet de l'adhésion sur le flux d'actine n'intervient qu'après un temps de latence, correspondant à un couplage mécanique plus fort entre contact adhésif et cytosquelette.

Si le cône rencontre un signal attractif ou répulsif, il va réorienter la direction de croissance de l'axone, processus potentiellement très rapide ((Guthrie and Lumsden, 1992), (Chilton, 2006)). Cette réorientation s'effectue grâce notamment à un signal calcique, activant plusieurs voies de signalisation (par exemple par la calmoduline et l'AMP cyclique), et résultant principalement en une réorganisation du

cytosquelette ((Guan and Rao, 2003), (Gomez and Zheng, 2006)). Les mécanismes de réorientation sont permis par des modifications du trafic membranaire (Tojima et al., 2007), et des changements dans la dynamique de l'actine et des microtubules ((Tanaka and Sabry, 1995), (Song and Poo, 2001)) dans le cône, processus dont il semble que les protéines G Rho soient le chef d'orchestre ((Rodriguez et al., 2003), (Gallo and Letourneau, 2004)). Notons que l'extrémité distale des microtubules est un lieu privilégié de la polymérisation d'actine (Grabham et al., 2003).

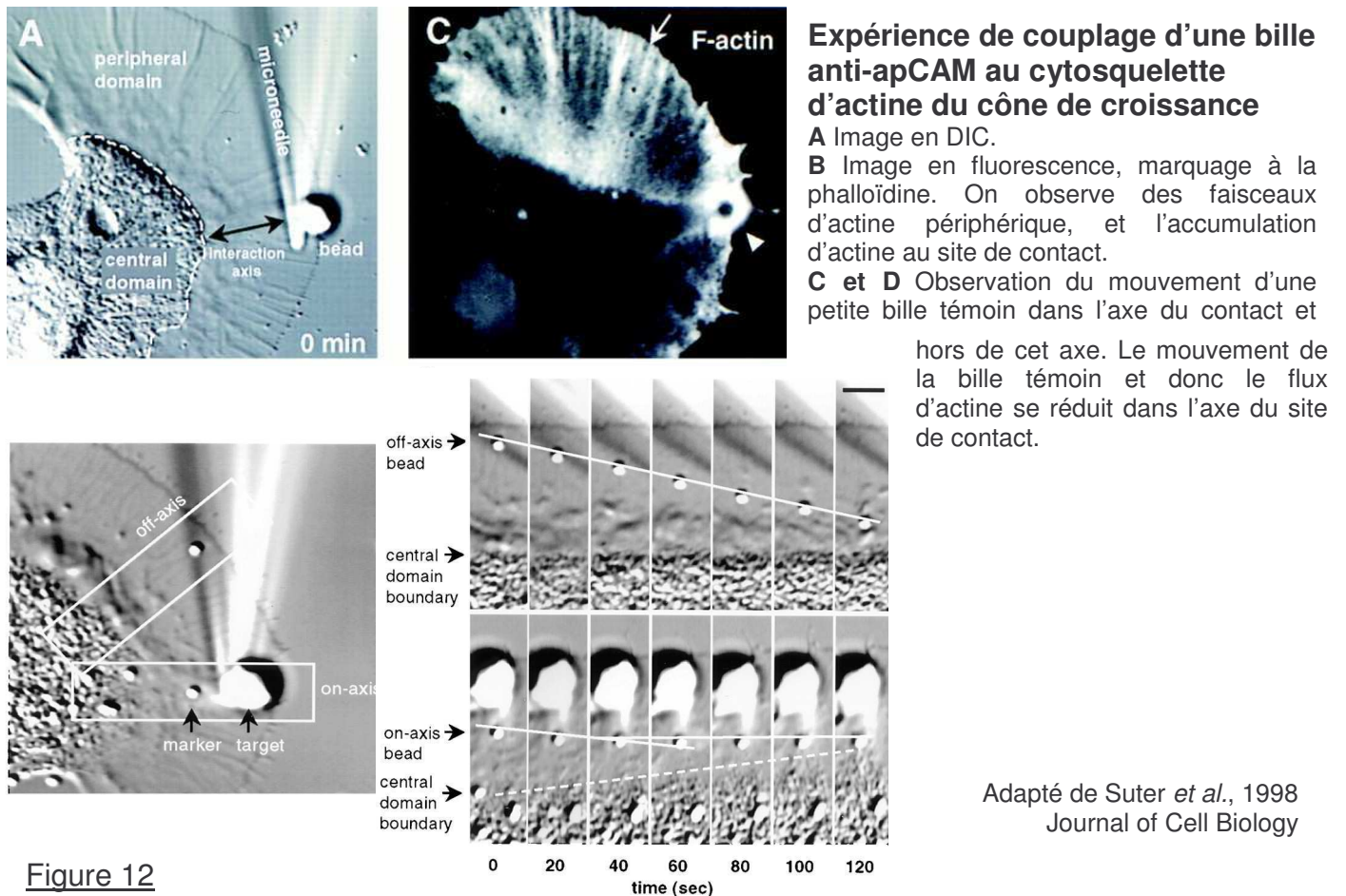


Figure 12

Structure mécanosensible, le cône réagit fortement à un contact avec un substrat spécifique ou une cellule. Des expériences de croissance du cône sur différents substrats (Gomez et al., 2001) montrent qu'il existe des signaux calciques locaux et périodiques dans les filopodes qui peuvent induire la réorientation du cône. Ces signaux seraient dus à l'ouverture de canaux calciques mécanosensibles, entre autres par des protéines d'adhésion (intégrine). Lors d'un contact avec un autre neurone (Lin and Forscher, 1993), le cône se réoriente également, notamment dans l'axe du neurite rencontré, sa taille diminue par l'effondrement des structures motiles, et sa vitesse de progression augmente fortement (Cooper and Smith, 1992). Cette réorientation, et l'élongation axonale induite par application d'une force mécanique, sont étroitement liées à la réorganisation et à la polymérisation des microtubules vers le site de traction ((Zheng et al., 1993), (Suter and Forscher, 1998)).

On voit ici que le cône de croissance ne répond pas seulement en changeant de direction. L'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation de l'actine peut être régulé, et provoquer la décélération ou

l'accélération, l'extension ou l'effondrement du cône. Il faut aussi évoquer le fait que le cône est capable de synthétiser des protéines localement (à partir du signal calcique) ((Campbell and Holt, 2001), (Brunet et al., 2005)), et ceci pourrait permettre de réguler sa sensibilité aux facteurs extérieurs (Piper et al., 2005).

Le cône n'est pas un simple récepteur passif : il peut exprimer ses propres molécules de signalisation, parmi lesquelles ses propres protéines d'adhésion (Chilton, 2006). Il peut par exemple être acteur de la défasciculation, en émettant lui-même des signaux chimiorépulsifs, ou bien permettre au contraire que d'autres axones le suivent (Van Vactor, 1998).

II.A.2- Cône de croissance et spécificité de la cible

Dès 1963, Sperry avait émit l'hypothèse du rôle du chimiotropisme dans le guidage de l'axone ((Sperry, 1963), (Chilton, 2006)). La connexion d'un axone donné à sa cible est rendue possible par l'existence d'un ou plusieurs couples signal/récepteur spécifiques qui peuvent être organisés en gradients. Le cône de croissance exprime en effet des récepteurs sensibles aux molécules de son environnement, et parmi elles, les molécules d'adhésion, à la fois signaux et récepteurs.

Signaux	Récepteurs
FGF	FGF-R
éphrines A,B	EphA, EphB
Nétrine	DCC, NGL
Matrices (MEC)	Intégrines
Sémaphorine	Neuropiline, Plexine
Wnt	Frizzled, Ryk
GABA	GABA-R
IGF	IGF-R

Sur le tableau ci-contre sont présentés quelques couples signal/récepteurs.

Certaines de ces molécules activent ou inhibent la croissance du cône (fascicline et NCAM), d'autres peuvent induire un virage du cône en l'attirant ou en le repoussant (éphrines, semaphorines, nétrines, robo/slits), ces deux processus étant distincts (pour l'intégrine, (Lilienbaum et al., 1995)). Parmi ces molécules, on rencontre également des morphogènes du développement, des facteurs de transcription et des récepteurs aux neurotransmetteurs (Chilton, 2006).

Toute la diversité des molécules de reconnaissance (déjà évoquée dans le cadre des protéines d'adhésion, mais qui est plus générale), permise par des mécanismes d'épissage alternatif et de modifications post-traductionnelles, peut entrer en jeu pour assurer une bonne connectivité, de sorte que le système, malgré sa complexité, possède une certaine capacité à corriger des erreurs (Harris, 1986).

Le degré de spécificité des contacts est étonnant : les neurones GABAergiques et les neurones glutamatergiques contactent chacun une région des neurones pyramidaux de façon très précise : les premiers réalisent des synapses préférentiellement sur le corps cellulaire et l'axone (avant le segment initial), alors que les seconds les font sur des régions plus éloignées des dendrites, et au niveau d'épines ((Somogyi et al., 1985), (Benson and Cohen, 1996)). Toujours dans l'hippocampe, la croissance axonale et la spécificité des contacts pourrait être guidée par la détermination cellulaire précoce et la ségrégation spatiale en couches distinctes des neurones de Cajal-Retzius et des neurones GABAergiques (Super et al., 1998).

Quel est le rôle des protéines d'adhésion dans le processus du guidage axonal ? Ce sont d'abord des acteurs de la spécificité. A titre d'exemple représentatif, citons la molécule Sidekick qui code pour une spécificité de contact importante (Yamagata et al., 2002). Les molécules d'adhésion peuvent intervenir soit par leur caractère adhésif, soit de façon indépendante, par exemple en tant que récepteurs ou co-récepteur de molécules/signal solubles ou de la matrice (NGL2 et DCC pour la nétrine, L1 pour la sémaphorine) (Mueller, 1999). Elles peuvent être impliquées soit dans la modulation de la croissance de l'axone (stimulation ou inhibition), leur capacité stimulatrice dépendant essentiellement des liaisons homophiles qu'elles établissent (Lemmon et al., 1992), soit dans le guidage au sens strict (attraction ou répulsion). Elles ont un rôle particulier dans la réponse aux facteurs de croissance, notamment au FGF ((Williams et al., 1994), (Kiryushko et al., 2004)).

Si le rôle des protéines d'adhésion dans la modulation de l'adhésivité du cône est primordiale (Zheng et al., 1994), il ne se limite pas à cela. Leur aptitude à interagir avec les composants du cytosquelette, notamment à l'actine, en fait des candidats privilégiés pour moduler l'extension axonale et permettre un couplage mécanique entre le substrat et le cytosquelette ((Suter and Forscher, 1998), (Suter and Forscher, 2000)). Par leurs domaines cytoplasmiques, elles activent des voies de signalisation intracellulaires ((Meiri et al., 1998), (Doherty et al., 2000), (Jessen et al., 2001), (Kiryushko et al., 2004)), pouvant même intégrer les informations de contrainte mécanique du cône de croissance (Suter and Forscher, 2001).

Le guidage axonal, dont nous avons ici évoqué les mécanismes, permet d'établir le plan global d'organisation de la connectivité du système nerveux. Ce processus est majoritairement indépendant de la libération de neurotransmetteur (Verhage et al., 2000), mais il semble nécessiter une activité de dépolarisation spontanée ((Goulding, 2004), (Hanson and Landmesser, 2004)). Pour finaliser la connexion entre le neurone et sa « cible », un processus différent est en jeu, la synaptogenèse, pour laquelle l'activité électrique des neurones joue un rôle important, notamment dans les phases tardives (Waites et al., 2005). Certains mécanismes de reconnaissance peuvent cependant être communs à ces deux processus, par exemple les mécanismes qui impliquent le contact (reconnaissance adhésive).

Cette thèse n'a pas l'ambition d'étudier ou d'expliquer les mécanismes permettant cette spécificité de connexion, puisqu'on a utilisé des neurones d'hippocampe en culture, que l'on considère indistinctement de leur type. Cependant, il serait intéressant d'affiner l'étude des protéines d'adhésion en vue d'identifier leur rôle dans la mise en place de la structure de l'hippocampe.

II.A.3- Cône de croissance et recyclage

Mécanismes du recyclage

On observe dans le cône de croissance une grande diversité d'organelles ((Birks et al., 1972), (Bunge, 1977)), parmi lesquelles un compartiment intracellulaire de taille importante ((Cheng and Reese, 1987), (Dailey and Bridgman, 1993)), constituant de larges structures (vacuoles, organelles de plus de 150nm de diamètre), comparables à des endosomes précoces, c'est-à-dire des compartiments qui ne sont pas acidifiés (Overly and Hollenbeck, 1996). Situées principalement dans le domaine central du cône de croissance, ces vacuoles, issues au moins pour une part du recyclage, sont très dynamiques : elles sont mobiles et leur taille varie, entre autres par fusion. Elles sont assez stables (temps de vie de l'ordre de 10 à 15 min.), notamment au niveau du domaine central. Les vacuoles constituant ce compartiment apparaissent dans le domaine central et périphérique du cône (dans ce dernier cas, dans des zones en rétraction), elles ne semblent pas montrer de mouvement antérograde, mais leur disparition est souvent corrélée à une perte de volume, bien qu'aucun bourgeonnement de vésicule n'ait été observé ((Dailey and Bridgman, 1993), fig. 13). Elles pourraient correspondre à des structures intermédiaires du transport décrites plus récemment dans des cellules hétérologues ((Toomre et al., 1999), (Polishchuk et al., 2003)).

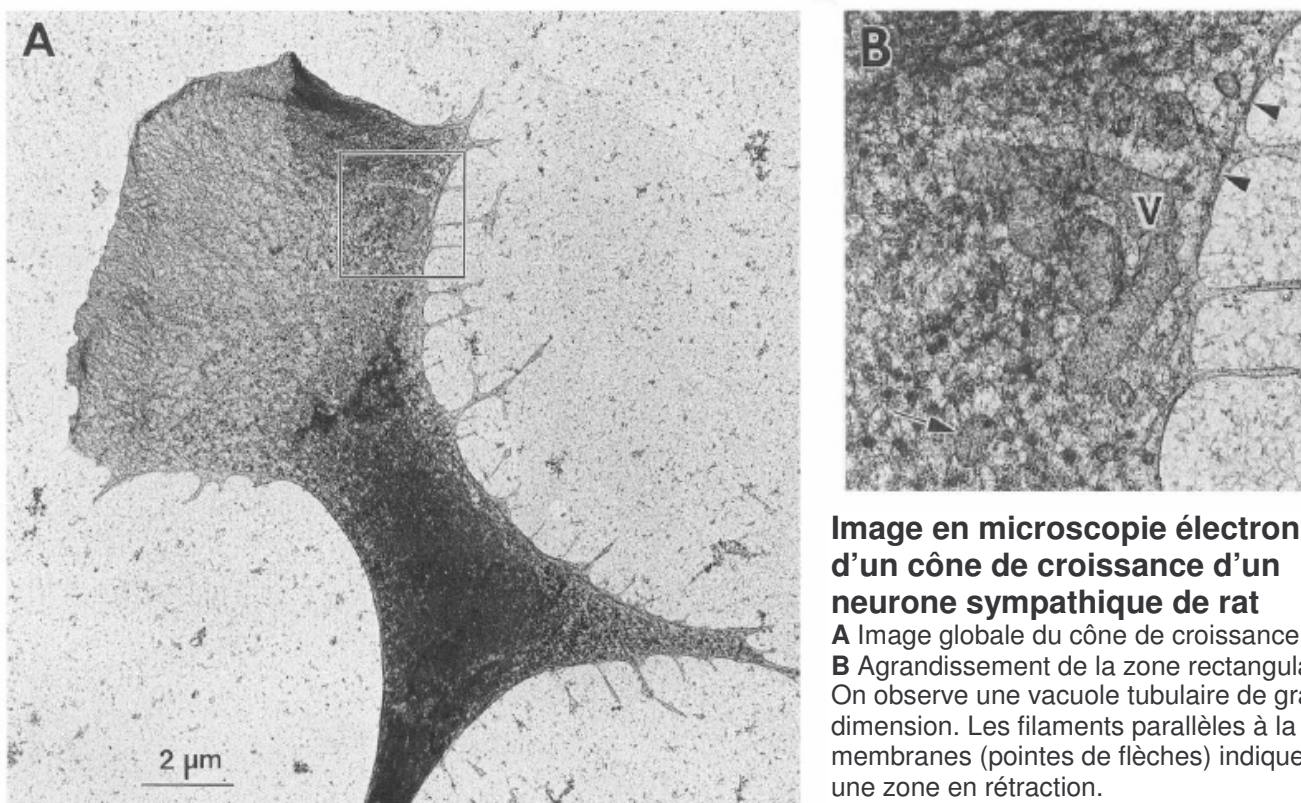


Figure 13

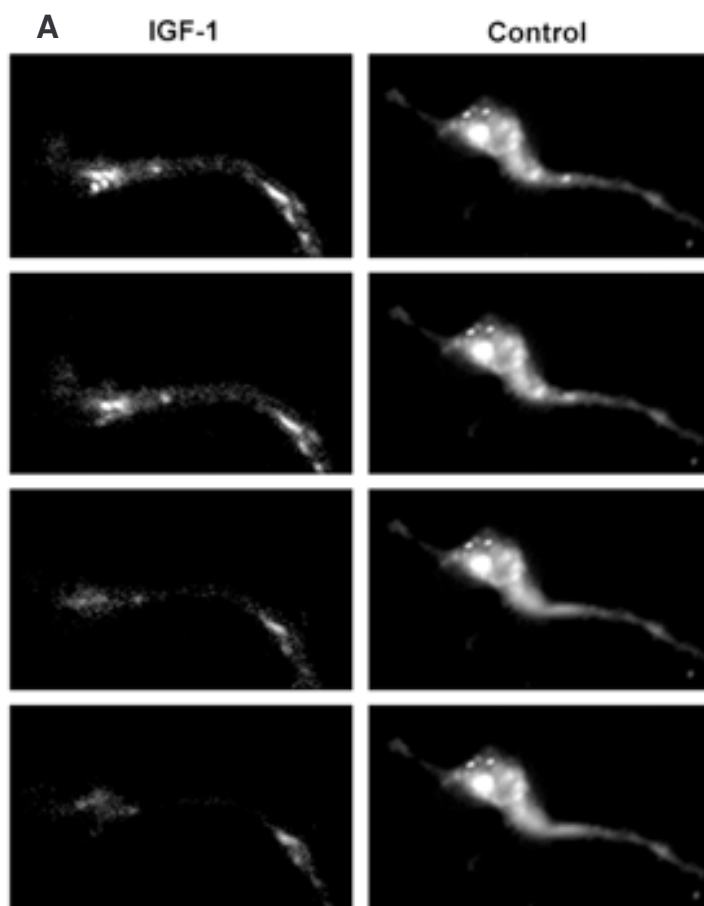
Tiré de Dailey *et al.*, 1993, Journal of Neuroscience

Les phénomènes d'endocytose ont lieu partout dans le cône, à la périphérie comme dans le domaine central, en présence ou en absence de dépolarisation. L'endocytose provoquée par l'activité préfigure le recyclage des vésicules synaptiques (Diefenbach et al., 1999). C'est l'endocytose constitutive, non induite

par la dépolarisation, qui nous intéresse.

Cette endocytose semble s'effectuer par des puits recouverts de clathrine. Elle met en jeu le complexe adaptateur AP-2 (Gallusser and Kirchhausen, 1993). Une de ses sous-unités, $\mu 2$, interagit avec des domaines tyrosine et permet le regroupement des molécules portant le signal d'internalisation dans les puits de clathrine. La dynamine, une GTPase, intervient dans la fission des vésicules de clathrine en enserrant le cou de la vésicule (Roux et al., 2006). Cependant, d'autres mécanismes d'endocytose indépendants de la clathrine peuvent également intervenir : par exemple, les cavéoles, la pinocytose, la macropinocytose ((Hughes, 1953), (Nakai, 1956), (Dailey and Bridgman, 1993)).

Le rôle du trafic cellulaire est primordial dans le cône de croissance, puisque l'ajout de membrane est indispensable à la croissance du cône, ce qui nécessite un flux global antérograde de compartiments intracellulaires ((Futerman and Banker, 1996), (Kamiguchi, 2003)). On observe en effet un compartiment d'exocytose spécialisé : PPV (plasmalemma precursor vesicles), qui viendrait de l'appareil de Golgi, par le réseau trans-golgien (Tang, 2001), ou/et des compartiments de recyclage ((Pfenninger and Friedman, 1993), (Hirling et al., 2000), fig. 14).



Marquage au BODIPY de neurones d'hippocampe

(30 min. puis rinçage et 3h d'incubation)

A Image en fluorescence de vésicules marquées dans le cône de croissance. Ces vésicules disparaissent après application d'un facteur de croissance (IGF).

B Image en fluorescence de régions montrant un forte concentration en BODIPY (rouge), qui marque les vésicules, et une faible concentration (vert), qui marque la membrane du cône. Les vésicules observées sont des précurseurs de membrane.

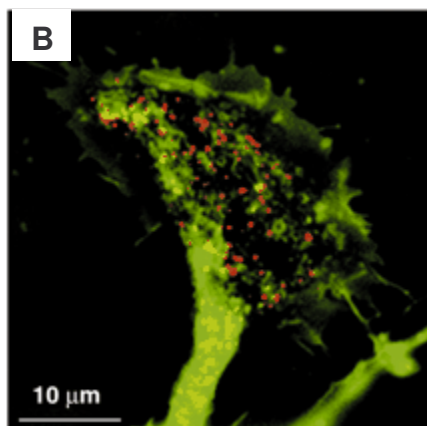


Figure 14

Adapté de Pfenninger *et al.*, 2003
Journal of Cell Science

L'exocytose des PPV serait contrôlée par les signaux extracellulaires comme l'IGF (insulin-like growth factor-1) ou NGF (nerve growth factor), selon des voies de signalisation particulières (IRS, MAPK)

((Laurino et al., 2005), (Tang, 2001)). Le lieu d'exocytose de ces vésicules pourrait être déterminé par un complexe permettant leur liaison à des sites particuliers de la membrane : le complexe exocyste ((Vega and Hsu, 2001), (Murthy et al., 2003)), au niveau du cône de croissance (Craig et al., 1995). En outre, il existe un lien étroit entre tension de membrane et trafic membranaire ((Sheetz and Dai, 1996), (Bray, 1984)) : la diminution de la tension de membrane favorise l'endocytose, et une augmentation de la tension favorise l'exocytose. On sait d'autre part que plusieurs processus, parmi lesquels l'adhésion, engendrent des contraintes mécaniques et modifient ainsi la tension membranaire. Ces processus pourraient induire des modifications du trafic membranaire et de la localisation des sites d'exo-endocytose.

L'exocytose nécessaire à la croissance axonale met en jeu des protéines SNARE distinctes de celles engagées dans le recyclage des neurotransmetteurs, de sorte que les mécanismes qui sous-tendent la croissance axonale sont insensibles à la toxine tétanique (Ahnert-Hilger et al., 1996). Ce point sera plus extensivement développé dans le chapitre suivant.

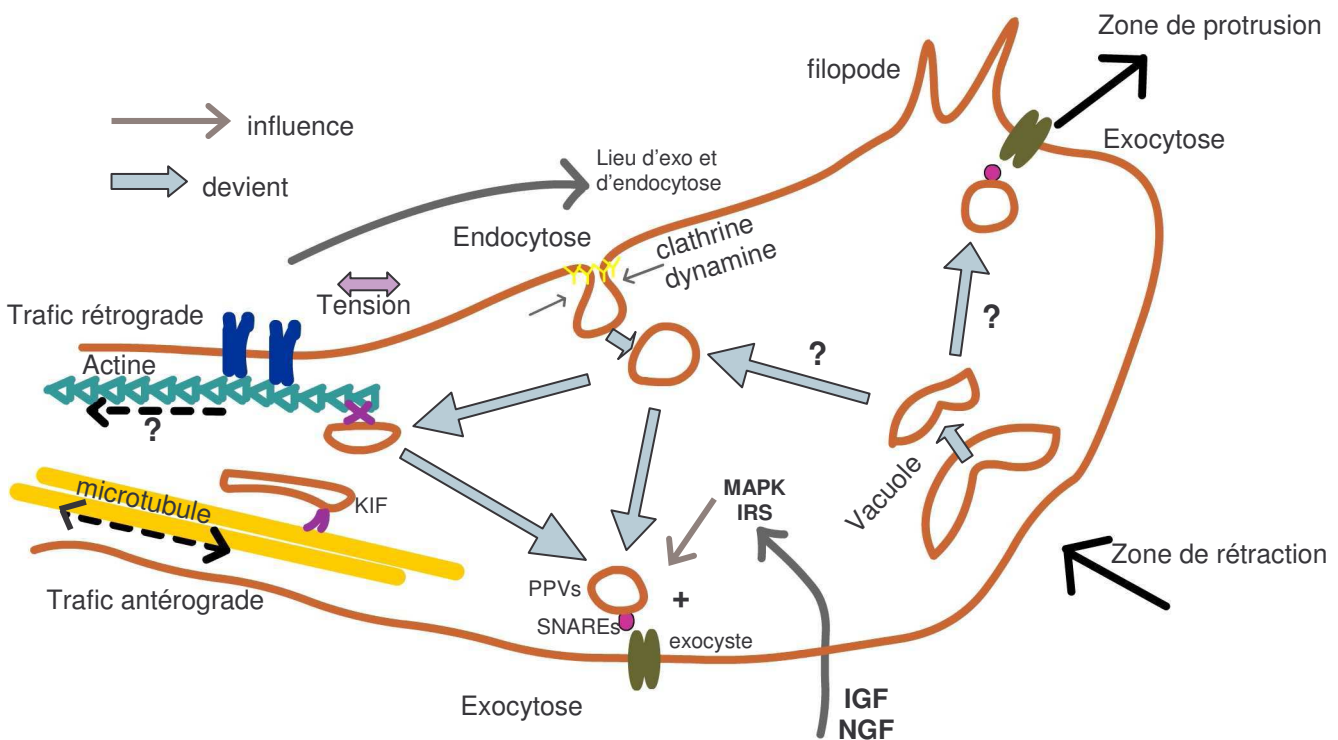
Les relations entre ces différents compartiments (endocytose, vacuoles, PPV) ne sont pas encore bien comprises. Les mouvements qui animent ces compartiments et les relations qu'ils peuvent avoir entre eux mettent en jeu les protéines du cytosquelette, qui sont donc également des régulateurs potentiels de ce trafic.

Plusieurs études soulignent l'importance dans ces mécanismes des moteurs moléculaires. Les KIF (kinesin superfamily proteins), associées aux microtubules, et notamment deux moteurs antérogrades rencontrés dans les neurones : KIF3A/B (Kondo et al., 1994), et KIF2 (Noda et al., 1995), sont nécessaires à la croissance axonale (Hirokawa and Takemura, 2005). Ils pourraient être les acteurs d'un mouvement antérograde de vésicules tubulaires issues du réticulum endoplasmique ou bien des tubes de membrane (Polishchuk et al., 2003), qui seraient conduits, selon des images de microscopie électronique ((Dailey and Bridgman, 1991), (Stephens and Pepperkok, 2001)) par des microtubules vers la périphérie du cône de croissance. Les protéines de l'exocyste entretiennent elles aussi des relations particulières avec les microtubules (Vega and Hsu, 2001).

Il existe une relation directe entre le flux rétrograde d'actine et la croissance axonale (Lin et al., 1996). Couplé à un flux antérograde par les microtubules (Martenson et al., 1993), le flux rétrograde d'actine pourrait permettre de rediriger vers le corps cellulaire des constituants apportés en excès (Hollenbeck and Bray, 1987). Ce mécanisme putatif rendrait possible une régulation à court terme de la croissance de l'axone, avec une modulation rapide de l'insertion des constituants au cône de croissance sans nécessiter d'augmentation de synthèse protéique à court terme (Futerman and Banker, 1996). De plus, il faut rappeler que le flux rétrograde d'actine permet le couplage mécanique du cône à ses substrats que ce soit le support de culture, une bille, ou un autre neurone.

Remarquons cependant qu'il reste difficile de dresser un modèle général du trafic vésiculaire dans le cône de croissance (fig. 15). Cette difficulté est due à la diversité des neurones et des mécanismes de

transport vésiculaire et de recyclage selon le type de neurone (chez les mammifères, neurones de l'hippocampe ou neurones de la racine du ganglion dorsal, par exemple), selon le substrat sur lequel il évolue (Burden-Gulley et al., 1995) et l'organisme dont il est issu (souris, poulet, xénope), ainsi qu'à la difficulté persistante à résoudre la dynamique des structures fines. Il existe un intervalle difficile à combler entre la microscopie électronique, très résolutive mais analysant seulement des structures fixées, et microscopie optique, dont la résolution est limitée à la longueur d'onde de la lumière visible. Cependant, des techniques plus récentes : la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), mais surtout, la microscopie de fluorescence à onde évanescente (TIRF ou Total Internal Reflection Fluorescence) et la microscopie de fluorescence de speckle (FSM) ((Waterman-Storer et al., 1998), (Hu et al., 2007)) doivent permettre d'étudier le trafic membranaire dans le cône de croissance de façon plus précise.



Modèle du trafic membranaire dans le cône de croissance

Le cône de croissance est un lieu privilégié d'endocytose et d'exocytose. Si de nombreux articles nous renseignent sur des aspects particuliers du trafic membranaire au cône de croissance, il reste difficile d'établir un modèle global et notamment de relier les différents éléments de ce trafic.

Figure 15

Rôle du trafic membranaire au cône de croissance

Il permet l'ajout de membrane nécessaire à la croissance du cône et à l'accroissement subséquent de sa surface. Même si la synthèse lipidique est possible dans le cône de croissance, elle ne concerne pas tous les types de lipides, et pas non plus les protéines membranaires, puisque le cône ne possède pas de réticulum rugueux (Futerman and Banker, 1996). Les sphingolipides, par exemple, doivent être importés (Harel and Futerman, 1993).

Le trafic au cône permet également le renouvellement et la redistribution rapide des composants

membranaires. C'est le cas par exemple lorsqu'un filopode s'effondre sur le domaine central (Dailey and Bridgman, 1993). La membrane qui l'entourait doit pouvoir être exportée de nouveau à la périphérie du cône.

Pour répondre rapidement aux changements du milieu, il est nécessaire de renouveler les récepteurs membranaires, notamment les protéines d'adhésion, par un recyclage rapide ((Piper et al., 2005), (Bartoe et al., 2006)). Le recyclage des protéines d'adhésion, et leur exocytose préférentielle au cône de croissance et à sa périphérie, permettent aussi de maintenir une concentration membranaire locale de cette protéine d'adhésion, concentration nécessaire à la formation préférentielle des contacts au niveau des filopodes et à la progression en avant du cône.

Enfin l'existence d'une endocytose dans le cône permet également l'internalisation de facteurs de croissance, processus important pour la croissance du cône ((Misko et al., 1987), (Tani et al., 2005)).

L'export et l'exocytose dirigée au cône de croissance composent un mécanisme de la polarisation du neurone et du tri des protéines. Par analogie à l'exemple mieux compris des cellules épithéliales ((Matter and Mellman, 1994), (Mellman, 1996)), le trafic dirigé est nécessaire à la polarisation des neurones (Craig and Banker, 1994) mais de grosses différences existent entre les deux systèmes (Higgins et al., 1997).

Le tri des protéines peut être effectué par transport dirigé, par transport non dirigé et rétention préférentielle dans un compartiment, ou par restriction par barrière de diffusion, comme c'est le cas au niveau du segment initial (Winckler et al., 1999).

II.B- Trafic cellulaire et adressage de L1-CAM dans le cône

A un stade précoce, L1 joue un rôle dans la détermination et dans la reconnaissance régionales (Whitesides and LaMantia, 1995). Des régions distinctes du cerveau expriment L1 de façon temporaire et spécifique, ce qui leur confère des comportements adhésifs distincts. L1 est impliqué dans la migration des neurones ((Lindner et al., 1983), (Barami et al., 1994)), et leur interaction avec les cellules gliales et notamment les cellules de Schwann ((Wood et al., 1990), (Haney et al., 1999)). La molécule est impliquée dans la croissance (Lagenaur and Lemmon, 1987) et la fasciculation (Stallcup and Beasley, 1985a) des axones, compartiments où, à l'instar d'autres Ig-CAM, il est enrichi (van den Pol and Kim, 1993). Dans le cône, L1 est engagé dans les processus de signalisation du guidage axonal, en prenant part notamment au complexe récepteur pour Sem3A (cf Ib, (Dickson, 2002)).

Au sein de l'axone, dans le cas de neurones d'hippocampe en culture, L1 est particulièrement présent dans le cône de croissance (van den Pol and Kim, 1993), ce qui n'est pas forcément le cas pour tous les types de neurones (Bartsch et al., 1989). Le cône, possédant la molécule réceptrice L1, est alors sensible à la

densité de L1 sur le substrat : on observe des changements de forme du cône de croissance et une réorganisation du cytosquelette dépendante de L1 ((Burden-Gulley et al., 1995), (Burden-Gulley and Lemmon, 1996), (Kamiguchi and Lemmon, 1997)).

II.B.1- Adhésion homophile et signalisation intracellulaire

Une adhésion hautement régulée (fig. 16)

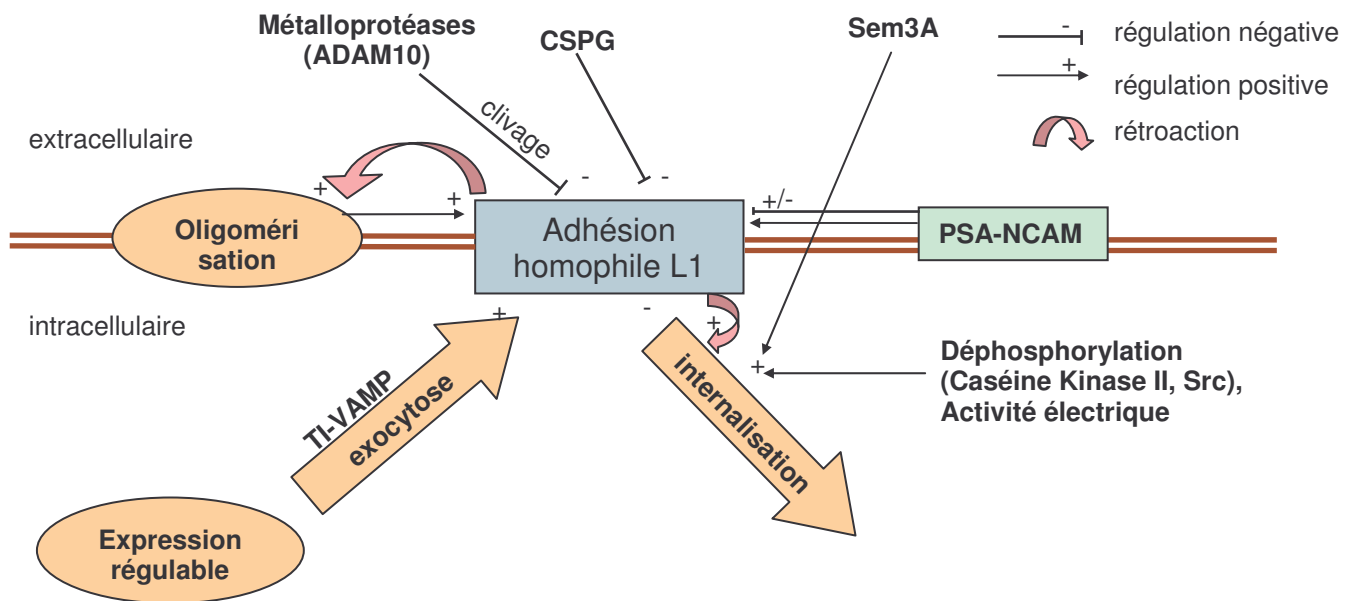


Figure 16

Schéma des principales régulations de l'adhésion homophile L1 au cône de croissance

L'adhésion homophile L1, due à l'interaction des domaines Ig de molécules vis-à-vis (cf Ib), ne nécessite pas l'intégrité de leur domaine cytoplasmique ((Hortsch et al., 1995), (Wong et al., 1995)), et elle est donc peu sensible aux modifications de ce domaine, contrairement à l'adhésion de la N-cadhérine et des intégrines ((Aberle et al., 1996), (Kolanus and Seed, 1997)). La régulation rapide de l'adhésivité due à L1 passe par son internalisation et son externalisation rapide (Kamiguchi et al., 1998). Ainsi l'adhésion L1 est régulée par la v-SNARE TI-VAMP (voir ci-dessous) probablement parce que cette molécule régule l'externalisation de la protéine d'adhésion (Alberts et al., 2003). Les mécanismes d'internalisation n'en sont pas moins importants (Long et al., 2001), pouvant être régulés de nombreuses façons et notamment par un signal de phosphorylation par la caséine kinase II, ciblant une séquence proche du domaine RSLE ((Wong et al., 1996), (Schultheis et al., 2006)), par la tyrosine kinase Src (Schmid et al., 2000), par l'activité électrique (Itoh et al., 2005), ou le signal séphorine Sem3A.

Trois autres mécanismes cellulaires peuvent réguler l'adhésion L1 (Kamiguchi, 2003). L1 peut être

oligomérisée en trans (Hall et al., 2000), son domaine extracellulaire peut être clivé (cf. Ib), et sa production peut être modifiée. Toutefois, ce dernier mode de régulation ne peut pas expliquer les modifications à court terme de l'expression de surface de L1.

Il existe également des mécanismes extracellulaires de régulation de l'adhésion L1. L1 interagit avec les chondroïtine sulfate proteoglycanes (CSPG), protéines associées à la MEC. Le neurocane, le phosphacane, et le brevicane ont un effet inhibiteur sur la croissance du cône dépendante de l'adhésion homophile L1 en interférant avec l'adhésion homophile (Grumet et al., 1996).

On sait que L1 interagit également avec d'autres Ig-CAM. Par exemple, N-CAM peut réguler l'adhésion homophile L1 notamment par son domaine PSA ((Kadmon et al., 1990), (Zhang et al., 1992), (Brummendorf and Rathjen, 1995)). Il existe d'autres partenaires hétérophiles de L1 qui peuvent également activer la croissance axonale.

L'adhésion déclenche une signalisation

Il existe des processus actifs déclenchés par l'adhésion de L1 au-delà de l'expression de ses propriétés adhésives (Cheng and Lemmon, 2004).

L'adhésion homophile de L1 stimule la croissance du cône *in vitro* (Lemmon et al., 1989) ainsi que l'endocytose de L1 (Schaefer et al., 2002), par un mécanisme de déphosphorylation de la protéine. Cet effet de l'adhésion homophile L1 sur l'endocytose de la molécule implique que l'adhésion L1 s'autorégule : rétroaction négative, mais aussi rétroaction positive, puisque l'adhésion favorise l'oligomérisation de la molécule. La trimérisation ainsi induite fait apparaître un site RGD d'interaction à l'intégrine sur le 3^{ème} domaine FNIII (Silletti et al., 2000).

Le signal adhésif L1 peut également être transmis par un corécepteur (Cheng and Lemmon, 2004). Plusieurs molécules membranaires interagissant notablement avec L1 sont de bonnes candidates : la neuropiline-1, le FGF-R, N-CAM, les intégrines.

Les mécanismes de signalisation de L1 lors de la croissance axonale

Si l'adhésion n'est pas altérée par les modifications du domaine cytoplasmique de L1, la neuritogénèse l'est. La signalisation intracellulaire est donc une composante importante du rôle de L1 au cône de croissance. L1 possède les domaines d'interaction intracellulaires communs aux protéines d'adhésion de sa sous-famille, ainsi que des interactions intracellulaires et des voies de signalisation propres (voir chapitre Ib et (Crossin and Krushel, 2000)), par lesquelles certaines voies de signalisation sont activées et aboutissent à la croissance de l'axone.

Un modèle détaillé de cette signalisation a été proposé (Kiryushko et al., 2004). Plusieurs autres protéines d'adhésion (N-CAM, N-cadhérine) empruntent en partie les voies de signalisation décrites, avec

en commun notamment l'importance de changements locaux de concentration du calcium dans cette signalisation. Deux voies de signalisation principales sont en jeu : la voie FGF-R ((Williams et al., 1994), (Saffell et al., 1997)) et la voie de la kinase Src.

La co-activation de L1 et du FGF-R active la phospholipase C gamma (PLC γ), qui produit le diacylglycérol (DAG), et l'acide arachidonique (AA), lipides engendrant un signal calcique ((Saffell et al., 1997), (Archer et al., 1999)). Ce signal pourrait permettre l'activation de la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Doherty et al., 2000). Le signal calcique régule aussi la dynamique du cytosquelette, notamment par la CAMKII (calmoduline kinase II), la protéine myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate (MARKS), et GAP-43 (growth-associated protein-43) phosphorylés par la PKC (cf partie IIa, et (Williams et al., 1995), (Meiri et al., 1998), (Gatlin et al., 2006)).

La voie MAPK (Schmid et al., 2000), qui nécessite l'endocytose de L1 (Schaefer et al., 1999) est activée par phosphorylation de la MAPK par une cascade de signalisation impliquant successivement Src (tyrosine kinase p60), la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), la protéine G Rac et MEK (MAPK kinase) (Schmid et al., 1999).

Cette voie MAPK, qui ne semble pas être nécessaire à la croissance axonale, possède cependant une action rétroactive sur L1. D'une part, l'activation de Src entraîne une endocytose de L1 par la phosphorylation de la clathrine et de la dynamine ((Wilde et al., 1999), (Schmid et al., 2000)). D'autre part, ERK2 (extracellular regulated kinase 2), composant de la cascade MAPK, semble être un acteur important de la régulation du recyclage de L1 en phosphorylant directement la protéine ((Schaefer et al., 1999), (Schaefer et al., 2002)).

II.B.2- Un compartiment particulier : le COSE (cell outgrowth secretory endosome)

Le domaine cytoplasmique de L1 compte 114 acides aminés (1144-1257) parmi lesquels le domaine YRSLE en position 1176 (séquence consensus Y - - L), assemblé à partir de deux exons séparés dont l'un n'existe que dans la forme neuronale de la molécule. Ce domaine permet l'intégration de L1 dans un compartiment particulier adressé au cône de croissance (Kamiguchi and Lemmon, 1998), et donc la bonne localisation de la protéine. C'est également la séquence d'interaction avec AP-2 et le complexe d'endocytose par la clathrine : cette séquence pourrait jouer un rôle de commutateur, selon son degré de phosphorylation.

TI-VAMP (tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein) est une v-SNARE (vesicule soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor) qui contrôle, avec les t-SNARE (target-SNARE) syntaxin 3 et SNAP23, l'exocytose indépendante des neurotoxines clostridiales (Galli et al., 1998). Dans les neurones en développement, la croissance axonale, insensible à la

neurotoxine tétanique et à la neurotoxine botulique F, est permise par ce type d'exocytose. Les vésicules auxquelles TI-VAMP est associée forment un compartiment particulier, tubulo-vésiculaire, à l'extrémité des cônes de croissance (Coco et al., 1999).

TI-VAMP est une protéine membranaire, possédant un domaine extracellulaire qui lui est propre, appelé Longin, qui l'empêche de prendre part aux autres complexes SNARE (ceux qui par exemple régulent l'exocytose des vésicules de neurotransmetteurs). Ce domaine permet également une régulation plus fine de l'interaction de TI-VAMP avec certains partenaires, comme SNAP25 (Martinez-Arca et al., 2000), et l'adressage de TI-VAMP aux endosomes tardifs, par une interaction avec la molécule adaptatrice AP-3 (Martinez-Arca et al., 2003).

On voit L1 associé à TI-VAMP géographiquement (microscopie confocale) et dans des fractions membranaires de même nature (analyse de biochimie en gradient de sédimentation) (Alberts et al., 2003) : à la fois L1 (Nakai and Kamiguchi, 2002) et TI-VAMP (Lafont et al., 1999) sont localisés dans des zones riches en sphingolipides et en cholestérol. La molécule L1 est donc associée à ce compartiment particulier, baptisé COSE (cell outgrowth secretory endosome) ((Alberts and Galli, 2003), fig. 17), qu'il faut relier aux PPV mentionnées plus haut (cf IIa). L'existence de ce compartiment est étroitement liée à l'intégrité du cytosquelette d'actine (Alberts et al., 2006), et on peut observer une accumulation d'actine au contact des billes recouvertes de L1.

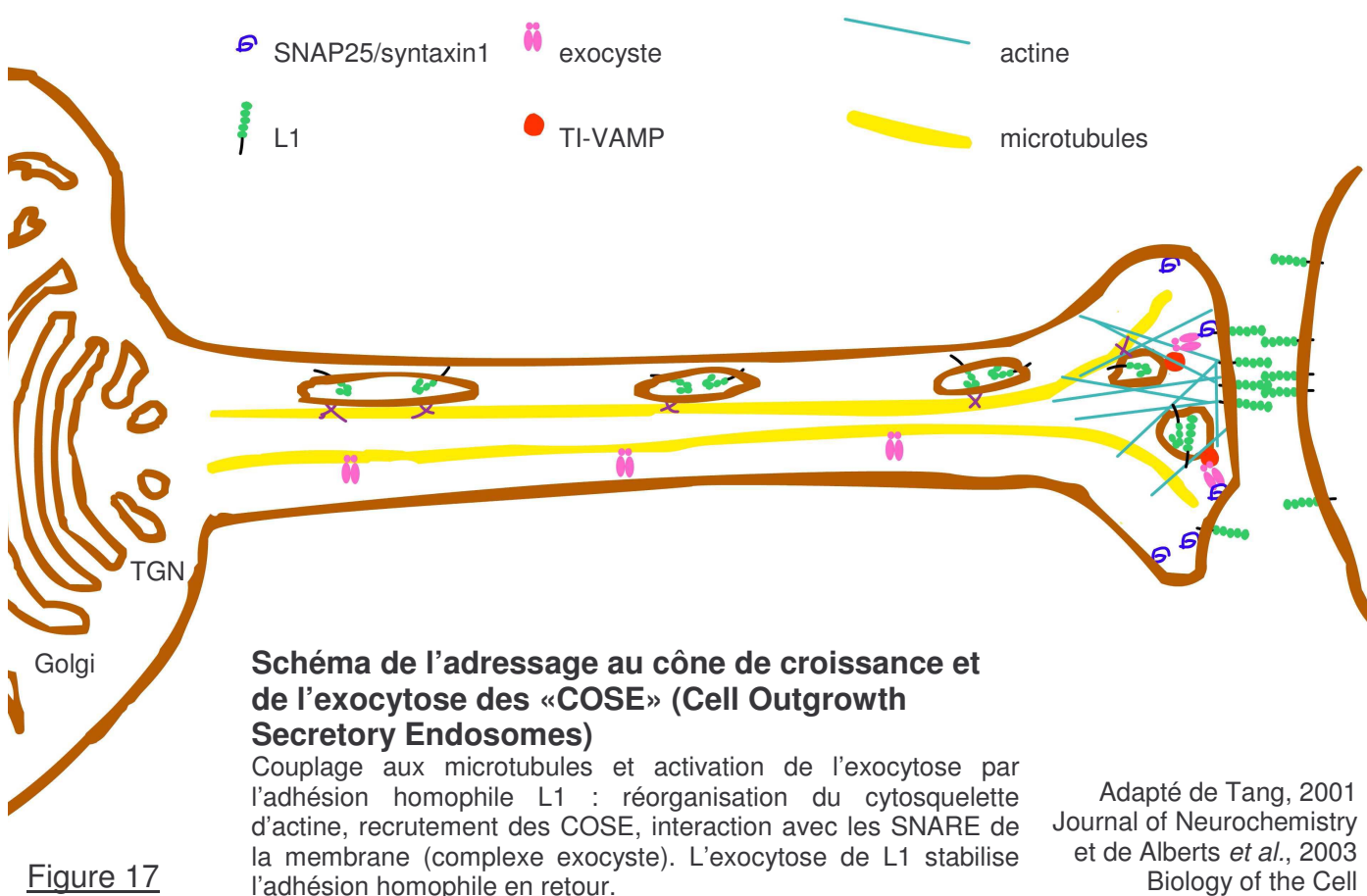


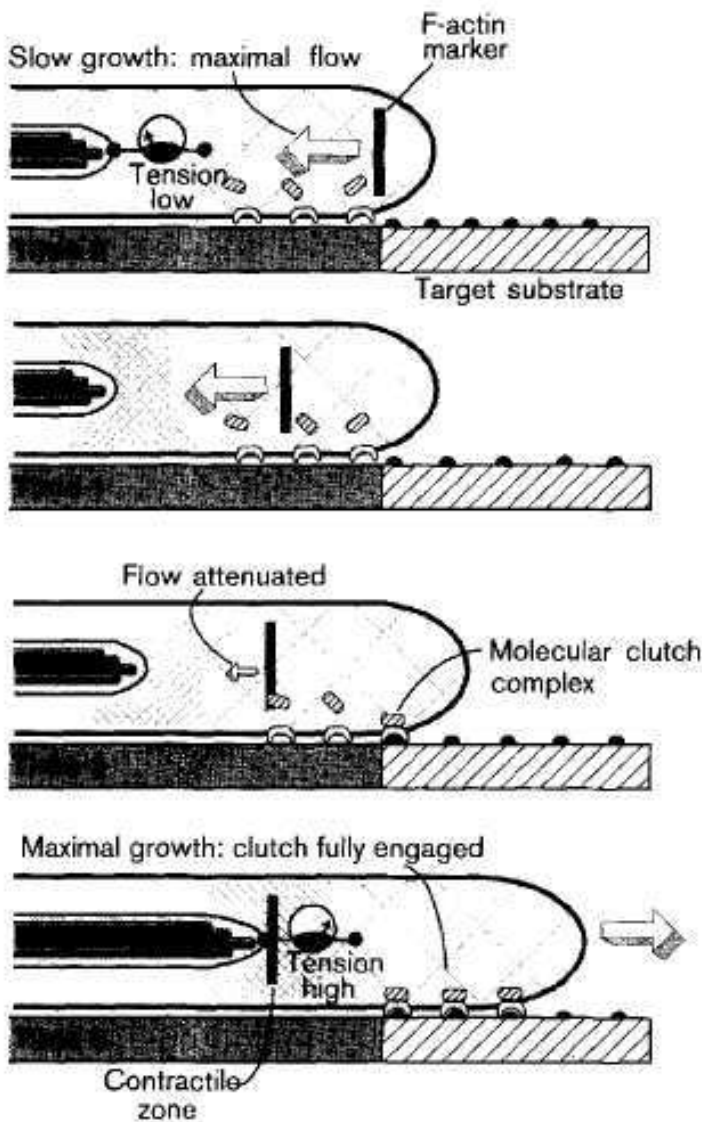
Figure 17

Cdc42, une GTPase de la famille Rho semblable à Ras, est un modulateur important du cytosquelette

d'actine dans le cône. Cependant on ne connaît pas encore le mécanisme moléculaire par lequel cette protéine agirait sur TI-VAMP. Le système actine/TI-VAMP, modulé par L1 et Cdc42, est un mécanisme important de la croissance axonale ((Martinez-Arca et al., 2000), (Tang, 2001)), ainsi que d'autres processus cellulaires faisant intervenir des phénomènes de protrusion membranaire, comme la phagocytose (Braun et al., 2004).

Notons que la localisation de L1 dans des zones riches en sphingolipides est importante pour la croissance axonale dépendante de L1 (Nakai and Kamiguchi, 2002), puisque leur destruction par inactivation locale avec un laser (micro-CALI), ou par traitement chimique, inhibe la croissance axonale sur substrat L1. On sait par ailleurs que Src est également localisé préférentiellement dans ces zones de type « lipid rafts » (Lisanti et al., 1994) où elle a donc la possibilité de phosphoryler L1, ce qui inhibe son endocytose.

II.B.3- La théorie du gradient ou du « tapis roulant »



Modèle de la réorganisation du cytosquelette et de l'embrayage moléculaire (molecular clutch) lors de l'adhésion du cône de croissance

La séquence d'évènement présentée est un mécanisme modèle de l'avancée du cône de croissance par le couplage entre substrat et cytosquelette. Avant l'interaction avec le substrat, le flux rétrograde d'actine est rapide. La formation d'un complexe adhésif permet la stabilisation de l'actine périphérique et la diminution du flux rétrograde, et une augmentation de la tension entre domaine central et périphérique. Par cette tension et la polymérisation d'actine continue à la périphérique, le neurite progression : c'est l'embrayage moléculaire.

Adapté de Suter et al., 1998
Current Opinion in Neurobiology

Figure 18

Le trafic de L1 vers le cône de croissance semble emprunter deux voies : une voie trans-cytotique (export vers le dendrite puis endocytose et transport vésiculaire vers l'axone), et une voie directe (Wisco et al., 2003). Les vésicules destinées à l'apport des composants de la croissance axonale (par exemple, les sphingolipides) ne sont exportées, elles, que par voie directe (Chang et al., 2006), et leur exocytose est contrôlée par TI-VAMP (Galli et al., 1998). Par ces processus d'adressage, L1 est enrichi au cône de croissance. Comme évoqué ci-dessus, elle y subit également une internalisation clathrine dépendante importante par son interaction avec la chaîne $\mu 2$ du complexe AP2 (Kamiguchi et al., 1998).

On a vu que l'endocytose de L1 au cône de croissance régule ses propriétés adhésives, sans diminuer substantiellement la quantité de L1 à la surface (Long et al., 2001). Elle le fait à la fois en modulant le temps de résidence de la molécule à la surface du cône, donc la durée des interactions possibles de la molécule, et en modulant spatialement la densité des protéines, dans la mesure où l'internalisation et l'exocytose ne se font pas au même endroit (Kamiguchi, 2003). Les sites précis d'exo et d'endocytose sont encore mal connus. Cependant, sur un substrat recouvert de L1, l'endocytose a lieu dans le domaine central de cône de croissance (Kamiguchi et al., 1998) tandis que le recyclage de L1 semble clairement s'effectuer dans le domaine périphérique du cône de croissance (Kamiguchi and Lemmon, 2000). Le transport centrifuge de vésicules contenant L1 vers la périphérie du cône est dépendant des extrémités dynamiques des microtubules, qui les transportent (Kamiguchi and Lemmon, 2000). De plus, sur substrat L1, il a été observé que les microtubules s'engagent plus loin dans le cône, jusqu'au domaine périphérique (Burden-Gulley and Lemmon, 1996). D'après les études menées dans l'équipe de Thierry Galli, ce compartiment de recyclage serait le « COSE ».

Les hétérogénéités de distribution de L1 selon les cellules et au sein d'une même cellule (van den Pol and Kim, 1993) pourraient être fondamentales pour la croissance et le guidage, puisque il a été montré depuis longtemps que l'adhésivité différentielle des cônes de croissance est elle-même importante (Bray and Hollenbeck, 1988). Il est déjà établi que l'adhésivité L1 contrôle la morphologie du cône de croissance (Payne et al., 1992). L1 crée une asymétrie avant-arrière dans l'adhésion du cône à son substrat ((Kamiguchi and Lemmon, 1997), (Kamiguchi and Yoshihara, 2001)) nécessaire à sa progression sur un substrat L1 (Lauffenburger and Horwitz, 1996) par son adressage et son recyclage spatialement organisé (Kamiguchi et al., 1998).

Comme d'autres molécules d'adhésion, L1 permet un couplage moléculaire à l'actine. Celui-ci s'effectue par l'ezrine et l'ankyrine (cf Ib), ou par le domaine transmembranaire d'un corécepteur (Panicker et al., 2006). L'ankyrine, acteur de l'immobilisation des IgCAM et notamment L1 (Gil et al., 2003), ne semble pas être nécessaire à la croissance du cône, mais plutôt à l'initiation et la bifurcation des neurites (Nishimura et al., 2003). L'ezrine jouerait un rôle plus important dans ce couplage ((Dickson et al., 2002), (Cheng et al., 2005)). Cette molécule pourrait être nécessaire à la mise en place de l'embrayage moléculaire (molecular clutch, fig. 18) par lequel s'effectue le couplage des molécules adhésives à l'actine, à partir du

moment où elles ont été localement agrégées par un contact adhésif ((Suter and Forscher, 1998), (Dent and Gertler, 2003)). Selon ce modèle, les molécules L1 agrégées se coupleraient au flux d'actine (cf. IIa), pourraient le restreindre de façon mécanique et permettre l'avancée du cône. Dans ce cadre, l'équipe de Kamiguchi a émis l'hypothèse d'un modèle de recyclage intracellulaire de L1 de la base vers la périphérie du cône par les microtubules, et d'un couplage au flux d'actine de la périphérie à la base du cône, la molécule prenant part à un contact adhésif (fig. 19). La survenue de ce contact permet la déphosphorylation de la protéine nécessaire à son endocytose. Ce mécanisme est proche de celui du recyclage des intégrines dans des cellules en migration ((Lawson and Maxfield, 1995), (Palecek et al., 1996)).

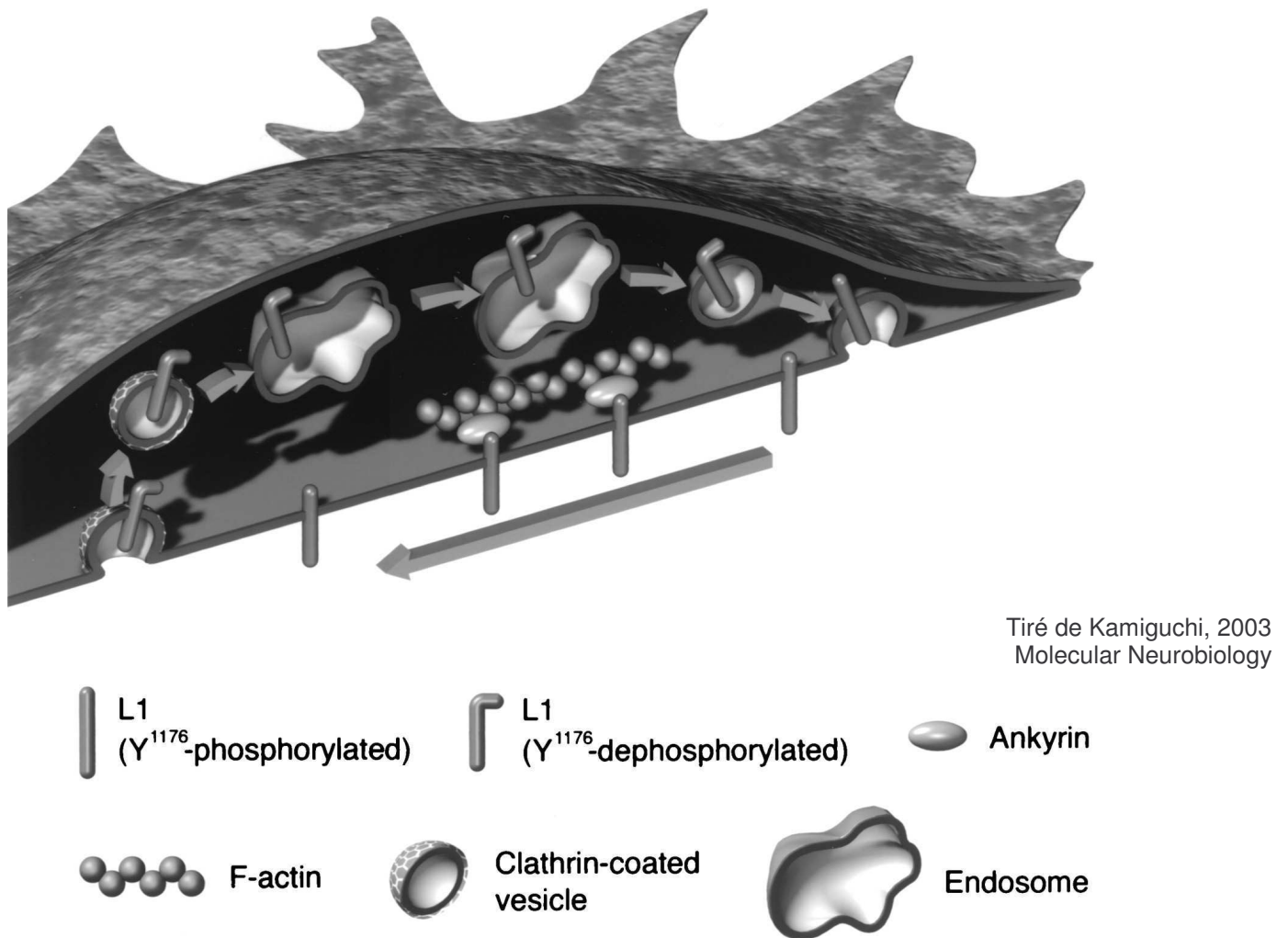


Schéma d'un cône de croissance en coupe modélisant le trafic intracellulaire de L1

Après l'internalisation par la clathrine de la molécule L1 déphosphorylée, dans le domaine central du cône de croissance, la molécule est amenée vers le domaine périphérique en se couplant à l'extrémité distale des microtubules, où elle est exocytée sous forme phosphorylée. A la membrane, elle forme des liaisons homophiles, se couple au flux rétrograde d'actine et se dirige vers le domaine central du cône de croissance.

Figure 19

Si ce modèle est séduisant, il reste à comprendre dans quelle mesure un tel mécanisme peut s'appliquer sur des neurones évoluant sur des substrats différents ou bien *in vivo*. Plusieurs équipes ((Tosney and Wessells, 1983), (Dailey and Bridgman, 1993)) ont exprimé l'idée que l'exocytose locale à la périphérie

du cône de croissance n'est pas nécessaire à la croissance axonale, mais il semble que l'existence d'un tel mécanisme dépende de la nature du neurone. Il est clair par contre que la simple diffusion à partir du soma ne peut expliquer l'enrichissement de certaines protéines au cône de croissance. Nous avons choisi d'étudier la dynamique de contacts adhésifs homophiles de L1, à l'aide de microsphères recouvertes de la protéine L1, afin d'analyser les relations fortes existant entre adhésion et recyclage au niveau local.

III- Relations entre protéines d'adhésions et récepteurs aux neurotransmetteurs ; implication dans la synaptogenèse

III.A- Mécanismes de la synaptogenèse

La synapse est une jonction asymétrique à travers laquelle un signal passe du neurone pré-synaptique au neurone post-synaptique. La terminaison pré-synaptique est spécialisée pour transformer les signaux électriques qu'elle reçoit en signal chimique intercellulaire par l'exocytose dépendante du calcium de neurotransmetteurs : c'est la zone active (Phillips et al., 2001). La terminaison post-synaptique est spécialisée pour détecter le neurotransmetteur et effectuer la conversion inverse en signal électrique au niveau d'une zone riche en récepteurs : c'est la densité post-synaptique ((Garner et al., 2002), (Sheng, 2001)). Cette organisation générale, partagée par les différentes synapses du SNC, n'exclue pas des différences notamment morphologiques (par exemple, présence ou non d'épine sur le neurone post-synaptique) selon le type de synapse (nature du neurone, neurotransmetteur), son niveau de maturation, ou son efficacité.

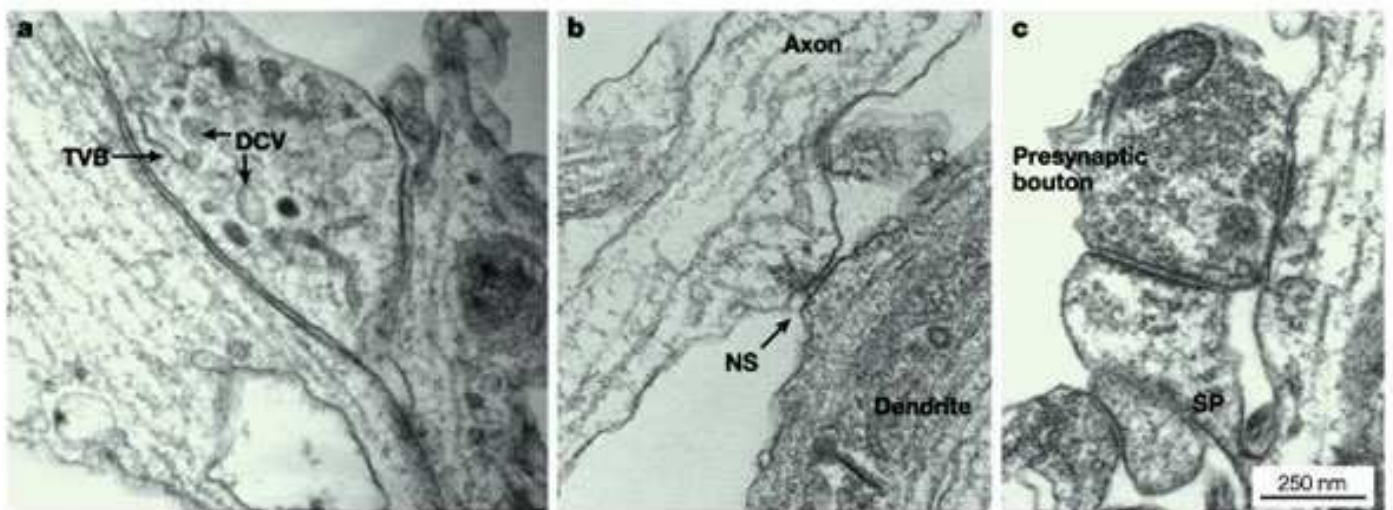
Les $2 \cdot 10^{10}$ neurones présents dans le cerveau sont chacun en relation avec de nombreux neurones, qui ne sont pas forcément proches de lui. En résulte un réseau très complexe (10^{12} - 10^{15} synapses), montrant des connexions préférentielles entre certaines régions. Les liaisons ne sont donc pas formées « au hasard » mais sont assez largement déterminées, et d'un individu à l'autre on retrouve une organisation similaire.

On a peine à imaginer comment peut s'établir un tel réseau, comment chaque neurone parvient à trouver ses cibles de façon reproductible mais assez dynamique pour pouvoir s'adapter à des situations

physiologiques différentes. Dès 1963, Sperry fait l'hypothèse de l'existence de plusieurs couples ligand/récepteur à affinité préférentielle, organisés par exemple en gradient, ce qui permettrait de rendre compte de l'organisation topologique de certaines zones du cerveau et des connectivités préférentielles (Sperry, 1963). Les protéines d'adhésion membranaires sont de bons candidats pour jouer ce rôle. Cependant on peut remarquer que peu de molécules semblant jouer un rôle dans une étape particulière d'un processus spécifique de formation de synapses ont été reconnues comme actrices plus globales de ce mécanisme. C'est ainsi qu'on peut suspecter qu'une palette de plusieurs couples de molécules de reconnaissance serait spécifique d'un type de neurone ou même d'un type de synapse.

Les synapses ainsi formées ne sont pas toutes vouées à perdurer pendant toute la vie de l'individu, et il semble que la potentialisation de certaines synapses immatures, parallèlement à la destruction d'autres synapses, soit une étape à part entière du développement et de la maturation du système nerveux central. Les protéines d'adhésions sont là aussi susceptibles d'entrer en jeu ((Davis et al., 1997), (Benson et al., 2001)). La formation des synapses dans le cerveau est un processus qui débute pendant le développement embryonnaire et qui se prolonge au-delà de la naissance, et s'il est vrai que le nombre de neurones n'augmente plus significativement chez l'adulte, la synaptogenèse, elle, s'effectue encore !

III.A.1- La formation de la synapse, modèle de la synapse excitatrice du neurone d'hippocampe en culture (fig. 20, fig. 21)



Tiré de Ziv et al., 2004
Nature Reviews | Neuroscience

Images en microscopie électronique de synapses à différentes étapes de maturation

(a et b) Neurones d'hippocampe en culture à 8 jours *in vitro*. (a) On observe des structures tubulo-vésiculaires (TVB) et des vésicules opaques aux électrons (DCV), dont une partie au moins représente des vésicules précurseurs de la zone active. (b) Apparition d'un épaississement de la membrane et de quelques vésicules synaptiques au contact : c'est une synapse précoce (NS).

(c) Neurones d'hippocampe en culture à 15 jours *in vitro*. A la synapse mature, on observe au niveau pré-synaptique une zone active très développée avec de nombreuses vésicules synaptiques, et en post-synaptique, l'épine dendritique (SP) qui émerge de la dendrite.

Figure 20

Au vu de la difficulté d'explorer la formation de la synapse du SNC, les chercheurs ont d'abord tenté de comprendre les mécanismes de la formation de la synapse de la JNM (Jonction Neuro-Musculaire), plus accessible, sur laquelle ils se sont basés pour comprendre la synaptogenèse entre neurones ((Hall and Sanes, 1993), (Sanes, 1997)). Cependant le modèle de la JNM ne sera pas détaillé ici, puisque les deux types de synapses sont assez distincts par leur morphologie et les molécules qui les composent : la synapse de la JNM possède une fente synaptique de 50nm, présentant une lame basale, et l'agrine, protéoglycane sécrétée, jouerait un rôle important dans la différenciation en interagissant avec cette lame basale ; la synapse du CNS possède une fente synaptique plus étroite (20nm), sans lame basale et sans agrine ((Uchida et al., 1996), (Serpinskaya et al., 1999), (Friedman et al., 2000), (Bose et al., 2000)).

De nombreux axones possèdent la machinerie nécessaire pour libérer de faibles quantités de neurotransmetteurs, et de nombreuses dendrites possèdent des récepteurs aux neurotransmetteurs à leur surface, et ceci, avant qu'un contact synaptique ne s'établisse (Verderio et al., 1999). Il a même été considéré que cette sécrétion précoce pouvait initier la communication intercellulaire nécessaire à la synaptogenèse (Haydon and Drapeau, 1995). Cependant, pour que la machinerie d'exocytose s'agrège dans le compartiment pré-synaptique et que la densité post-synaptique s'établisse en regard, et ce en parfaite apposition, une communication entre le neurone pré-synaptique et le neurone post-synaptique doit être établie (Fox and Umemori, 2006). Récemment a été révélé le rôle possible de molécules dites morphogènes, comme Wnt, dans cette communication réciproque (Ahmad-Annuar et al., 2006).

Un seuil de reconnaissance moléculaire et un seuil de maturité post-synaptique ((Fletcher et al., 1994), (Super and Soriano, 1994), (Benson et al., 2001)) doivent être franchis pour entamer la différenciation pré-synaptique de l'axone. Il est probable qu'interviennent des signaux spécifiques, comme par exemple un signal de phosphorylation de tyrosine de la protéine LAR-RPTP, de façon analogue à ce qui se passe au niveau de la JNM avec la muscle specific receptor tyrosine kinase, MuSK (Sanes, 1997).

On observe alors une agrégation des constituants de la zone active. Les constituants synaptiques sont contenus dans des vésicules pré-assemblées, précurseurs de la zone active ((Ahmari et al., 2000), (Zhai et al., 2001), (Phillips et al., 2001)), ce qui explique peut être comment l'agrégation de ces constituants peut s'effectuer de manière aspécifique au contact de billes recouvertes de poly-lysine (Burry, 1980). Une des molécules de ces vésicules précurseurs, Bassoon, jouerait un rôle important dans l'organisation de la zone active. La différenciation de la zone active se fait donc de façon discrète (Shapira et al., 2003), grâce à l'exocytose de vésicules dont la lumière est dense aux électrons (PTV = piccolo/Bassoon transport vesicles), contenant des molécules de l'échafaudage pré-synaptique qui vont s'organiser en réseau (Piccolo, Bassoon, RIM), des composants de la machinerie d'exocytose, comme SNAP-25, et des canaux calciques dépendants du potentiel électrochimique de types N ((Lee et al., 2003), (Waites et al., 2005)). D'autres constituants (autres canaux calciques, Sv2, synapsin1) arrivent également à la synapse par paquets.

Pour les synapses glutamatergiques, la maturation de la pré-synapse semble être corrélée à une capacité de

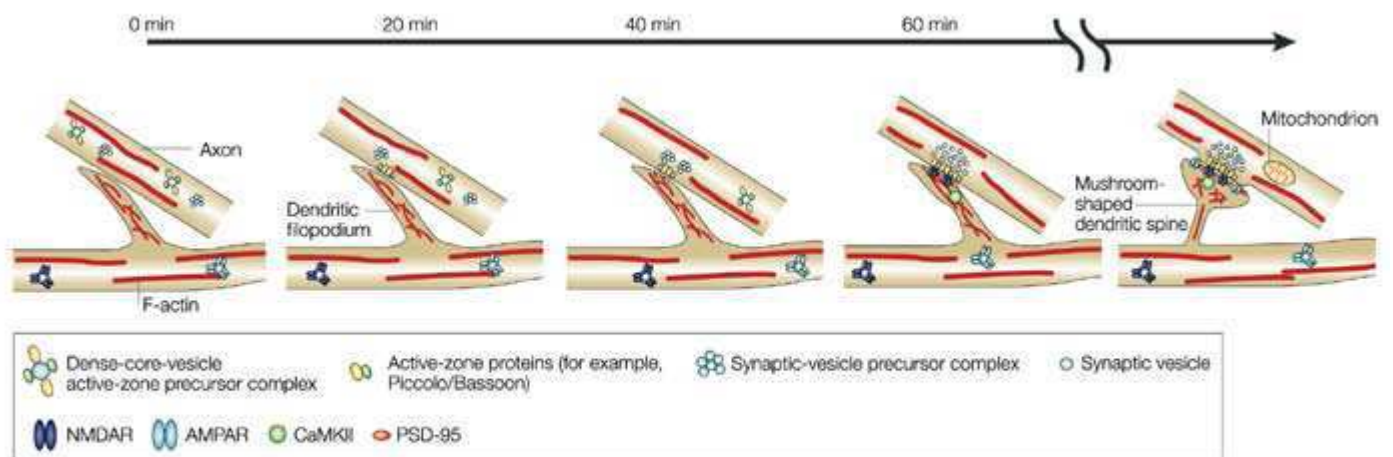
recyclage plus grande. En effet les synapses immatures semblent comporter peu de vésicules synaptiques, mais plutôt des structures tubulo-vésiculaires ((Ahmari et al., 2000), (Mozhayeva et al., 2002)).

Par contre, au niveau post-synaptique, il semble que le recrutement des constituants synaptiques soit plus graduel ((Bresler et al., 2004), (Okabe et al., 2001) (Homer1c, Shank2/3), (Shen and Meyer, 1999) (CaMKII)), même si certains articles parlent d'un transport « modulaire » de ces constituants vers la synapse (Washbourne et al., 2002). Il est possible également que certains de ces constituants soient synthétisés localement, comme le laisse supposé la présence de leur ARNm dans les dendrites ((Bockers et al., 2004), (Ju et al., 2004), (Steward and Schuman, 2001), (Waites et al., 2005)). Les composants recrutés le plus précocement sont les protéines de la famille des MAGUK, notamment SAP102 et la PSD-95 ((Sans et al., 2000), (Bresler et al., 2001)), qui semble jouer un rôle central sur l'assemblage des composants de la post-synapse ((Okabe et al., 1999), (Garner et al., 2000)). Une étude utilisant extensivement le marquage FM4-64 des neurones (Friedman et al., 2000) qui permet de visualiser les compartiments pré-synaptiques actifs par l'endocytose du marqueur, établit une chronologie de la formation de la synapse en 2 heures, la différenciation du compartiment pré-synaptique, indiquée par l'apparition de Bassoon au contact formé, ayant lieu plus précocement (30 min) que la différenciation post-synaptique, mettant en jeu l'agrégation de PSD95 et des récepteurs aux neurotransmetteurs (à partir de 45 minutes après le contact initial). La durée de formation de la synapse postulée par cette étude, confirmée ultérieurement ((Bresler et al., 2001), (Bresler et al., 2004), (Okabe et al., 2001), (Waites et al., 2005)) se place en opposition avec une idée précédemment répandue qu'il faudrait plusieurs jours pour faire une synapse ((Rao et al., 1998), (Lee and Sheng, 2000)).

Les deux types de récepteurs ionotropes au glutamate s'agrègent à la synapse par des processus distincts qui semblent être contrôlés par un grand nombre de protéines, par exemple des protéines à domaine PDZ ou le cytosquelette. Les récepteurs de type NMDA sont présents à la membrane sous forme agrégée dans les neurones jeunes, même s'il est peu probable que ces agrégats préfigurent des synapses réelles. Le recrutement des récepteurs de type AMPA semble reposer, selon la composition en sous-unités du récepteur (Passafaro et al., 2001), sur une exocytose de vésicules en dehors de la synapse, leur insertion à la synapse étant régulée ensuite par un mécanisme de diffusion-séquestration (Borgdorff and Choquet, 2002). Les récepteurs de type NMDA et AMPA ont une stabilité différente à la synapse (Groc et al., 2006) et des rôles différents. Le nombre d'AMPA est modulé fonctionnellement à la synapse ((Malinow and Malenka, 2002), (Bredt and Nicoll, 2003)), puisque leur recrutement est induit par l'activité des récepteurs de type NMDA, dans des processus de modification à long terme de l'efficacité synaptique ((Feldman and Knudsen, 1998), (Liao et al., 1999), (Shi et al., 1999), (Nam and Chen, 2005)) : si les recrutements des deux types de récepteurs sont différents, ils ne sont pas indépendants. Notons que les récepteurs de type AMPA ne sont pas exprimés dans les mêmes complexes que les autres récepteurs (Husi et al., 2000).

Le fait que la maturation du compartiment pré-synaptique intervienne plus précocement que celle du compartiment post-synaptique ((Fletcher et al., 1994), (Li and Sheng, 2003)) implique que le compartiment pré-synaptique pourrait exercer un contrôle sur la différenciation du compartiment post-synaptique, contrôle

indépendant de l'activité ((Friedman et al., 2000), (Verhage et al., 2000)). Ce contrôle pourrait s'effectuer par des signaux solubles (Narp : neural activation regulated pentraxin, (O'Brien et al., 1999)) ou des protéines d'adhésion (N-cadhérine, (Shapiro and Colman, 1999), ephrinB, (Penzes et al., 2003), neurexin, (Graf et al., 2004)). Ou encore, le neurone post-synaptique cible devrait pouvoir signaler au neurone pré-synaptique son état de maturation et sa faculté de former une synapse, au moyen de molécules comme la neurologine, le FGF, Wnt ((Umemori et al., 2004), (Fox and Umemori, 2006)). Il semble en tout cas que ces processus de maturation et de synaptogenèse ne soient pas seulement organisés par « l'horloge génétique » des neurones, mais que les interactions entre cellules soient nécessaires, ce qui en fait un système dynamique et adaptable à l'environnement cellulaire.



Tiré de Li *et al.*, 2003
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Séquence des événements moléculaires et morphologiques de la maturation synaptique

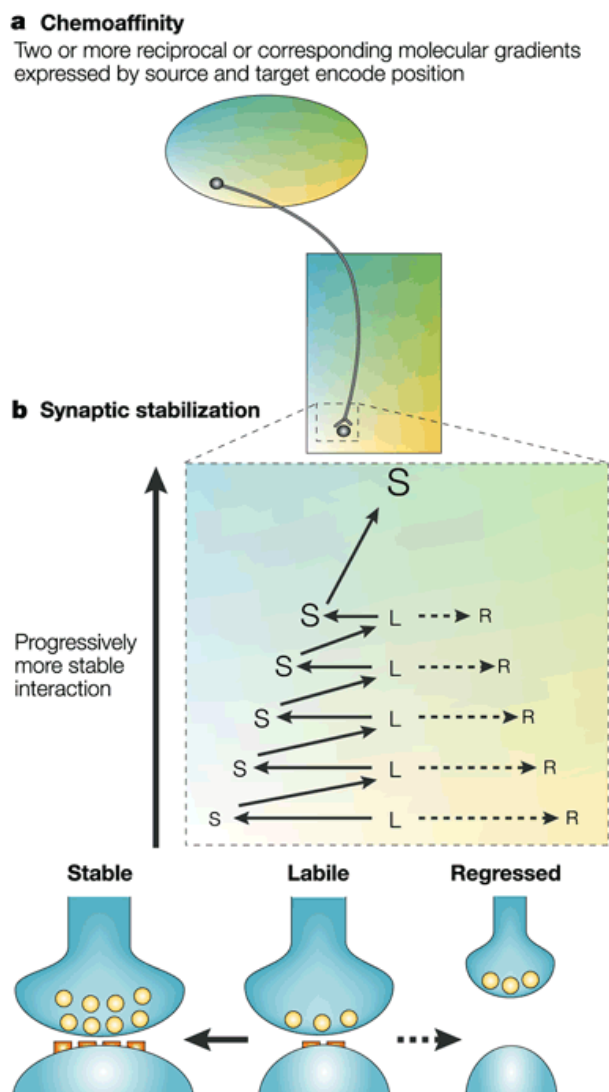
Initiation d'un contact entre un filopode dendritique et un axone. On observe d'abord le recrutement des protéines Bassoon et Piccolo de la zone active, probablement par l'exocytose de vésicules précurseurs. Le recrutement des vésicules synaptiques intervient ensuite : la terminaison synaptique devient rapidement fonctionnelle. La PSD-95, puis, de façons distinctes, les récepteurs de type AMPA et NMDA s'accumulent dans l'épine. Plusieurs molécules interviennent dans la maturation synaptique, parmi lesquelles la Calmoduline Kinase II.

Figure 21

Au-delà de ces premières étapes de formation de la synapse (Ziv and Garner, 2004), celle-ci subit une maturation lente corrélée à un renforcement de l'efficacité synaptique. De nouveaux composants sont insérés à la synapse, et les molécules d'adhésion participent à la poursuite du dialogue entre les compartiments pré- et post-synaptiques, notamment dans la plasticité morphologique des synapses (Lippman and Dunaevsky, 2005), en même temps qu'un certain nombre de synapses disparaît. On aboutit à une diversité et une complexité synaptique qui dépasse le cadre du programme génétique de développement : c'est l'apprentissage.

III.A.2- Spécificité synaptique : implication des protéines d'adhésion

Dès qu'on a tenté de comprendre comment la synaptogenèse pouvait s'effectuer, deux hypothèses se sont affrontées. Pour Weiss, la formation des synapses était dépendante de l'activité du réseau ((Weiss, 1934), (Grafstein, 2006)). Sperry a quant à lui émis l'hypothèse de la chimio-affinité qui donne un rôle primordial aux facteurs diffusifs ou membranaires (protéines d'adhésion) dans l'établissement de contacts synaptiques spécifiques ((Sperry, 1963), (Benson et al., 2001), fig. 22). Des résultats récents concluent que l'exocytose de neurotransmetteur n'est pas nécessaire à la synaptogenèse, comme le montre la persistance de la formation de synapses dans des neurones issus de souris knock-out pour Munc18, protéine essentielle à la libération de neurotransmetteur ((Verhage et al., 2000), (Varoqueaux et al., 2002)), même si la dépolarisation spontanée des neurones semble tout de même nécessaire (Hanson and Landmesser, 2004). Enfin, l'activité électrique du réseau est nécessaire aux processus plus tardifs de maturation synaptique.



Modèle pour l'établissement de la spécificité synaptique

a Modèle de chimioaffinité selon Sperry
b Une synapse d'abord labile (L) peut être stabilisée (S) ou déstabilisée, et regresser (R), selon des différences d'affinités moléculaires entre axone et dendrite et d'activité neuronale, et selon la présence de facteurs trophiques.

Adapté de Benson *et al.*, 2001
Nature Reviews Neuroscience

Figure 22

Une molécule d'adhésion devant jouer un rôle dans la formation, la maturation ou le maintien de la synapse doit se trouver au niveau de la synapse. Pour être de bons candidats pour jouer un rôle dans la formation des synapses, les protéines d'adhésion doivent également comporter des sites intracellulaires d'interaction avec des molécules de l'échafaudage synaptique ou encore avec des molécules-signal de la

maturation synaptique (Yamagata et al., 2003), par exemple des protéines à domaines PDZ (notamment dans le compartiment pré-synaptique : Rim et Bassoon (Zhai et al., 2001), et post-synaptique : PSD-95 et GRIP (Sheng, 2001)), ou bien des protéines interagissant avec l'actine et/ou ces protéines à domaines PDZ, et localisées aux synapses (épines) : caténines (c'est le cas de N-cadhérine), vinculine et spectrine (plutôt pour les Ig-CAM) (Yamagata et al., 2003). Les protéines d'adhésion, comme on l'a déjà évoqué, sont des acteurs importants de la spécificité synaptique (Serafini, 1999). Cela est d'autant plus vrai pour celles qui sont impliquées dans la synaptogenèse. Les protéines sidekick et SYG-1 jouent un rôle dans cette spécificité (Yamagata et al., 2003). De par leurs localisations respectives dans des sous-groupes de neurones, les cadhérines sont aussi de bons candidats pour coder la spécificité des contacts synaptiques, même si ce rôle n'a pas été prouvé dans le cas général ((Miskevich et al., 1998), (Redies et al., 2000), (Gil et al., 2003)). Notons qu'il existe un couplage fort entre différenciation neuronale et synaptogenèse : l'activation des gènes codant pour des protéines synaptiques intervient dans le même temps que s'établit un réseau spécifique. Enfin, il faut que le neurone puisse distinguer le compartiment axonal, pré-synaptique, du compartiment dendritique du neurone voisin pour établir avec lui une synapse. Cela nécessite un mécanisme de reconnaissance pouvant préfigurer la polarisation du contact synaptique, par exemple un couple de molécule d'adhésion hétérophiles, comme le couple neurexine-neuroigine. C'est le cas également de la nectine, qui forme préférentiellement un hétérodimère nectine-1/nectine-3 ((Mizoguchi et al., 2002), (Beaudoin, 2006)).

L'initiation d'un contact synaptique nécessite la stabilisation d'un contact précoce entre des filopodes des compartiments axonaux et dendritiques, structures dynamiques dont la durée de vie est d'environ 10 minutes. En effet, puisque ces structures se rétractent périodiquement, la reconnaissance entre neurones doit se faire rapidement et la fenêtre d'action est courte. On peut imaginer que cette rétraction elle-même, exerçant une contrainte mécanique sur le compartiment que le filopode a atteint, lui permet de tester la zone d'accrochage. Les protéines d'adhésion pourraient jouer ce rôle de reconnaissance rapide dans la mesure où elles ont un effet stabilisateur dès qu'elles sont liées à leur partenaire, et où elles sont liées au cytosquelette à travers lequel elles peuvent transmettre des contraintes mécaniques. On sait qu'elles modulent la morphogenèse et la motilité du neurone. Or, contrairement au modèle de l'établissement de la jonction neuromusculaire, où l'axone contacte une cible immobile et évolue en terminaison pré-synaptique, le compartiment dendritique joue un rôle actif dans la formation de synapse « en passant » (Ziv and Garner, 2001). La mobilité des filopodes dendritiques est nécessaire pour augmenter les possibilités de rencontre entre axone et dendrite, permettre la formation de synapses ((Ziv and Smith, 1996), (Fiala et al., 1998)), et les stabiliser au niveau du contact formé, probablement par l'intermédiaire d'un signal calcique (Lohmann et al., 2005). Cette plasticité des épines immatures serait effectivement modulée par les protéines d'adhésion, notamment la N-cadhérine ((Okamura et al., 2004), (Abe et al., 2004), (Lippman and Dunaevsky, 2005) et cf IIIb). Après les premières étapes de la synaptogenèse, celles-ci pourraient également permettre la stabilisation du filopode en épine grâce à des réarrangements du cytosquelette (Dunaevsky and Mason,

2003), comme cela a été montré pour l'éphrine B (Moeller et al., 2006). Dans des processus de plasticité à long terme, la redistribution des protéines d'adhésion sous le contrôle de l'AMPC permet la formation de nouvelles synapses dans une zone privilégiée (Martin and Kandel, 1996).

III.A.3- Relations connues entre protéines d'adhésion et récepteurs

Il existe plusieurs exemples de liens forts voire directs entre protéines d'adhésion et récepteurs aux neurotransmetteurs qui pourraient permettre d'expliquer le recrutement de ces derniers aux synapses. En dehors de la N-cadhérine, que nous allons examiner dans le chapitre suivant, on sait que d'autres types de protéines d'adhésion entretiennent de tels liens privilégiés.

Le couple EphB/ephrineB, classiquement connu pour sa fonction dans le guidage axonal (Kullander and Klein, 2002), participe au mécanisme de synaptogenèse. Il a été montré qu'EphB module les courants synaptiques de type NMDA (Henderson et al., 2001) et le recrutement des récepteurs AMPA (Kayser et al., 2006). Ce récepteur aux éphrines possède un domaine PDZ, mais c'est de manière directe qu'il interagit avec le domaine extracellulaire de NR1 et provoque son agrégation (Dalva et al., 2000). En réponse à son signal éphrineB1, il peut participer à la maturation des épines (Penzes et al., 2003). C'est un candidat pour le recrutement des récepteurs aux neurotransmetteurs intracellulaires à la densité post-synaptique (Ziv and Garner, 2004), mais la viabilité du mutant n'exprimant aucune des trois EphB montre que ce couple de protéines ne contrôlerait qu'une sous-population de neurones (Henkemeyer et al., 2003).

Deux nouvelles protéines appartenant à la famille des IgCAM ont été récemment identifiées par des expériences de double-hybride avec le domaine PDZ de PSD95 ou de SAP97 : SALM (synaptic adhesion-like molecule) et NGL2 (netrin G ligand). Leurs propriétés adhésives ne sont pas démontrées mais elles semblent participer à la signalisation nécessaire à la formation de synapses. On ne connaît pas le partenaire de SALM à la synapse, mais on sait que cette protéine interagit avec PSD95 par son domaine PDZ. SALM1 peut recruter les NMDAR par cette voie, ou par une interaction directe avec NR1 en extracellulaire qui a été observée par co-immunoprécipitation dans des cellules non-neurales transfectées (Wang et al., 2006). SALM2 agrège PSD95 et les AMPAR, et on observe des défauts de transmission synaptique si elle n'est pas exprimée (Ko et al., 2006). NGL2 est une molécule de séquence proche, et elle possède des propriétés de recrutement de composants synaptiques similaires (Kim et al., 2006).

On sait que LAR-RPTP, protéine de la famille des Ig-CAM, est associé à la liprine- α . Par cet intermédiaire, elle interagirait avec les récepteurs de type AMPA par GRIP ((Yamagata et al., 2002), (Wyszynski et al., 2002)). Ce complexe est associé à la N-cadhérine (Dunah et al., 2005).

Enfin, il faut évoquer la relation existant entre les Ig-CAM et les synapses GABAergiques ((Hanson and Landmesser, 2004), (Huang, 2006)). On trouve N-CAM associé de façon privilégiée aux neurones GABAergiques dans l'hippocampe (Nacher et al., 2002). L'étude de l'activité synaptique inhibitrice chez des souris n'exprimant pas L1 montre que la protéine est impliquée dans la formation des synapses GABAergiques de l'hippocampe (Saghatelian et al., 2004). De manière analogue, la neurofascine est responsable de la localisation de l'innervation GABAergiques dans les cellules de Purkinje (Ango et al., 2004). Si les mécanismes moléculaires orchestrant ces processus ne sont pas encore connus, l'ankyrine paraît jouer un rôle majeur.

III.A.4- Des molécules capables d'initier seules la formation de synapses - Limites du modèle

Seuls les couples d'adhésion SynCAM-SynCAM et neurexine-neurologine semblent pouvoir provoquer par eux-même l'assemblage d'une synapse fonctionnelle (Sara et al., 2005). Tous deux (SynCAM et neurexin) se lient à CASK en pré-synaptique.

SynCAM (Biederer et al., 2002)

Cette molécule d'adhésion homophile, de la famille des Ig-CAM, est codée par quatre gènes distincts. Des observations en microscopie électronique montrent qu'elle est présente des deux côtés de la synapse. La surexpression de SynCAM1 dans les neurones accélère la différenciation synaptique, et l'expression de SynCAM1 dans des cellules hétérologues induit une différenciation pré-synaptique des neurones d'hippocampe en co-culture. Si on co-transfecte SynCAM1 avec un récepteur aux neurotransmetteurs, GluR2, on obtient une synapse fonctionnelle. Le mécanisme n'est pas déterminé mais on sait que SynCAM peut interagir avec des protéines à domaine PDZ par son domaine C-terminal.

Il est cependant à noter que des études menées au laboratoire (C. Breillat) n'ont pas permis d'observer un recrutement par des billes SynCAM de molécules synaptiques, et que peu d'études ont été menées depuis sur le sujet.

β -neurexine et neurologine dans la synaptogenèse ((Scheiffele et al., 2000), (Cantalops and Cline, 2000))

Ce couple de protéines transmembranaires d'adhésion hétérophile dépendante du calcium est présent à la membrane synaptique des neurones, notamment glutamatergiques, où neurologine est du côté post-synaptique (Song et al., 1999). La β -neurexine possède des domaines laminine sur sa face extracellulaire et un site de liaison aux domaines PDZ dans le segment intracellulaire. La neurologine possède un domaine homologue à l'acétylcholinestérase, sans activité catalytique (Dean et al., 2003), et également un site de

liaison aux domaines PDZ dans le segment intracellulaire ; l'auto-agrégation de la neuroligine permet d'agréger la β -neurexine et des vésicules synaptiques dans le compartiment pré-synaptique. Le couple neurexine-neuroligine est impliqué dans des pathologies de retards mentaux, donc vraisemblablement dans le développement du système nerveux. Ces éléments conduisent à penser que la liaison entre ces deux protéines pourrait avoir un rôle dans la formation des synapses.

Pour tester cette hypothèse, l'équipe de Peter Scheiffele a étudié le comportement de liaisons formées entre des neurones et des cellules hétérologues transfectées avec de la neuroligine, dans une coculture. Les liaisons établies, spécifiques des cellules transfectées, montrent un enrichissement en synapsine-1, une zone dense aux électrons en microscopie électronique, et une excitabilité électrique. Ils utilisent également la β -neurexine soluble en compétition dans ces cocultures et dans des cultures de neurones, ce qui affecte la formation de synapses : la liaison neurexine-neuroligine joue effectivement un rôle dans la formation des synapses.

Le domaine extracellulaire de la neuroligine permet à la fois l'adhésion à la neurexine et l'agrégation des vésicules synaptiques, et ces deux activités sont liées. La β -neurexine, quant à elle, permet en l'absence de stimulation électrique du neurone une différenciation post-synaptique par une agrégation de PSD-95, de NMDAR et de GABAR, mais pas d'AMPA ((Graf et al., 2004), (Nam and Chen, 2005)). De très nombreuses isoformes de neurexine sont générées par épissage alternatif (Ullrich et al., 1995), et certaines de ces isoformes, qui possèdent une expression régionale spécifique, pourraient jouer un rôle dans la spécificité synaptique. Mais le couple neurexine/neuroligine a également un rôle dans la spécificité au type de synapse : neuroligine-1 réside dans les synapses excitatrices, et neuroligine-2 dans les synapses inhibitrices ; leur expression, ainsi que des formes issues d'épissages alternatifs, semblent contrôler l'équilibre entre synapses excitatrices et inhibitrices ((Chih et al., 2005), (Chih et al., 2006)).

On sait que les deux molécules, SynCAM et la β -neurexine, peuvent interagir avec la protéine CASK par leur domaine PDZ. CASK interagit avec des protéines adaptatrice de la zone active, Veli et Mint, et des canaux calciques de type N, et cette voie est un mécanisme possible de la différenciation pré-synaptique observée. Cependant, on n'a pas encore déterminé le rôle de ces protéines *in vivo*, et le mécanisme cellulaire de la différenciation qu'elles induisent.

Si on mute les trois gènes de la neurexine (*cfIb*), on n'empêche pas la formation de synapses (Missler et al., 2003). Cette molécule semble nécessaire à l'exocytose de neurotransmetteur dépendante du calcium et pas à la formation des synapses. Une étude de souris knock-out pour trois gènes codant pour la neuroligine (le quatrième n'étant pas exprimé à cette étape du développement) montrent que leur délétion entraîne des défauts importants de transmission synaptique, mais n'altère pas les contacts synaptiques eux-mêmes (Varoqueaux et al., 2006). SynCAM, quant à lui, ne peut pas coder l'asymétrie de la jonction synaptique. La découverte récente de ces deux couples de molécules d'adhésion est une avancée considérable pour la compréhension de la formation des synapses, mais ne résout pas toutes les questions : ces molécules sont

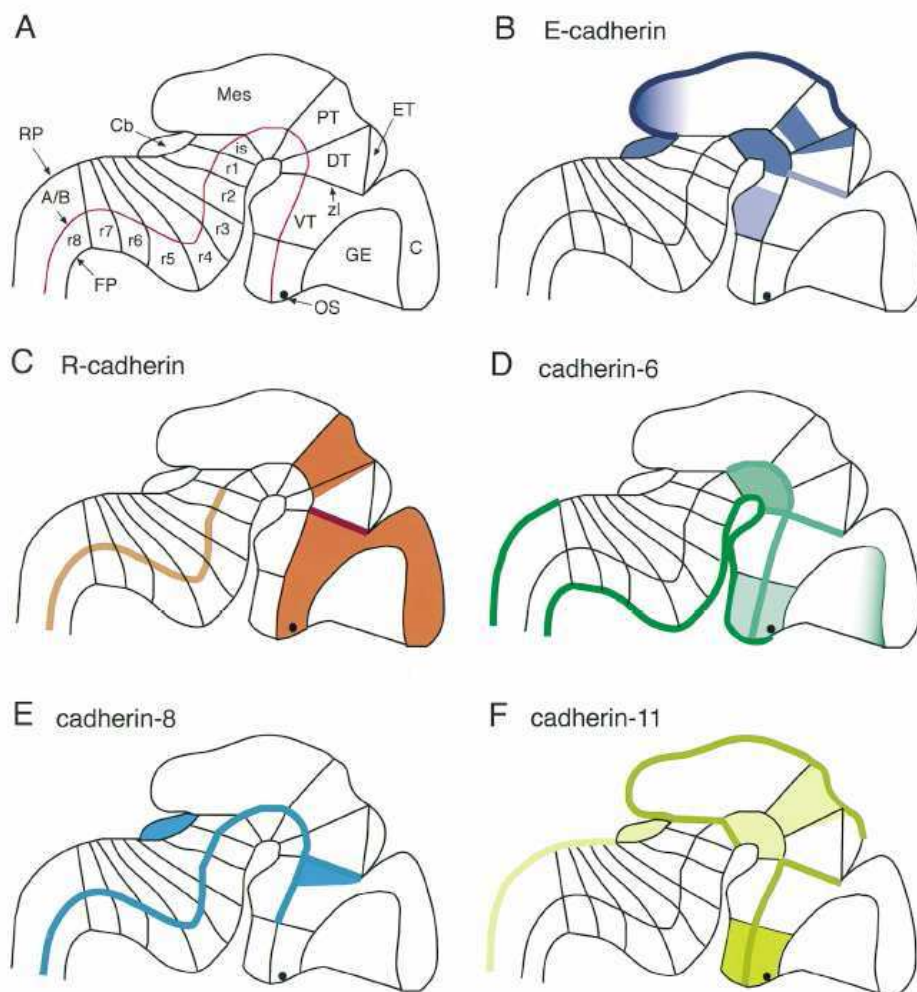
suffisantes à la formation de synapse, mais il semble exister des mécanismes de synaptogenèse indépendants de celles-ci.

Rôle possible d'autres protéines d'adhésion

Au-delà d'une activité synaptogène directe, les molécules d'adhésion sont de bons candidats pour coder la spécificité des contacts, permettre la maturation et la sélection des synapses, et potentialiser des synapses immatures. Activées à la synapse, elles possèdent la capacité intéressante de déclencher un signal bidirectionnel.

Les protéines d'adhésion qui n'ont pas un effet synaptogène au sens strict pourraient stabiliser des contacts dynamiques entre axone et dendrite par la spécificité et l'affinité préférentielle de l'interaction qu'elles forment avec leurs partenaires. Cette stabilisation durerait assez longtemps pour permettre, s'il est possible, le recrutement des composants synaptiques selon la séquence précédemment évoquée.

III.B- Place de la N-cadhérine dans ce processus



Zones de l'expression de cinq cadhérines dans le cerveau de souris embryonnaires à 12.5 jours.

A A/B, frontière lame alaire/plaque basale; C, cortex cérébral; Cb, cervelet; DT, thalamus dorsal; ET, épithalamus; FP, floor plate; GE, éminence ganglionnaire; is, isthme de l'encéphale; Mes, mésencéphale; OS, nerf optique; PT, aires prétectales; r1-r8, rhombomères 1-8; RP, toit de l'encéphale; VT, thalamus ventral; et z1, frontière intrathalamique. **B-F** Les aires colorées représentent une expression à partir du ventricule. Les lignes représentent une expression dans une zone frontière. La N-cadhérine, quant à elle, est exprimée partout dans le cerveau (Hatta et al., 1987).

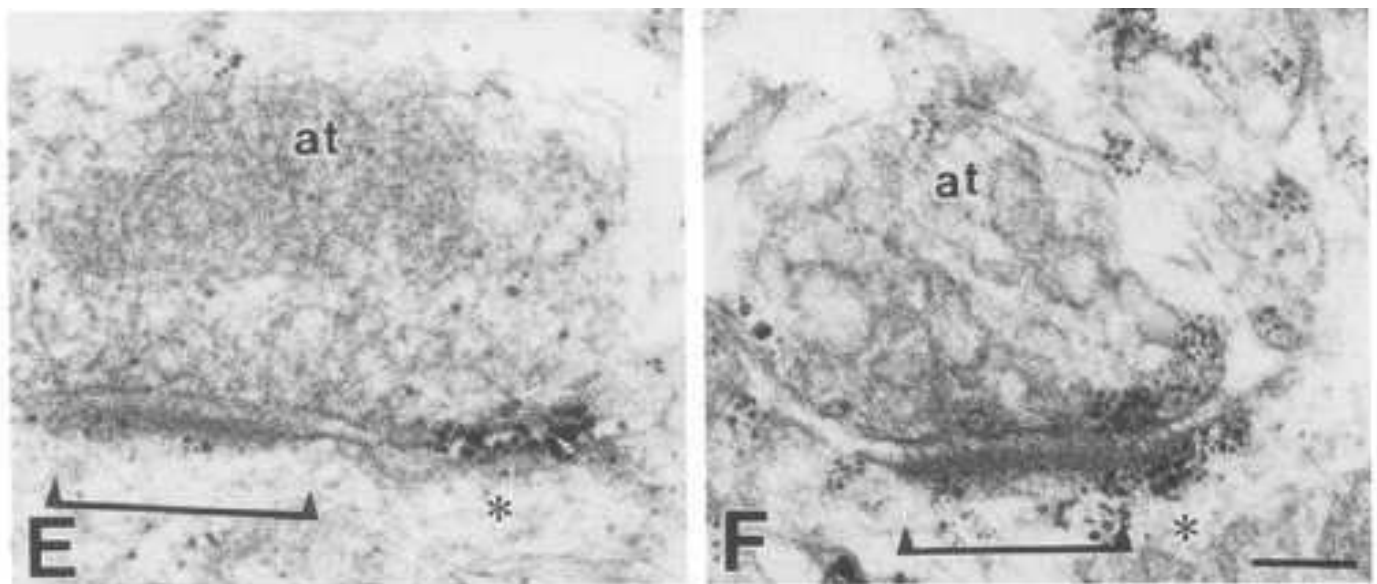
Tiré de Redies *et al.*, 1996
Developmental Biology

Figure 23

Une des difficultés pour définir le rôle de la N-cadhérine dans la synaptogenèse vient de ce que cette protéine est impliquée dans de nombreux processus du développement neuronal, depuis la neuritogenèse jusqu'à la plasticité synaptique en passant par la morphogenèse des épines et la migration cellulaire ((Radice et al., 1997), (Wizenmann and Lumsden, 1997)).

III.B.1- Localisation de la N-cadhérine

On a déjà évoqué le fait que cette molécule, parmi les autres cadhérines, est spécifique de certaines sous-populations de neurones, et ceci à partir de phases très précoces du développement du SNC. On sait que différents types de cadhérines sont exprimés par des tissus différents dans l'organisme ((Takeichi, 1991), (Gotz et al., 1996)) et jouent un rôle prépondérant dans la morphogenèse ((Takeichi, 1995), (Hayashi and Carthew, 2004)). De la même façon, elles semblent impliquées au niveau structural dans la morphogenèse du cerveau ((Redies and Takeichi, 1996), (Tepass et al., 2000), fig. 23). La N-cadhérine est quant à elle exprimée dans le cerveau de façon plus générale ((Hatta et al., 1987), (Redies and Takeichi, 1996)).



Tiré de Uchida *et al.*, 1996
Journal of Cell Biology

Figure 24

Image en microscopie électronique d'une terminaison axonale (at) du système visuel du poulet

Localisation par immunomarquage avec des billes d'or de la N-cadhérine (E) et de l' α -caténine (F). On observe que le marquage (*) se situe à la périphérie de la zone synaptique (repérée par le segment horizontal). Barre = 200 nm.

Au niveau synaptique, il existe des preuves de la présence différentielle des différents types de cadhérines dans différents types de neurones et dans des synapses différentes d'un même neurone. La N-cadhérine est la première molécule d'adhésion observée à la synapse ((Yamagata et al., 1995), (Uchida et al., 1996)), mais d'autres cadhérines l'ont aussi été, et ceci de façon spécifique de sous-populations de

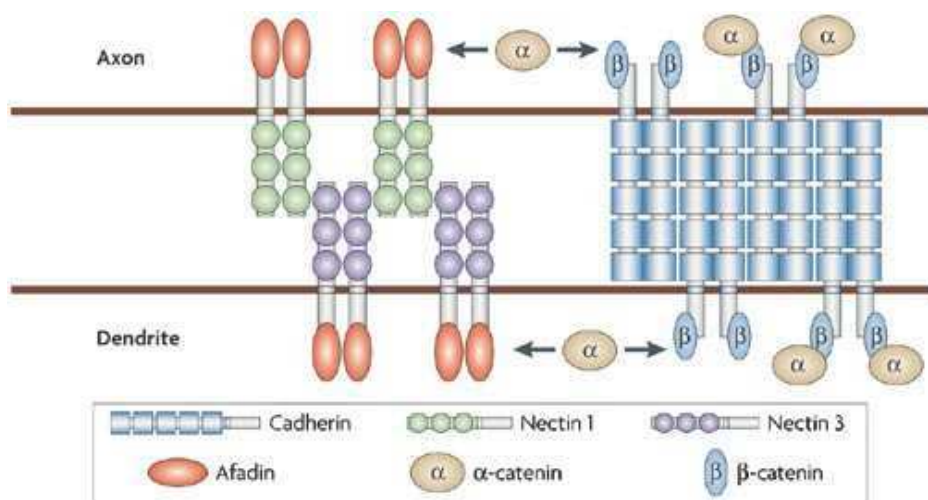
neurones ((Fannon and Colman, 1996), (Redies et al., 2000), (Bekirov et al., 2002), (Gil et al., 2002)). Par exemple, les cadhérine-11 et -12 ont récemment été identifiées par un criblage par ARNi comme des régulateurs importants de la synapse (Paradis et al., 2007). On trouve la N-cadhérine aux sites de contacts axo-dendritique où elle s'accumule ((Benson and Tanaka, 1998), (Togashi et al., 2002), (Jontes et al., 2004)) et pourrait stabiliser le contact établi. La molécule est aussi localisée, dans les synapses immatures, directement au niveau de la synapse (Jontes et al., 2004), en position pré et post synaptique (Salinas and Price, 2005), et au cours de la maturation de la synapse on la trouve plus fréquemment à la périphérie (zone péri ou juxta-synaptique) ((Uchida et al., 1996), (Bruses, 2000), (Benson et al., 2001), (Takai and Nakanishi, 2003), fig. 24). Ces zones riches en actine sont baptisées *puncta adhaerentia* en référence aux jonctions adhérentes riches en cadhérines (Spacek and Harris, 1998).

III.B.2- Un acteur important, mais dispensable, de la formation des synapses

Si ces caractéristiques concernant la localisation et la diversité des cadhérines en font de bons candidats pour coder la spécificité synaptique (ciblage), et pour être impliqués dans les étapes précoces de la synaptogenèse, des études récentes ont apporté des preuves directes d'un rôle de la N-cadhérine dans l'établissement de contacts synaptiques spécifiques (Benson et al., 2001) : ciblage des axones de la rétine des vertébrés et des photorécepteurs de la drosophile ((Inoue and Sanes, 1997), (Lee et al., 2001), (Prakash et al., 2005)), spécificité des afférences thalamiques au cortex (Poskanzer et al., 2003), connectivité au cortex somato-sensoriel (Huntley and Benson, 1999). Mais cette implication n'est pas générale, et on a peu de preuves d'un rôle synaptogène *sensu stricto* de la protéine. Les neurones cocultivés avec des cellules HEK transfectées avec la N-cadhérine ne forment pas avec elles de synapses (Sara et al., 2005). En outre, dans le tectum optique en développement chez le poulet, l'introduction d'anticorps bloquants la N-cadhérine entraîne une synaptogenèse anormale, mais la formation de synapses n'est pas inhibée (Inoue and Sanes, 1997). De même, dans l'hippocampe, la surexpression d'un mutant dominant négatif de la molécule n'empêche pas la formation de synapse (Togashi et al., 2002), mais les synapses résultantes montrent une machinerie de sécrétion altérée (Bozdagi et al., 2004). La N-cadhérine pourrait donc agir en coopérant avec d'autres molécules possédant un caractère synaptogène plus affirmé (comme SynCam ou neurexine/neurologine, cf IIIa). Il semble par exemple que la β -caténine puisse interagir avec la neurologine par S-SCAM, une protéine d'échafaudage post-synaptique (Iida et al., 2004).

Il faut noter que la sensibilité des synapses à l'adhésivité dépendante de la N-cadhérine et à l'intégrité du réseau d'actine décroît avec la maturité des synapses. Sous l'effet de la latrunculine A, agent pharmacologique qui désorganise le réseau d'actine, une synapse immature sera éliminée alors qu'une

synapse mature sera maintenue (Zhang and Benson, 2001). D'autres molécules participent donc au maintien de la structure synaptique.



Coopération entre les systèmes adhésifs nectine et cadherine pour l'établissement des contacts synaptiques

La nectine 1, préférentiellement axonale, interagit avec la nectine 3, localisée aux dendrites, qui à son tour favorise le recrutement des cadhérines au site synaptique. Cette interaction se fait à travers une liaison entre l'afadine, associée au complexe nectine, et l' α -caténine, associée au complexe cadherine.

Figure 25

Tiré de Takeichi, 2006
Nature Reviews Neuroscience

L'une des protéines membranaires avec laquelle la cadherine interagit préférentiellement est la nectine, et notamment les deux isoformes nectine-1 et nectine-3 (Togashi et al., 2006). Les deux protéines montrent une colocalisation partielle aux jonctions adhérentes pérисynaptiques, notamment dans l'hippocampe. Elles entretiennent toutes deux d'étroites relations avec le cytosquelette d'actine. Plusieurs expériences soulignent le lien entre nectine, cadherine et morphologie des synapses. Le blocage partiel de la fonction de la nectine-1 entraîne une réduction de la taille des synapses et une augmentation de leur nombre (Mizoguchi et al., 2002), et cet effet serait lié à l'interaction entre la nectine et la N-cadhérine. Une délétion de la nectine-1 ou de la nectine-3 donne lieu à des synapses restées immatures *in vivo* et une réduction du nombre de synapses *in vitro*, corrélée à une concentration moindre de β -caténine aux synapses. Une surexpression de la nectine induit une augmentation de l'expression de la N-cadhérine. La forte affinité de l'interaction hétérophile entre nectine-1 et nectine-3 (Fabre et al., 2002), et le lien entre cadherine et nectine, permettent d'envisager que cette interaction pourrait être l'initiatrice des contacts N-cadhérine aux synapses ((Takai and Nakanishi, 2003), (Hoshino et al., 2004)).

Comme déjà mentionné (cf Ib), il existe une interaction indirecte dans le cytoplasme entre deux partenaires privilégiés de ces protéines membranaires, l' α -caténine, et l'afadine, partenaire intracellulaire de la nectine qui possède un domaine PDZ (fig. 25). On sait de plus que la nectine peut, par l'activation d'une protéine G Ras et de l'afadine, agir sur la p120-caténine pour moduler l'adhésion homophile N-cadhérine ((Hoshino et al., 2005), (Sato et al., 2006)). Une telle interaction de la N-cadhérine avec la nectine, protéine préférentiellement hétérophile, pourrait lever la symétrie de la connexion N-cadhérine et permettre la reconnaissance de la nature des compartiments pré- et post-synaptique dans l'établissement du contact, la nectine-1 et la nectine-3 étant situées du côté présynaptique et du côté postsynaptique, respectivement (Takai and Nakanishi, 2003).

III.B.3- Rôle de la N-cadhérine dans la plasticité synaptique dépendante de l'activité

Induction de la plasticité des synapses jeunes

Si le rôle strictement synaptogène de la N-cadhérine n'a pas été confirmé, son implication dans le maintien mécanique et dans la plasticité des synapses est maintenant reconnue (Bozdagi et al., 2004).

Certaines synapses, notamment celles de l'hippocampe, sont formées au point de contact entre un axone et une protrusion émanant des dendrites, l'épine dendritique. Ces épines sont fortement plastiques et dynamiques, au moins pour les synapses les plus jeunes ((Matus, 2000), (Dunaevsky and Mason, 2003)), de sorte que la plasticité fonctionnelle peut résulter de leur plasticité morphologique. Or le système cadhérine/caténine régule la motilité des épines dendritiques, notamment par l'expression de son caractère adhésif et les régulations dont il est l'objet. Les cadhérines peuvent ainsi jouer un rôle de modulateurs de la plasticité des synapses (Takeichi and Abe, 2005).

On a vu que l'expression d'un dominant négatif de la N-cadhérine, sans domaine extracellulaire, induit une modification de la morphologie des épines, qui sont allongées et ressemblent à des filopodes, et une inhibition de l'accumulation des vésicules synaptiques (Togashi et al., 2002). Par ailleurs, l'expression d'un mutant de l' α N-caténine ne provoque pas d'effet sur l'efficacité synaptique, mais seulement sur la plasticité morphologique de l'épine. La β -caténine, qui possède un site de liaison aux protéines à domaine PDZ, est un bon candidat pour expliquer l'effet du dominant négatif N-cadhérine sur la synapse. Une étude portant sur un mutant où la β -caténine n'est spécifiquement plus exprimée dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe montre que cette suppression de la β -caténine entraîne une augmentation du nombre de synapses mais, dans chaque synapse, une diminution du nombre de vésicules synaptiques (Bamji et al., 2003). On sait que, déphosphorylée, la β -caténine s'enrichit aux épines dendritiques en même temps qu'augmente son interaction avec la N-cadhérine ((Murase et al., 2002), (Roura et al., 1999)). Ces données suggèrent que la β -caténine peut être l'acteur de la régulation du réservoir de vésicules synaptiques au contact. L' α N-caténine, quant à elle, joue un rôle dans la stabilisation des contacts par une diminution de la plasticité des épines (Abe et al., 2004). Les protéines G Rho, stimulées par l'adhésion N-cadhérine, ont un effet similaire de stabilisation des épines, vraisemblablement en régulant l'interaction entre l' α N-caténine et l'actine (Tashiro and Yuste, 2004).

Induction dépendante de l'activité de la plasticité des synapses matures

Ces effets de plasticité dépendants de la N-cadhérine ne se limitent pas aux synapses jeunes, même si la mobilité des épines dendritiques décroît beaucoup avec leur maturité (Dunaevsky et al., 1999), car leur stabilisation est modulable et partiellement réversible, notamment en fonction de la stimulation des

récepteurs aux neurotransmetteurs ((Fischer et al., 2000), (Engert and Bonhoeffer, 1999), (Maletic-Savatic et al., 1999)). Si dans les premiers temps de la synaptogenèse, on trouve la N-cadhérine associée à la plupart des synapses, elle est dans un deuxième temps relocalisée dans une sous-population de synapses excitatrices (Benson and Tanaka, 1998), ce qui pourrait correspondre à deux fonctionnements distincts du complexe cadhérine (Rubio et al., 2005). Dans les étapes plus tardives du développement synaptique, le rôle du complexe cadhérine dans la plasticité morphologique et fonctionnelle des synapses est régulé par l'activité du neurone.

La N-cadhérine est impliquée dans l'augmentation de la taille des épines stimulée par l'activité du neurone (Okamura et al., 2004). On observe également une modification dépendante de l'activité de la localisation de la N-cadhérine dans les neurones, ainsi que une modification de son affinité (Tanaka et al., 2000). Une des explications possibles de ces processus est la dimérisation de la N-cadhérine sous une forme plus affine et résistante aux protéases, suite à la dépolarisation des neurones.

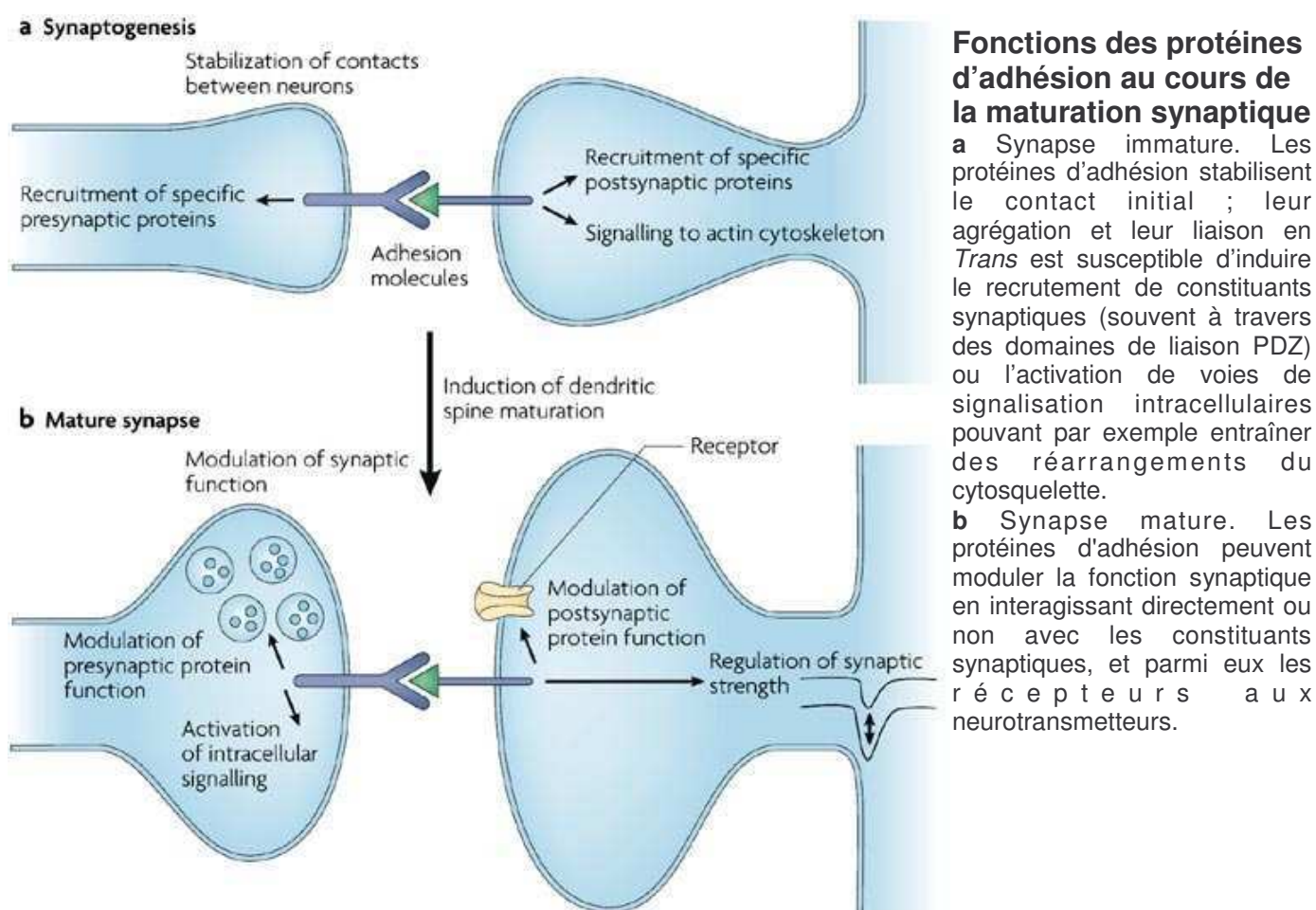
La dépolarisation des neurones entraîne une accumulation de β -caténine aux épines par un mécanisme de déphosphorylation de la protéine. Chez un mutant où la β -caténine est constitutivement déphosphorylée, on observe des agrégats de PSD-95 et de vésicules synaptiques plus gros à la synapse, indiquant que la présence de β -caténine induit un recrutement plus important des constituants synaptiques, de façon directe ou indirecte (Murase et al., 2002). D'autre part, suite à un blocage de la transmission synaptique par TTX (toxine tétanique), on observe parallèlement un départ de l' α N-caténine des synapses et une régression des synapses en filopodes ((Papa and Segal, 1996), (Abe et al., 2004)). A l'inverse, l'altération de l'activité synaptique inhibitrice entraîne une accumulation de N-cadhérine et de ses partenaires caténines à la synapse.

L'induction de la LTP dans des tranches d'hippocampe en culture est corrélée avec une augmentation du recrutement de N-cadhérine aux épines (Bozdagi et al., 2000). L'application d'un anticorps bloquant de la N-cadhérine empêche l'induction de LTP, et cet effet est annulé quand on augmente la concentration de calcium extracellulaire (Tang et al., 1998). La baisse de calcium extracellulaire entraînée par la stimulation prolongée de la LTP est donc suffisante pour fragiliser les liens N-cadhérine, pourtant nécessaire au renforcement de la synapse. Ces études sont enrichies par des données *in vivo*, puisqu'un animal présentant une mutation de l' α N-caténine, *cdf*, possède des défauts de réflexe conditionné, processus reposant sur la mise en place de la LTP (Park et al., 2002).

Il apparaît clair, grâce à ces nombreuses études, que l'activité neuronale régule l'adhésion cadhérine et la plasticité structurelle des contacts synaptiques, processus qui sont déterminants dans la mise en place des phénomènes de LTP. Si plusieurs processus pourraient être en jeu (phosphorylation de la β -caténine, régulation de l' α -caténine, baisse de la concentration calcique extracellulaire,...), le mécanisme précis de cette régulation n'est pas encore bien établi.

Nécessité d'un lien entre structure synaptique et fonction

On peut cependant se demander dans quelle mesure les mécanismes de plasticité synaptique et de synaptogenèse sont similaires (fig. 26). Cette notion mérite d'être examinée, puisque la formation et le renforcement de la synapse passent tous les deux par un recrutement de la machinerie d'exocytose au niveau de la terminaison synaptique, ainsi que de récepteurs aux neurotransmetteurs et de protéines d'échafaudage du côté post-synaptique. Cependant, l'intervention de la N-cadhérine dans les processus de LTP n'implique pas que cette protéine soit nécessaire à la formation des synapses. De même, les études ont souvent mis en lumière une action de la cadhérine dépendante de l'activité, alors qu'il semble que le mécanisme de formation de synapse en soit indépendant, du moins dans la mise en place précoce des synapses (Verhage et al., 2000).



Tiré de Dalva *et al.*, 2007
Nature Reviews | Neuroscience

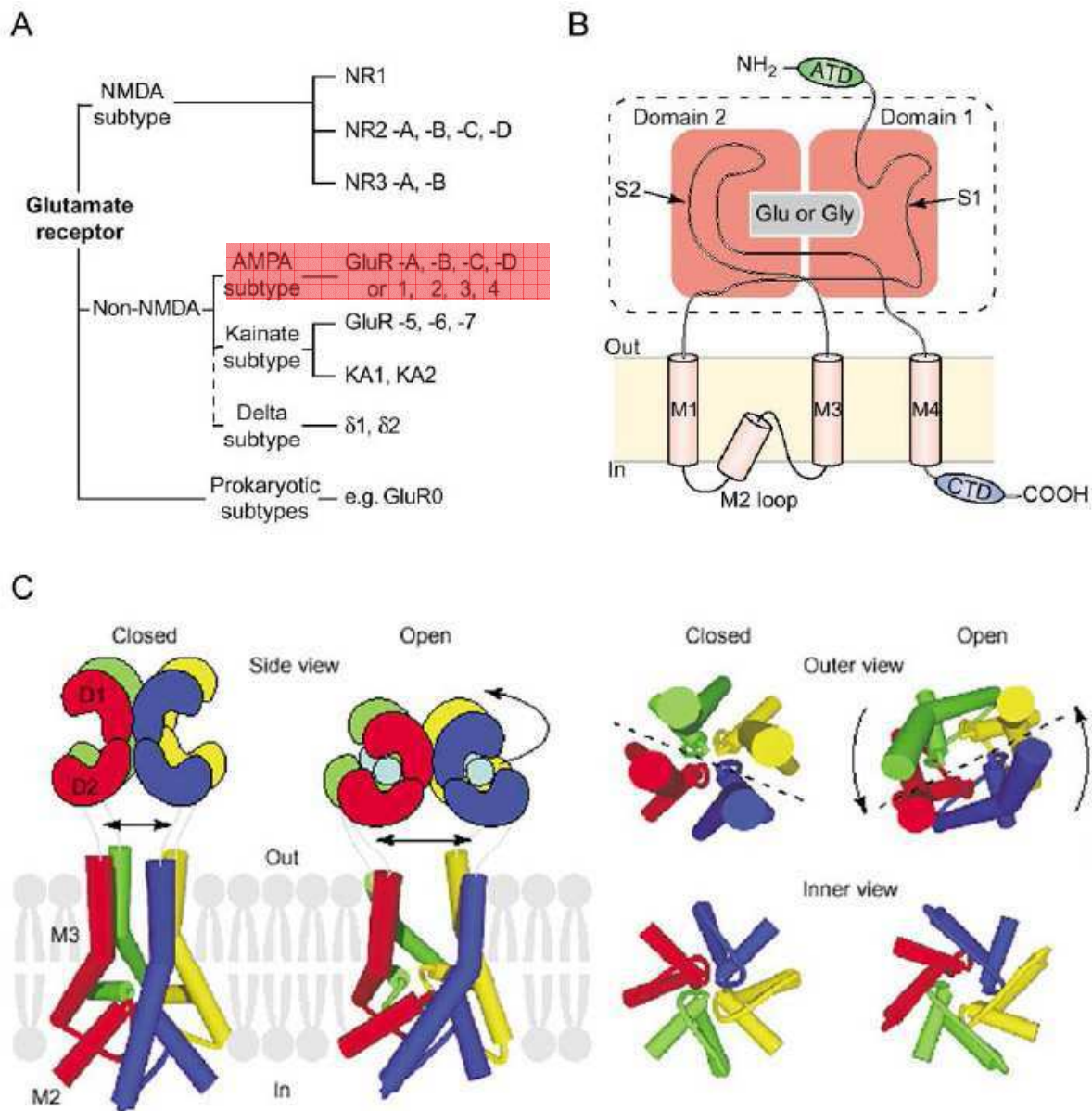
Figure 26

Le lien entre plasticité morphologique des épines et plasticité fonctionnelle des synapses est bien documenté ((Takumi et al., 1999), (Matsuzaki et al., 2001), (Matsuzaki et al., 2004)), cependant on comprend encore mal quel rôle joue la N-cadhérine à l'interface de ces deux processus.

Pour confirmer une implication de la N-cadhérine dans la formation et la maturation de la synapse, il faut déterminer un mécanisme moléculaire par lequel elle pourrait recruter ou réguler la fonction des

constituants synaptiques au contact axone-dendrite. Dans le paragraphe suivant seront exposés les travaux ayant révélé une interaction (directe ou non) entre la N-cadhérine et un constituant synaptique, en particulier une sous-unité des récepteurs aux neurotransmetteurs.

III.B.4- Relation entre la N-cadhérine et des récepteurs aux neurotransmetteurs



Structure des récepteurs ionotropes au glutamate

A Diagramme des différentes familles de récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR). **B** Représentation schématique d'une sous-unité des iGluR dans la membrane plasmique. **C** Représentation en trois dimensions des hélices formant le pore des iGluR, M2 "p-loop" et M3. Le changement de conformation des domaines S1 et S2 lors de la fixation du glutamate écarte les extrémités des hélices M3 et provoque une rotation des segments transmembranaires de chaque sous-unité. D'après (Wollmuth and Sobolevsky, 2004) et sur internet : <http://www.123bio.net/revues/kainate/13d.html>, page créée par F. Jakolski.

Figure 27

Pour détailler ces relations, il faut évoquer la structure moléculaire des récepteurs au glutamate de type AMPA. Comme les autres récepteurs ionotropes au glutamate, ils sont constitués d'une combinaison de

quatre sous-unités GluR1 à GluR4, chacune d'environ 100 kDa et possédant un domaine extracellulaire liant le glutamate constitués de deux fragments non consécutifs de la protéine, 3 hélices transmembranaires et un domaine cytoplasmique de quelques kDa (fig. 27, (Wollmuth and Sobolevsky, 2004)). La majorité des récepteurs AMPA est composée d'une combinaison de la sous-unité GluR2 avec une sous-unité GluR1 ou GluR3, la sous-unité GluR4 étant exprimée dans des populations cellulaires spécifiques.

Relation moléculaire indirecte

- par la β -caténine

Comme mentionné ci-dessus, il a été montré que la β -caténine peut établir des interactions avec des constituants pré et post synaptiques. Selon une étude utilisant une délétion conditionnelle de la protéine spécifiquement dans l'hippocampe, la β -caténine possède à son extrémité carboxyterminale un site accepteur d'un domaine PDZ (Bamji et al., 2003) qui régule la localisation des vésicules synaptiques. Notons que la N-cadhérine est une composante des PTV (Piccolo-Bassoon Transport Vesicles), recrutées de façon précoce dans le développement des synapses (Zhai et al., 2001).

La β -caténine pourrait également être impliquée dans le recrutement de constituants post-synaptiques. Son domaine PDZ interagit avec Lin-7, l'homologue chez les mammifères de Veli chez la drosophile, qui pourrait former un complexe d'échafaudage synaptique avec CASK et Mint1 (Perego et al., 2000), protéines connues pour leurs liaisons privilégiées à certains récepteurs aux neurotransmetteurs, notamment les NMDAR (Setou et al., 2000).

On sait également, par des études en immunoprécipitation, que la β -caténine peut interagir avec la sous-unité GluR6 des récepteurs au glutamate de type kainate (Coussen et al., 2002). Une interaction indirecte a été mise en évidence entre la β -caténine et la partie carboxyterminale (14 derniers acides aminés) de GluR6, à l'aide d'une souris transgénique exprimant GluR6-myc. Si GluR6-myc est recruté aux contacts adhésifs N-cadhérine, dans le sens inverse, par contre, une agrégation de la molécule par des billes anti-myc ne permet pas le recrutement de la β -caténine, suggérant que le complexe cadhérine recrute GluR6 aux synapses. Cette hypothèse n'a cependant pas été confirmée.

La β -caténine peut également interagir indirectement, par la S-SCAM/MAGI-2, avec les récepteurs au glutamate : les AMPAR par la stargazine (Deng et al., 2006), et les NMDAR (Sumita et al., 2007). Le complexe cadhérine et S-SCAM semblent en tout cas être colocalisés (Yamada et al., 2003).

- par la δ -caténine

La δ -caténine/N-PRAP, membre de la famille de p120 et partenaire de la cadhérine spécifique des

neurones, peut former un complexe stable avec la PSD-95 et certaines sous-unités des récepteurs aux neurotransmetteurs (mGluR1 α , NR2A) (Jones et al., 2002). Il faut cependant noter que des expériences préliminaires effectuées au laboratoire ont montré que la δ -caténine n'était pas recrutée aux sites de contacts N-cadhérine induits par des billes sur des neurones d'hippocampe en culture.

La connaissance de toutes ces possibilités d'interaction n'a pas encore permis d'expliquer les mécanismes de différenciation post-synaptiques. C'est ainsi que plusieurs groupes ont cherché comment la N-cadhérine pouvait réguler ces mécanismes d'une autre manière.

- au sein de complexes multiprotéiques

L'étude des complexes synaptiques multiprotéiques permet d'élargir le nombre des protéines synaptiques avec lesquelles la N-cadhérine pourrait interagir. Une analyse protéomique par immunoblot a permis de trouver la N-cadhérine dans un complexe multiprotéique associé aux récepteurs NMDA (Husi et al., 2000), en même temps que les récepteurs métabotropes au glutamate, les récepteurs kainate et L1, mais pas le récepteur de type AMPA.

Relation fonctionnelle indirecte (via la δ -caténine, des protéases, la protéine AKAP ou LAR-RPTP)

Sur un plan plus fonctionnel, plusieurs relations indirectes entre la cadhérine et les récepteurs au glutamate ont été établies. Certaines expériences montrent que la δ -caténine pourrait être le médiateur de la régulation de l'adhésion cadhérine par les récepteurs NMDA (Jones et al., 2002). Une autre voie explorée est celle d'une activation par les NMDAR de protéases clivant la N-cadhérine, ADAM10 et la γ -secrétase dépendante de la préséniline-1. Cette activation pourrait avoir un rôle dans la plasticité synaptique, car le produit intracellulaire du clivage de la cadhérine, CTF2, réprime la transcription par les CREB (c-AMP response element binding protein), et module les courants AMPA ((Marambaud et al., 2003), (Uemura et al., 2006)). Une autre protéine qui pourrait faire le lien entre le complexe adhésif cadhérine et les récepteurs au glutamate est la A-kinase-anchoring protein (AKAP) 79/150 (Gorski et al., 2005). Cette protéine, liée aux AMPAR et aux NMDAR par des protéines d'échafaudage de type MAGUK, peut changer de localisation selon l'activité synaptique, se liant plus ou moins au complexe cadhérine (Dell'Acqua et al., 2006), et pourrait ainsi jouer un rôle dans la coordination entre plasticité morphologique et fonctionnelle.

Une autre étude montre une implication des LAR-RPTP, protéines membranaires qui jouent un rôle dans le guidage axonal (Johnson et al., 2001), dans le contrôle de la morphogénèse synaptique. LAR-RPTP déphosphoryle la liprine- α et semble réguler simultanément l'adressage aux synapses du complexe adhésif N-cadhérine et des AMPAR, qui seraient associés à GRIP et la liprine- α (Dunah et al., 2005). La liprine- α ,

protéine à domaine PDZ, est le substrat de déphosphorylation privilégié de LAR-RPTP (Serra-Pages et al., 1998), et se lie à GRIP (Wyszynski et al., 2002), protéine de l'échafaudage synaptique associée aux AMPAR (Dong et al., 1997). On sait par ailleurs que LAR-RPTP interagit avec le complexe N-cadhérine et pourrait réguler l'adhésion cellulaire par la déphosphorylation de la β -caténine ((Kypta et al., 1996), (Roura et al., 1999)) et sa translocation subséquente aux épines dendritiques (Murase et al., 2002).

Les auteurs font l'hypothèse que les AMPAR et le complexe d'adhésion N-cadhérine, associés aux protéines d'échafaudage GRIP et liprine- α sont adressés dans un même complexe aux contacts synaptiques, LAR-RPTP n'étant pas le médiateur de leur interaction mais le régulateur de leur expression localisée aux synapses. Cependant les auteurs ne détaillent pas quels liens moléculaires existent entre ces protéines.

Ces études présentent des preuves de relations indirectes entre N-cadhérine et récepteurs au glutamate. Mais il peut exister également une relation plus directe entre les deux systèmes.

Relation fonctionnelle directe avec les AMPAR

D'après une étude menée dans l'équipe de Haganir, la N-cadhérine régulerait le trafic intracellulaire du récepteur AMPA (Nuriya and Haganir, 2006). Les auteurs montrent que les sous-unités GluR1-4 co-précipitent avec la N-cadhérine et la β -caténine. Quand GluR1 et N-cadhérine sont transfectés dans des cellules hétérologues, ils sont également associés, et interagissent en *Cis* par un domaine qui ne semble pas situé dans le domaine cytoplasmique de la molécule GluR1. Cette interaction est renforcée par une baisse de la concentration extracellulaire de calcium, suggérant que les sites d'interaction N-cadhérine/N-cadhérine et N-cadhérine/GluR pourraient être les mêmes et seraient à l'origine d'une compétition. La déplétion en calcium empêchant l'interaction homophile pourrait augmenter la capacité de la N-cadhérine à lier GluR1.

Les auteurs observent une colocalisation assez peu précise de GluR1 avec N-cadhérine aux synapses. La surexpression de N-cadhérine et de son dominant négatif sans domaine extracellulaire modifie (respectivement augmente et diminue) l'expression de surface de GluR1 dans des cellules hétérologues et des neurones. Cependant le mécanisme moléculaire de la régulation du trafic des AMPAR n'est pas décrit. Si le dominant négatif de N-cadhérine diminue effectivement l'expression de surface de GluR1, il doit entrer en compétition avec une molécule endogène (probablement N-cadhérine) dans une voie de signalisation aboutissant à l'adressage de GluR1 à la surface, mais cette voie n'est pas précisément explicitée. Notons que les auteurs ont également testé l'effet réciproque : la co-expression de GluR1 semble augmenter l'expression de surface de N-cadhérine dans des cellules hétérologues. Ainsi les deux molécules semblent réguler mutuellement leur expression de surface.

Les auteurs précisent que cette liaison fonctionnelle entre les deux molécules doit être indépendante de celles que peut entretenir la N-cadhérine avec d'autres composants post-synaptiques, et semble jouer un rôle particulier pour les récepteurs de type AMPA, dont on a déjà évoqué la spécificité (cf IIIa). Ils n'argumentent pas cependant une éventuelle spécificité à une sous-unité particulière de ce récepteur. Un

Place de la N-cadhérine dans les processus menant à la formation et à la plasticité des synapses (fig. 28, page précédente)

Les segments signalent des relations entre molécules appartenant à des complexes établis, les flèches doubles signalent les interactions plus ou moins bien documentées (respectivement en trait pleins ou pointillés), les flèches simples signalent des actions sur une protéine ou un processus, plus ou moins bien documentées (respectivement en trait pleins ou pointillés). La flèche double rouge signale l'interaction que nous étudions particulièrement.

Dans une étude initiée dans l'équipe de Morgan Sheng, l'équipe de Maria Passafaro a montré que l'expression de la sous-unité GluR2 des AMPAR régulaient la taille et la densité et des épines dendritiques (Passafaro et al., 2003). Cet effet est dépendant du domaine aminoterminal extracellulaire de la molécule. Il avait été montré précédemment (Passafaro et al., 2001) que GluR2 subit une exocytose vers les synapses de façon plus rapide et plus dirigée que GluR1, impliquant une régulation qui lui était spécifique. Des expériences de biochimie récentes ont révélé l'existence d'un lien extracellulaire entre le domaine aminoterminal de GluR2 et le domaine extracellulaire de la N-cadhérine (Saglietti et al., 2003, Article II). Au vu de ces données nouvelles et de l'article précédemment cité (Dunah et al., 2005) on peut se demander si ce n'est pas par une interaction extracellulaire directe que la N-cadhérine pourrait prendre part au complexe GluR2/GRIP/liprine- α , GluR1 pourrait n'y être associé qu'en raison de sa liaison à GluR2. Si les relations entre les protéines actrices de la formation de la synapse restent mal comprises, comme le montre la diversité et la dispersion des études exposées dans ce chapitre, on peut tenter de rassembler les conclusions des travaux cherchant à préciser la place de la N-cadhérine dans ce processus dans un modèle préliminaire (fig. 28).

Si le rôle de la N-cadhérine dans la plasticité morphologique du neurone est établi, ces données contradictoires montrent que son rôle dans la plasticité fonctionnelle de la synapse, dans la modulation du recrutement de molécules et de la conduction synaptique, reste à élucider. Les études mentionnées sont souvent menées dans un système particulier (*in vivo* ou *in vitro*, organisme, région du système nerveux, type de neurone, synapse différents), et aucune donnée ne nous indique que les synapses se forment toutes de la même façon, même si des tentatives d'établissement d'une vision au moins partiellement unifiée existent (Rollenhagen and Lubke, 2006). Le but de ce travail est d'améliorer la compréhension de la maturation synaptique dans l'hippocampe de mammifères, en s'intéressant aux synapses glutamatergiques excitatrices plus particulièrement. Il semble que dans ce système, la N-cadhérine joue un rôle primordial, et dans ce cadre, nous avons choisi de collaborer avec l'équipe de Maria Passafaro pour approfondir l'étude de l'interaction fonctionnelle entre la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA au glutamate et la N-cadhérine.

MATERIELS ET METHODES

Sont reportées ici les techniques utilisées et les réactifs produits par moi-même. (*) signale un détail explicite dans l'article, par exemple un élément produit hors du laboratoire.

Cultures cellulaires

Cultures de neurones

Au cours de cette étude, j'ai utilisé des neurones d'hippocampe en culture obtenus à partir de dissections d'embryons de rat Sprague-Dawley effectuées par plusieurs ingénieurs du laboratoire : C. Breillat, D. Bouchet-Tessier, B. Tessier, à 18 jours de développement fœtal (E18) (fig. 29). Après trituration ils sont déposés avec une densité de 10 000 cellules par cm² sur des lamelles de verres de 15 ou 18 mm de diamètre recouvertes de polylysine, et ces lamelles sont retournées sur une couche de cellules gliales et incubées dans du milieu neurobasal supplémenté avec du B27 et du Glutamax (Invitrogen; (Hemar et al., 1997), (Banker and Goslin, 1988)).

Transfections

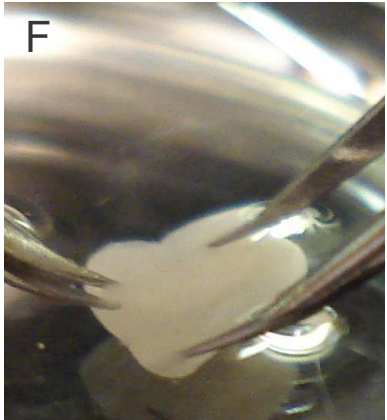
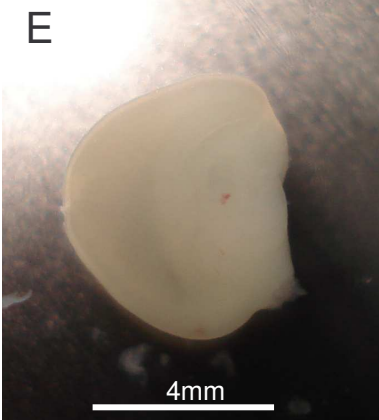
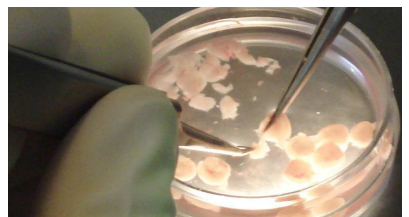
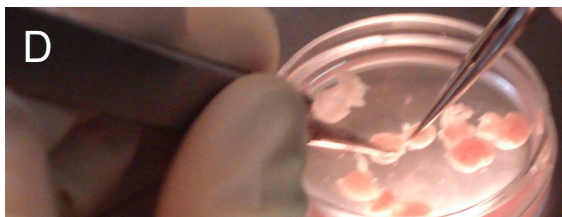
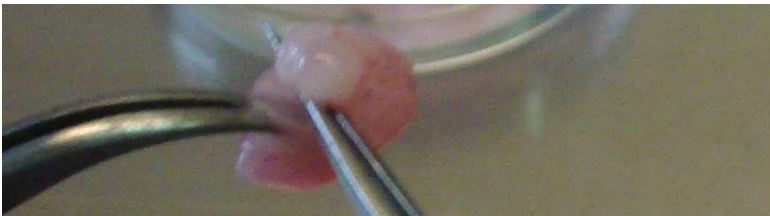
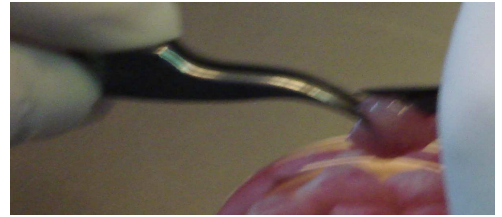
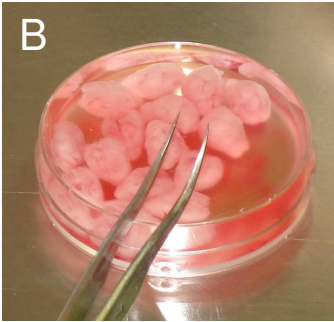
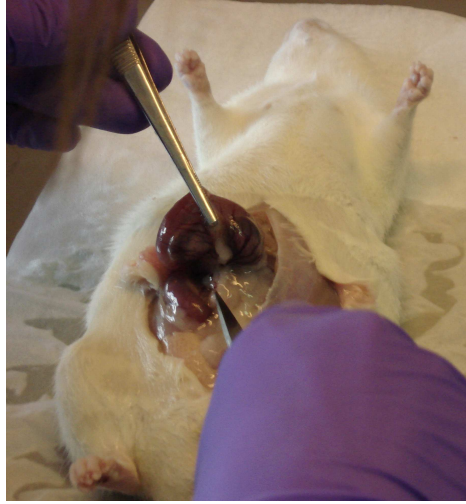
Transfection par la technique du phosphate de calcium.

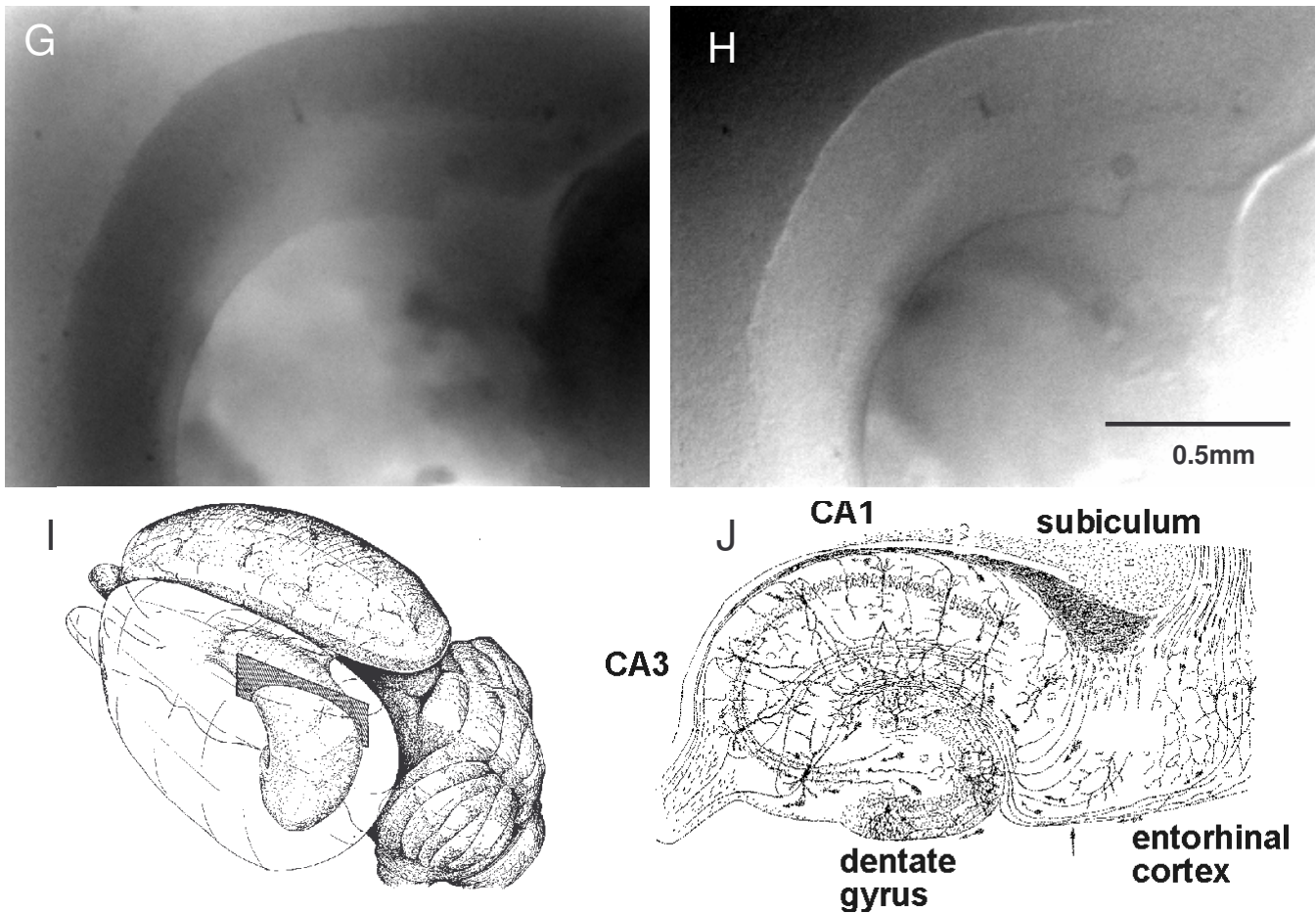
On utilise cette technique pour transférer des neurones jeunes de rat (DIV2-DIV6 en culture) (xia96), car ils sont moins fragiles que les neurones cultivés depuis plus longtemps.

Pour transférer 5 lamelles de 15 mm de diamètre on utilise 30 µg de plasmide dilué dans de l'eau stérile q.s.p. 225µl. On ajoute 25 µl de CaCl₂ 2.5 M. On ajoute ce mélange goutte à goutte à 250µl de HBS 2X, sous vortex, puis on laisse incuber le tout 25 min. La solution contenant le précipité de phosphate de calcium contenant l'ADN est alors ajoutée au milieu dans lequel sont incubées les lamelles de neurones retournées. On laisse le précipité sédimenter pendant 1 heure, puis on effectue un choc osmotique pendant 1 min. avec une solution de glycérol 5% dans HBS 1X. Enfin, on rince 3 fois les lamelles avec du milieu neurobasal, puis on retourne les lamelles sur les glias (cellules vers le bas).

Transfection de neurones âgés de rat (DIV5-DIV15)

Pour transférer ces neurones, on utilise le kit de transfection à l'Effecten (Qiagen). On prépare la solution d'ADN : pour transférer 5 lamelles de 15 mm de diamètre on utilise 1 µg de plasmide (ou 1 µg par plasmide dans le cas d'une transfection multiple) dans 140 µl de tampon EC et 8 µl d'Enhancer par µg de plasmide. On mélange et on laisse incuber 5 minutes. On ajoute alors 25 µl d'Effecten, on mélange et on laisse incuber 10 minutes. Après avoir retourné les lamelles (cellules vers le haut) dans une boîte de pétri





➔ Les hippocampes sont réunis et traités à trypsine pendant 15 min. Après trituration avec des pipettes de verre recouvertes de sérum, ils sont ensemencés sur des lamelles recouvertes de polylysine, qui sont ensuite retournées sur des gliés.

Etapes de la dissection d'hippocampes de rats à E18

A On sacrifie et on dissèque une ratte gestante, on prélève les embryons et on les décapite. **B** Les têtes sont décérébrées. **C** Un cerveau. **D** On dissocie les hémisphères et on enlève les méninges. **E** Un hémisphère observé par sa face interne. On remarque la forme en croissant de l'hippocampe. **F** Dissection et obtention de l'hippocampe. **G** et **H** Images en microscopie de l'hémisphère. Eclairage en transmission (**G**) ou par le côté (**H**), pour mettre en valeur le relief de la structure. **I** Schéma de l'hippocampe gauche dans le cerveau, vu à travers le cortex. **J** Structure de l'hippocampe dans le plan de coupe représenté en **I**. Photographies des dissections (D. Bouchet-Tessier, C. Breillat, B. Tessier) et images en microscopie effectuées au laboratoire. Source Internet pour les schémas **I** et **J** : <http://medweb.bham.ac.uk/neuroscience/jefferys/images/hippocampus.html>

Figure 29

contenant du milieu équilibré, on ajoute le mélange. On laisse les neurones incuber pendant une heure, après quoi on les retourne de nouveau dans leur boîte d'origine.

Transfection de cellules Cos7 ou HEK pour la production protéique

Pour transfecter ces cellules, on utilise la méthode au Fugene 6 (Roche).

La quantité d'ADN nécessaire a été établie en initiant une production à petite échelle (4ml de milieu) pour des Cos7 et des HEK à différents ensemencements (1500, 4500, 15000 ou 45000 cellules par ml) et différentes quantités d'ADN (0.25, 0.75, 1.5 µg par ml) transfectées un jour après ensemencement. Le meilleur système par la production de L1Fc s'est avéré être les cellules HEK ensemencées avec une densité

maximale (45000 cellules par ml) et transfectées avec une quantité importante d'ADN (1.5 µg par ml). Pour un flacon de 75 cm² (20ml), on utilise donc 30 µg d'ADN et 60 µl de Fugene. On dilue d'abord le fugene dans 1.5ml de PBS. Le Fugene est pipeté dans le PBS sans toucher le tube, et on mélange le tube par vortex. On dilue l'ADN dans 150µl de PBS, que l'on mélange par vortex également. On laisse les deux mélange reposer pendant 5 minutes, puis on ajoute le Fugen à l'ADN. Après mélange par vortex, on laisse reposer le tube obtenu pendant 15 minutes, puis on le vortex à nouveau avant de le déposer sur les cellules.

Biologie Moléculaire – Biochimie

Constructions

Sous-unités de récepteurs au neurotransmetteurs taggées

GluR2-YFP (-22aa), SEP-GluR2 (SEP : GFP super-écliptique): Constructions effectuées par C. Breillat au laboratoire

myc-GluR2, GFP-GluR2 : Constructions effectuées par F. Rossignol au laboratoire

myc-pDisplayR2, myc-pDisplayR1 : Constructions données par M. Passafaro (*)

NR1-Venus, NR2-Venus : Constructions données par J. Neyton (E.N.S. Paris)

Protéines d'adhésions taggées

L1-GFP: Construction effectuée par P. Alberts au sein de l'équipe de Thierry Galli (*)

L1ΔCter-GFP: Construction par L. Danglot au sein de l'équipe de Thierry Galli (*)

NrCAM-GFP : Construction effectuée par J. Falk au sein de l'équipe de G. Rougon (Marseille) (Falk et al., 2004)

Ncad-Dsred: Construction effectuée par Mireille Lambert ([article en soumission](#))

Ligands Fc

L1-HumanFc : Construction donnée par T. Brümmendorf (De Angelis et al., 1999)

N-cadhérine-HumanFc :

Le plasmide prep10hFc Ncadh ECD a été préparé en plusieurs étapes. On a d'abord cloné les extrémités C-terminale et N-terminale du fragment extracellulaire du cDNA de la N-cadhérine-GFP, séquence poulet, en utilisant les sites de restriction uniques BsrG1 (164) et Kpn1 (1275).

Le fragment N-terminal a été amplifié par PCR avec un oligonucléotide N-terminal permettant d'insérer un site de restriction BglII en amont de la séquence kozak et du codon départ : (5'-AGATCTCGCCTCCATGTGCCGG-3') et un oligonucléotide en aval du site de restriction BsrGI (5'-AACCTCACATTGAGCAGAGG-3'), ce qui correspond à un fragment de 207pb ; ce fragment a alors été

inséré dans un plasmide pGEM-T (Promega), avec BglIII plus proche du site de restriction NcoI.

Le fragment C-terminal a été amplifié par PCR avec un oligonucléotide en amont du site de restriction KpnI (5'-ATCAGCCACACACGCCTGCG-3') et un oligonucléotide C-terminal permettant d'insérer un site de restriction BglIII et un site donneur d'épissage AGGTAAGT (pour l'insertion future dans prep10) juste après de la limite entre le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire de la N-cadhérine (5'-AGATCTACTTACCTCGGTCAACATCAGTACAGTCC-3'), ce qui correspond à un fragment de 932pb ; ce fragment a alors été inséré dans un plasmide pGEM-T, avec KpnI plus proche du site de restriction NcoI. Le plasmide comportant le fragment N-terminal de la N-cadhérine a ensuite été digéré par BsrGI/NcoI, et le vecteur codant pour la N-cadhérine-GFP de poulet a été digéré par BsrGI/KpnI. Les deux produits de digestion ont migré sur un gel d'agarose (respectivement 200pb et 1116pb), les bandes correspondantes aux fragments du domaine extracellulaire de la N-cadhérine ont été coupées et purifiées à l'aide d'un kit Qiaex (Qiagen). Les fragments obtenus ont été mis en présence du plasmide pGEM-T comportant le fragment C-terminal du domaine extracellulaire de la N-cadhérine ouvert avec KpnI/NcoI, et ligués.

Le vecteur obtenu a alors été coupé par BglIII, et on a fait migrer le produit de digestion. Le fragment correspondant au domaine extracellulaire de la N-cadhérine (2167pb) a ensuite été purifié par Qiaex et mis en présence du vecteur prep10 HFc (vecteur prep10 d'Invitrogen, donné par Mireille Lambert) coupé par BamHI. Ces deux enzymes (BglIII et BamHI) génèrent des fragments avec le même bout collant, on a donc pu liguer le vecteur prep10 HFc au fragment de N-cadhérine.

Cadhérine11-HumanFc : Construction effectuée par V. Marthiens au sein de l'équipe de R.M. Mège (Institut du Fer à Moulin, Paris)

Production protéique

Production de L1-hFc

On a transfecté transitoirement des cellules HEK-293 (human embryonic kidney) dans quatre flacons de 150 cm² avec L1-Fc (fugen) ; ces cellules sont alors mises en culture pendant 4 jours dans du DMEM contenant 1% de sérum sans immunoglobulines (Gibco #16250-086). Le milieu conditionné est collecté, filtré à 0.2 µm, et incubé la nuit à 4°C avec 500 µl de billes protéine G sépharose (Amersham). Les billes sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS en les centrifugeant à 2500 rpm pendant 10 min, et placées dans une colonne de 0.2 µm (Biorad). On élue L1-Fc pendant 1 min avec 500µl de glycine 0.1 M pH = 3.0, et des volumes de 240 µl sont recueillis dans des tubes contenant 10 µl de Tris 1M pH = 9.0, afin d'obtenir une solution de pH 7.2. Pour évaluer la pureté des protéines produites, on utilise un gel d'électrophorèse, sur lequel on effectue marquage Coomassie ou une révélation immunoblot par l'anti-Fc monoclonal (Jackson). On a mesuré une concentration de protéine de 150 µg/ml par dosage de protéine par rapport à l'étalon BSA (Biorad). Cette production a été effectuée au laboratoire et aussi par P. Alberts dans l'équipe de T. Galli, ce qui nous a permis d'obtenir une quantité plus importante de protéine.

Production de N-cadherin-hFc

Cette protéine a été produite et donnée par M. Lambert dans le laboratoire de R.M. Mège (Institut du Fer à Moulin, Paris) selon un protocole semblable à celui utilisé pour L1-Fc.

Anticorps

Anticorps primaires

anti-L1 polyclonal (donné par F. Rathjen, MDC Berlin), anti-GFP monoclonal (Roche #11814460001) et polyclonal (Molecular Probes #A11122), Gc4 monoclonal (anti-N-cadhérine spécifique de la séquence souris) (Sigma # C3865), anti-N-cadhérine monoclonal (BD Transduction Laboratories #610921), anti-myc monoclonal (Roche clone 9E10 #1667203) et polyclonal (Upstate #06-549), anti-synaptotagmine polyclonal (donné par C. Dotti, VIB, Belgique).

Anticorps secondaires

Alexa⁵⁶⁸-conjugated goat anti-rabbit (Molecular Probes #A11011), Alexa⁴⁸⁸-conjugated goat anti-rabbit (Molecular Probes #A11008), Alexa⁵⁶⁸-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes #A110004), Alexa⁴⁸⁸-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes #A11001), Alexa³⁵⁰-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes #A11045) pour les immunomarquages et unconjugated goat anti-mouse Fc (Jackson #11-005-071), unconjugated goat anti-human Fc (Jackson #11-005-046), unconjugated goat anti-rabbit Fc (Jackson #11-005-098) pour la préparation des billes.

Biologie Cellulaire

Traitement à la thrombine

Pour cliver le site thrombine contenu entre le tag GFP N-terminal et le reste de la protéine L1-GFP et L1ΔCter-GFP (fig. 30A), j'ai utilisé une solution de thrombine à 1U/μl fabriquée à partir de plasma humain (Sigma #T6884). La lamelle de verre à traiter est plongée dans un puits contenant 20 μl de cette solution dans 1ml de milieu neurobasal pendant 100s. La lamelle est ensuite rincée trois fois dans du milieu neurobasal, contenant une fois au moins 50 μM d'inhibiteur de protéase PPACK spécifique de la thrombine (Calbiochem #520222), avant d'être observée.

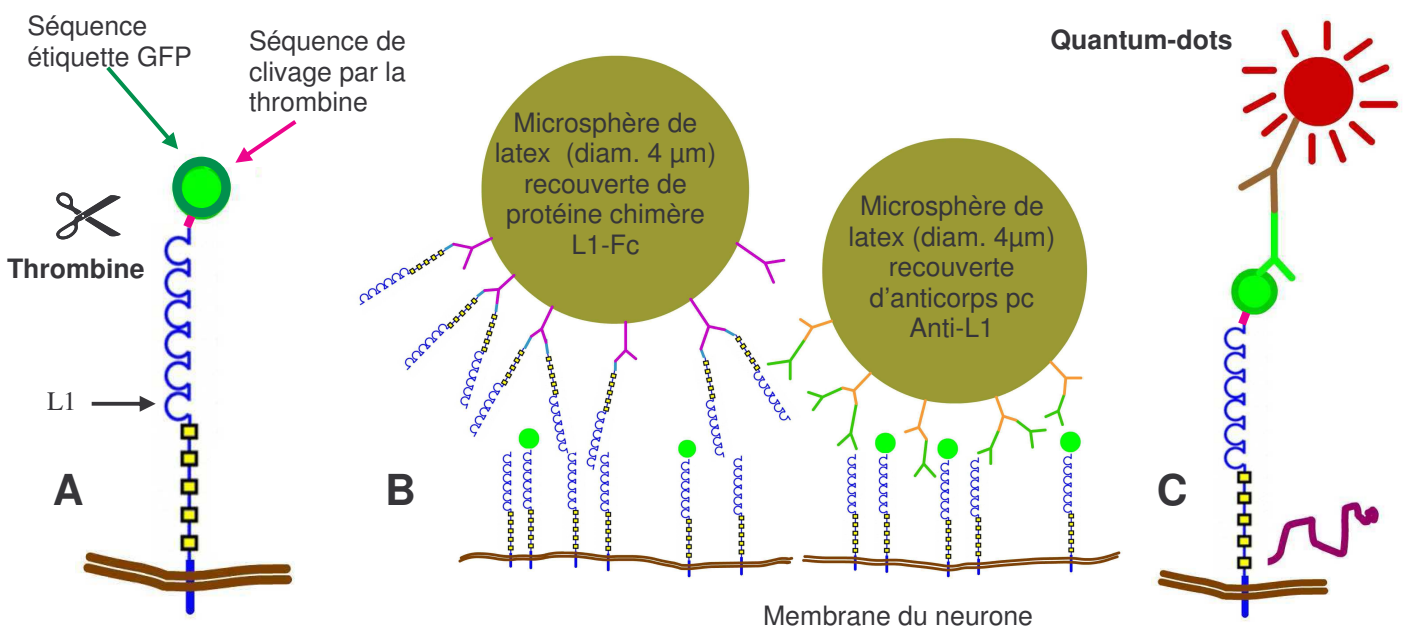
Pour effectuer le même traitement au cours de l'observation, on ajoute à un instant donné 20 μl de thrombine au milieu contenu dans la chambre ouverte d'observation (1ml). Après 100s on ajoute 50 nmoles d'inhibiteur PPACK, puis on utilise un système de perfusion simple (cf montage de microscopie) pour

renouveler le milieu avec au moins trois fois le volume initial dans la chambre. On ajoute finalement de nouveau PPACK.

Inhibition de la dynamique du cytosquelette

Afin de distinguer le rôle de l'actine et des microtubules dans le trafic des vésicules L1-GFP, nous avons utilisé deux protocoles :

- Pour figer le cytosquelette d'actine, on a ajouté 1 μM de cytochalasine D (Sigma #C8273) diluée dans du DMSO juste avant l'observation (après le traitement par la thrombine).
- Pour figer les microtubules, on a ajouté 10 μM de nocodazole (Sigma #M1404) dilué dans du DMSO, 30 minutes avant le traitement à la thrombine et après le rinçage, juste avant l'observation.
- En contrôle, on a observé si le DMSO 1/1000, ajouté 30 minutes avant le traitement à la thrombine et après le rinçage, avait un effet.



Schémas des méthodes de biologie cellulaire utilisées

A Clivage par la thrombine **B** Billes de latex recouvertes de protéines d'adhésion **C** Quantum-dots

Figure 30

Préparation des billes de latex et utilisation

Pour mimer les contacts adhésifs entre neurones, on utilise des microsphères de latex de 4 μm de diamètre recouvertes de protéines d'adhésion (fig. 30B). Pour les préparer, 20 μl de la suspension de départ (Ideal Latex Corp., 300 000 billes par μl) sont rincées trois fois avec une solution de borate (0,2 M, pH 8,5)

et incubés la nuit à 4°C sous agitation avec 20 µg d'une solution d'anticorps anti-Fc de souris, de lapin ou humain non étiquetés dans un volume de 50µL de borate. Les billes sont ensuite rincées trois fois, cette fois avec une solution de borate à laquelle on a ajouté 0,3% de BSA sans globuline (Sigma A7638), puis incubés pendant 4h à température ambiante sous agitation, soit avec 2 µg d'une solution de ligand (environ 200 µg/µl), protéine chimère comportant le domaine Fc des IgG et le domaine extracellulaire des protéines d'adhésion L1 ou N-cadhérine, soit avec 5 µl d'une solution d'anticorps Gc4 ou anti-L1, soit encore, en contrôle avec 2 µg d'une solution de fragments Fc des IgG (Jackson). Les billes sont ensuite de nouveau rincées trois fois avec la solution de borate + BSA, puis resuspendues dans 50 µl. Les lamelles de neurones étant incubées dans des plaques 12 puits, chaque puit contenant 1 ml de milieu neurobasal avec 1% de BSA sans globuline, on ajoute 5µl de la suspension de billes par puits, et on laisse les billes se déposer pendant 45 minutes. Les lamelles sont ensuite rincées trois fois avec du milieu neurobasal chaud puis utilisées (fixation ou montage au microscope).

Préparation des quantum-dots

Les quantum-dots sont de très bons marqueurs, détectables au niveau individuel, résistants au photoblanchiment mais excitables sur une grande gamme de longueurs d'onde, et émettant une fluorescence forte à une longueur d'onde donnée. Leur noyau est un nanocristal de cadmium-sélénium, possédant un nombre d'atomes réduit (fig. 31B). Les électrons confinés dans ce cristal sont excitables, et les niveaux d'énergie qu'ils peuvent atteindre sont distants de leur niveau d'énergie de base d'une énergie donnée (bandgap energy), correspondant à la longueur d'onde qu'émet le quantum-dot. Cette énergie est déterminée par la structure du quantum-dot, elle est notamment inversement proportionnelle à sa taille. Ce noyau est recouvert d'une couche inorganique (ZnS) qui augmente l'efficacité de fluorescence, et rendu soluble par une couche externe organique). Couplé à une (ou un petit nombre de) molécule(s) via des anticorps, le quantum-dot permet de la visualiser et de suivre sa trajectoire (fig. 30C).

Deux techniques de couplages des anticorps aux quantum-dots ont été utilisées, suivant l'affinité de l'anticorps primaire. Les dilutions sont données à titre indicatif et ont été ajustées selon les expériences.

a) le pré-couplage

1µl de quantum-dot conjugué à un (Fab')₂ de chèvre anti IgG de souris émettant à 655 nm (Quantum Dot Corp., Invitrogen #Q11021MP) sont incubés avec 1 µl d'anticorps primaire anti-GFP monoclonal pendant 30 min dans 7 µl de PBS, puis on ajoute 1 µl de caséine 1% (Vector Labs) et on dilue le mélange dans 200 µl de PBS. On a incubé au préalable les lamelles dans le milieu neurobasal + 1% BSA + Hepes 20mM pendant 30 min, avant d'ajouter 2 à 10 µl de la suspension de quantum-dots (1:20000 à 100000) que l'on incube pendant 10 min avant de rincer la lamelle et de l'observer.

b) la double incubation

On incube la lamelle, neurones vers le bas, pendant 10 min. dans une goutte (70 μ l) de milieu neurobasal + 1% BSA + Hepes 20mM contenant l'anticorps de couplage anti-GFP monoclonal à la dilution 1/5000, puis on rince une fois avec du milieu neurobasal chaud. On incube ensuite la lamelle pendant une minute dans une goutte de neurobasal +1% BSA + Hepes 20mM contenant à une dilution 1/100000 un mélange de 1 μ l de quantum-dot conjugué à un (Fab')₂ de chèvre anti IgG de souris émettant à 655 nm et 1 μ l de caséine 1% dans 8 μ l de PBS, que l'on aura préalablement incubé pendant 30 min.. La dilution finale des quantum-dots dans la goutte est de 1/100000. La lamelle est rincée trois fois avant d'être montée sur le microscope.

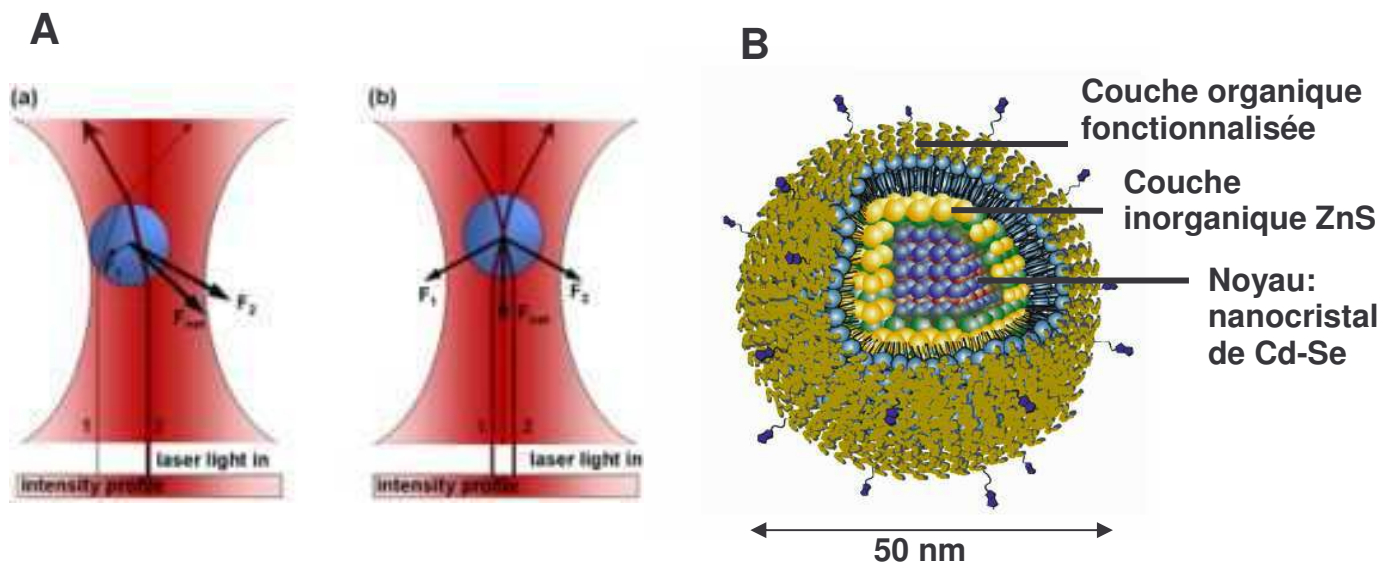


Schéma des méthodes biophysiques couplées à l'imagerie cellulaire utilisées

A Pincettes optiques : les objets d'indice optique plus élevé que le milieu sont piégés au point de focalisation d'un laser. La force qu'exerce le laser sur l'objet tend à le faire revenir au centre : l'objet diffracte le rayon de lumière et modifie son moment (**a**); le laser exerce une force réciproque sur l'objet, jusqu'à ce qu'il retourne à la symétrie (**b**) (http://en.wikipedia.org/wiki/Optical_tweezers). **B** Schéma d'un quantum-dot (http://www.cup.uni-muenchen.de/pc/lamb/lehre/PCII_Lehramt/Folien/Folien_2006_05_31.pdf).

Figure 31

Immunomarquages

Classiques

Les lamelles, disposées dans une plaque 12 puits, sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% (avec 4% de saccharose) pendant au moins 10 minutes puis rincées trois fois au PBS. Elles sont alors incubées dans une solution de NH₄Cl (50 mM) pendant 15 minutes, puis rincées trois fois de nouveau avec du PBS.

Elles peuvent être alors perméabilisées. Si c'est le cas, elles sont incubées avec une solution de Triton X-100 à 0,3% dans du PBS pendant 5 minutes. Elles sont ensuite rincées 3 fois au PBS.

Toutes les lamelles subissent un blocage d'une demi-heure dans une solution de 1% de BSA dans du PBS.

Elles sont alors incubées pendant 1h30 chacune sur une goutte de 70 µl de PBS (0,3% de BSA), contenant l'anticorps primaire de l'immunomarquage, dans une proportion de 1/50 à 1/900 en volume selon l'affinité de l'anticorps. Après trois nouveau rinçage dans PBS (0,3 % de BSA), les lamelles sont incubées pendant 45 min. chacune sur une goutte de 70 µl de PBS (0,3% de BSA), contenant l'anticorps secondaire de l'immunomarquage, dans une proportion de 1/1000 à 1/2000 en volume.

Après trois nouveau rinçage dans PBS (0,3 % de BSA), les lamelles sont montées sur des lames de verre dans une solution de Mowiol (Calbiotech) ou du Vectashield (Vector Labs), et scellé avec du vernis (Laboratoires Cochon - Tradiphar).

Expériences d'endocytose

(cas de L1GFP, protéine portant un tag GFP extracellulaire)

Les neurones sont incubés pendant 10 min. dans une goutte de milieu neurobasal (70µl) + 1% de BSA + HEPES 20mM, contenant l'anti-GFP monoclonal à une dilution de 1/50, la température d'incubation étant inférieure à 10°C afin de bloquer l'endocytose. Les neurones sont ensuite rincés avec du milieu neurobasal froid, puis fixés, ou laissés à incuber 15 min à 37°C pour permettre la reprise de l'endocytose et fixés. Après rinçage trois fois au PBS, les lamelles sont incubées dans une solution de NH₄Cl (50 mM) pendant 15 minutes, puis rincées trois fois de nouveau avec du PBS. On les incube ensuite pendant 1h dans une goutte de PBS (70µl) contenant un mélange d'un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 350 (Molecular Probes) à une dilution de 1/20 et d'un anticorps secondaire anti-Fc de souris non marqué (Roche) à une dilution de 1/20. Cette étape d'incubation permet de bloquer la reconnaissance des anti-GFP qui sont à la surface. Les lamelles sont ensuite perméabilisées avec une solution de Triton X-100 à 0,3% dans du PBS pendant 5 minutes et rincées 3 fois au PBS.

Elles sont alors incubées pendant une demi-heure dans une solution de 1% de BSA dans du PBS, puis on révèle l'anti-GFP intracellulaire par une incubation avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa 568 à une dilution de 1/1000 dans une goutte de 70 µl de PBS (0.3% BSA) pendant 45 minutes. Après rinçage, on monte les lamelles sur des lames de verre comme précédemment décrit.

Expériences d'endocytose

(cas de L1GFP, protéine portant un tag GFP extracellulaire clivable avec la thrombine)

Les neurones sont traités à la thrombine puis, après rinçage, incubés pendant 10 min. dans une goutte de milieu neurobasal (70µl) + 1% de BSA + HEPES 20mM, contenant l'anti-GFP monoclonal à une dilution de 1/50 à température ambiante. Les neurones sont ensuite rincés avec du milieu neurobasal puis fixés, ou laissés à incuber 1 heure à 37°C pour permettre la reprise de l'exocytose et fixés. Après rinçage trois fois au PBS, les lamelles sont incubées dans une solution de NH₄Cl (50 mM) pendant 15 minutes, puis rincées trois fois de nouveau avec du PBS. On les incube ensuite pendant 1h dans une goutte de PBS (70µl) contenant un mélange d'un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 568 (Molecular Probes) à une dilution

de 1/1000. Après rinçage, on monte les lamelles sur des lames de verre comme précédemment décrit.

Imagerie

Observation sur cellules vivantes

On utilise un microscope inversé avec un objectif 100x/1.4 NA (Olympus, IX 70) recevant par son port d'épifluorescence une illumination par lampe Xénon, un faisceau laser Nd:YAG et la raie à 488 nm d'un laser Argon avec les lentilles, les filtres et les miroirs dichroïques correspondants (Chroma, fig. 32). Le microscope est équipé d'une platine motorisée (MarzHauser) qui permet de se déplacer sur la lamelle et de positionner la bille lors de l'utilisation en pince optique. Pour l'acquisition, on utilise une caméra CCD (HQ Cool Snap, Roper Scientific). Les obturateurs (Uniblitz, Vincent Associates) permettent d'alterner l'illumination en fluorescence, l'illumination laser et la transmission. On utilise le logiciel Metamorph (Universal Imaging), pour piloter les shutters et la caméra et pour analyser les images acquises. La température est contrôlée, et maintenue à 37°C grâce à chauffage à air chaud (World Precision Instruments) et un chauffage de l'objectif (Bioprotechs).

Milieu Tyrode (Okamura et al., 2004)

Pour l'observation, afin de pallier des problèmes de fluorescence de milieu, on choisit d'utiliser une solution saline d'observation après avoir vérifié que la survie des neurones à court terme (1 à 2 heures, durée maximale d'observation d'une lamelle) n'était pas affectée. Il est composé de 25 mM d'Hepes, 119 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂, 2 mM de MgCl₂ et de 2mM de Glucose, le tout équilibré à pH 7.4 avec de la soude 10M.

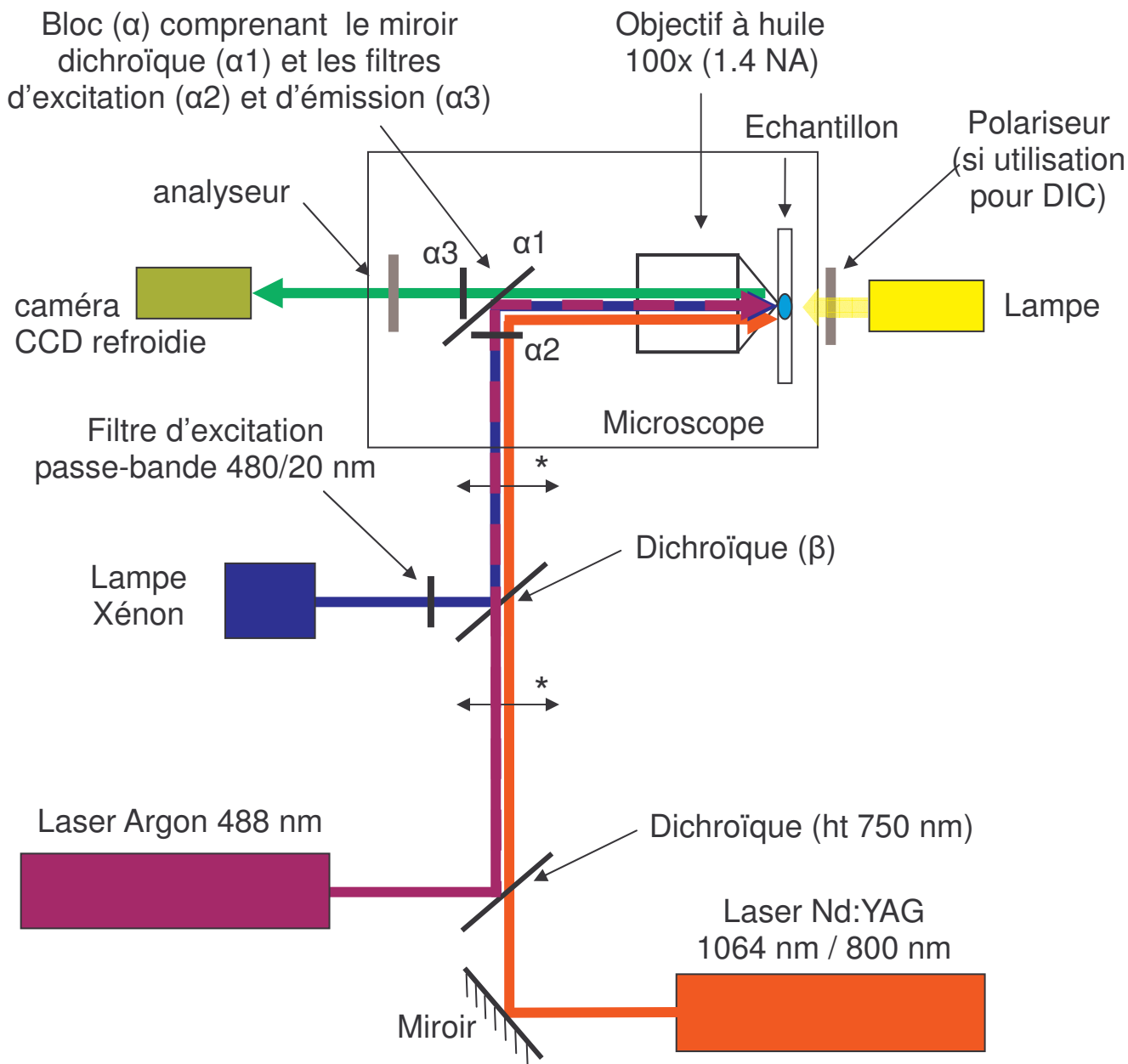
Pinces optiques

Les billes de latex sont maintenues et manipulées grâce à un faisceau laser Nd:YAG (Compass 1064 nm, Coherent) focalisé dans le plan d'observation. Cette méthode permet de piéger des objets plus réfringents que le milieu, par exemple les billes de latex (fig. 31A). La puissance du laser en amont de l'objectif est de 100 mW.

Séquence d'acquisition : on acquiert successivement une image en fluorescence et une image en transmission, toutes les 10 secondes pendant 15 minutes après avoir déposé la bille sur le cône.

Photoblanchiment (Fluorescence recovery after photobleaching ou FRAP)

On utilise la raie à 488 nm d'un laser Argon (Innova 300, Coherent) dont la puissance en amont de l'objectif est de 2.5 mW.



Bloc (α) et miroir dichroïque (β)

Utilisation	Excitation (α2)	Dichroïque (α1)	Emission (α3)	Dichroïque (β)
GFP	bp 480/20 nm	ht 500 nm	bp 525/50 nm	selon utilisation
DsRed	bp 560/20 nm	ht 590 nm	bp 620 nm	selon utilisation
Q-dots	bp 560/20 nm	ht 590 nm	bp 655/20 nm	selon utilisation
FRAP	bp 480/20 nm	ht 500 nm	bp 525/50 nm	lame semi-réfléchissante
Pincés	aucun	bs 750 nm	filtre IR, bp 650/300 nm	ht 750 nm

Schéma du montage optique

Abbreviations et symboles : (*) lentilles de centrage et de focalisation; bp : passe-bande; ht : passe-haut; bs : passe-bas; NA : ouverture numérique; DIC : contraste interférentiel différentiel; Q-dots : quantum-dots; pincés : pincés optiques.

Figure 32

On positionne une zone d'intérêt du neurone transfecté exprimant une protéine fluorescente (par exemple, L1-GFP) sous le faisceau laser dont la position a été repérée au préalable. Après 5 acquisitions du niveau de fluorescence de départ, l'échantillon est photoblanchi pendant 0.3 s. sur une région d'environ 4 μm de diamètre et on enregistre le retour de fluorescence pendant 12 min, avec des temps d'échantillonnage de plus en plus grands. On effectue au plus trois séquences par lamelle, chaque lamelle étant conservée environ 45 minutes sous le microscope.

Système de perfusion

Le milieu tyrode est distribué sur la chambre d'observation en passant par un dispositif de chauffage en ligne (Inline heater, Warner Instruments). Le milieu en excès est collecté par aspiration à la surface de la chambre d'observation à l'aide d'une aiguille reliée à une pompe à vide.

Suivi de quantum-dots

Pour visualiser les quantum-dots, on utilise un filtre d'excitation passe-bande de 545-580 nm, un miroir dichroïque à 590 nm, et un filtre d'émission passe-bande à 655 ± 20 nm (Chroma). Les trajectoires des quantum-dots sont enregistrées pendant 100 s (500 images).

Observation sur cellules fixées

On utilise un microscope droit Zeiss Axioplan 2 avec un objectif 63X/1.4, muni d'une roue porte-filtre motorisée pour l'observation de la fluorescence autour de 488 nm et de 568 nm, et d'une caméra quantix (Photometrics) permettant l'acquisition.

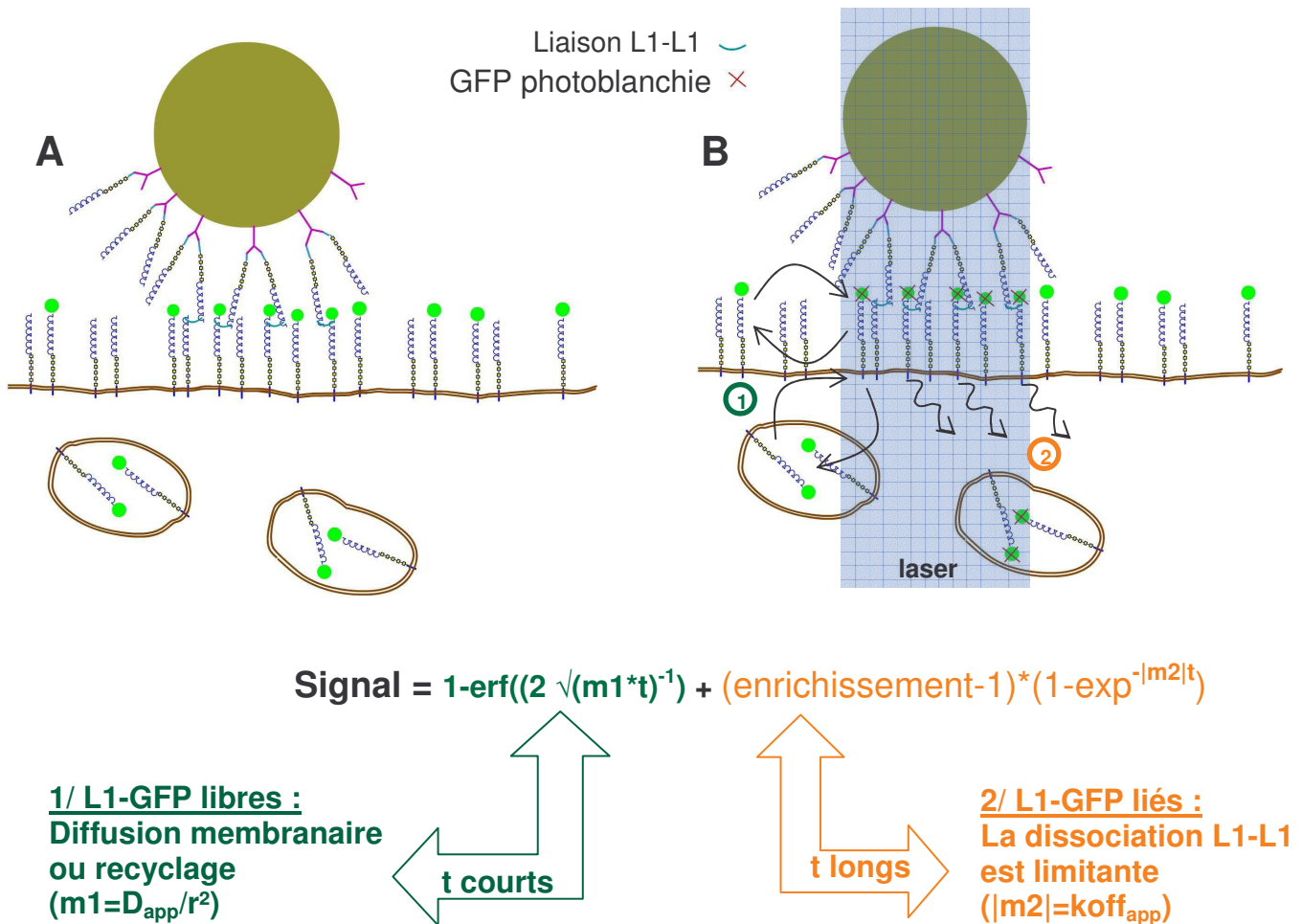
Analyse

Analyse de trajectoires Q-Dots

On a analysé les trajectoires des quantum-dots grâce à un algorithme MIA (multidimensionnal image analysis) écrit sous Metamorph par Victor Racine (Institut Curie, Paris). Les traces obtenues sont alors reconnectées via un programme écrit sous Matlab (Laurent Cagnet, Marianne Reiner) qui permet également de vérifier les trajectoires obtenues et d'enlever les mauvaises trajectoires. Seuls les quantum-dots suivis pendant plus de 6 secondes sont conservés. Grâce à un programme écrit sous, MSD-turbo (Daniel Choquet, Arnaud Sergé), on calcule le déplacement quadratique moyen pour chaque trajectoire. Par une régression linéaire sur la courbe obtenue, on obtient le coefficient global de diffusion sur la trajectoire considérée, et on peut construire la distribution de ces coefficients pour toutes les trajectoires analysées.

Analyse d'enrichissement des billes

Les images des billes sur les neurones sont analysées sous Metamorph. La zone enrichie au niveau de la bille a le plus souvent la forme d'un anneau. On trace autour de la bille un cercle d'aire A_{ext} en pixel, de 5 μm de diamètre, à l'intérieur duquel on mesure l'intensité de fluorescence intégrée, I_{ext} . On trace à l'intérieur de la bille un cercle d'aire A_{int} en pixel, de 2.5 μm de diamètre, à l'intérieur duquel on mesure l'intensité de fluorescence intégrée, I_{int} . La fluorescence moyenne dans l'anneau est $F_{\text{anneau}} = (I_{\text{ext}} - I_{\text{int}}) / (A_{\text{ext}} - A_{\text{int}})$. On mesure également la fluorescence moyenne du fond, F_{fond} , et la fluorescence moyenne sur une zone contrôlée représentative du neurite, F_{neurite} . Pour pallier les grandes différences d'expression des protéines transfectées, on calcule le rapport de fluorescence $R = (F_{\text{anneau}} - F_{\text{fond}}) / (F_{\text{neurite}} - F_{\text{fond}})$.



Principe d'analyse de l'expérience de FRAP

A Avant l'illumination FRAP, la bille est liée aux molécules L1 endogènes et L1-GFP du neurone. Sous la bille coexistent des molécules liées à la bille et des molécules libres, à la membrane ou dans le compartiment intracellulaire. **B** L'illumination FRAP photoblanchit les molécules L1-GFP liées et libres sous la bille. L'échange des molécules libres avec des molécules hors du contact contribue aux temps courts au retour de fluorescence, et les molécules liées doivent se dissocier du contact avec la bille avant de permettre le retour de fluorescence aux temps longs.

Figure 33

Analyse des expériences de photoblanchiment

Les enregistrements des expériences sont analysés sous Metamorph. On trace autour de la zone photoblanchie un cercle de 5 μm de diamètre à l'intérieur duquel on mesure l'intensité moyenne de fluorescence, F_{frap} , pour toutes les images de la séquence d'acquisition. On mesure également la fluorescence moyenne du fond, F_{fond} , et la fluorescence moyenne sur une zone contrôle représentative du neurite, F_{neurite} . On calcule le rapport de fluorescence $R = (F_{\text{frap}} - F_{\text{fond}}) / (F_{\text{neurite}} - F_{\text{fond}})$. On normalise ce rapport à R' tel que la valeur moyenne de R' avant photoblanchiment soit 1, et que juste après le photoblanchiment, $R' = 0$, afin de mettre en valeur la cinétique du retour de fluorescence. $R' = (R_t - R_0) / ([R_{t < 0}] - R_0)$. La courbe obtenue est ajustée à l'équation $y = 1 - \text{erf}(1/(2*\sqrt{(m1*t)})) + (\text{enrichissement} - 1) * (1 - \exp^{(-\text{abs}(m2)*t)})$, où $\alpha = 1 - \text{erf}(1/(2*\sqrt{(m1*t)}))$ correspond à la cinétique du recyclage des molécules libres dans la zone de photoblanchiment, et $\beta = (\text{enrichissement} - 1) * (1 - \exp^{(-\text{abs}(m2)*t)})$ correspond à la dissociation des liens engagés entre la bille et le neurone (fig. 33).

Analyse des expériences de pinces optiques

Les enregistrements des expériences sont analysés sous Metamorph. Pour chaque image de transmission de la séquence d'acquisition, on trace autour de la bille un cercle de 5 μm de diamètre à l'intérieur duquel on mesure l'intensité moyenne de fluorescence, F_{bille} , pour l'image de fluorescence correspondante. On mesure également la fluorescence moyenne du fond, F_{fond} , et la fluorescence moyenne sur une zone contrôle représentative du cône, $F_{\text{cône}}$. On calcule le rapport de fluorescence $R = (F_{\text{bille}} - F_{\text{fond}}) / (F_{\text{cône}} - F_{\text{fond}})$. Ce rapport est normalisé à 1 par rapport à la valeur initiale, $R' = R / R_0$.

Quantification des expériences d'endocytose de LI-GFP

Les images des neurones sont analysées sous Metamorph. On utilise l'image GFP et l'image rouge des molécules endocytées. Pour chaque cône de croissance, on effectue un seuillage sur l'image de fluorescence GFP tel que la zone seuillée dessine le cône. On mesure I_{vert} , l'intensité de fluorescence GFP dans la zone seuillée, $I_{\text{fond vert}}$, l'intensité de fluorescence du fond, et A , l'aire en pourcent qu'occupe la zone seuillée dans la zone mesurée. Sur l'image de fluorescence rouge, on élève le seuil jusqu'à ce que l'aire de la zone seuillée corresponde à A . On observe que la zone seuillée dessine là aussi approximativement le cône. On mesure I_{rouge} , l'intensité de fluorescence rouge dans la zone seuillée, et $I_{\text{fond rouge}}$, l'intensité de fluorescence du fond. On calcule le rapport de fluorescence $R = (F_{\text{rouge}} - F_{\text{fond rouge}}) / (F_{\text{vert}} - F_{\text{fond vert}})$, pour pallier les grandes différences d'expression des protéines transfectées.

Etude de la dynamique des contacts homophiles L1

I/ RESULTATS

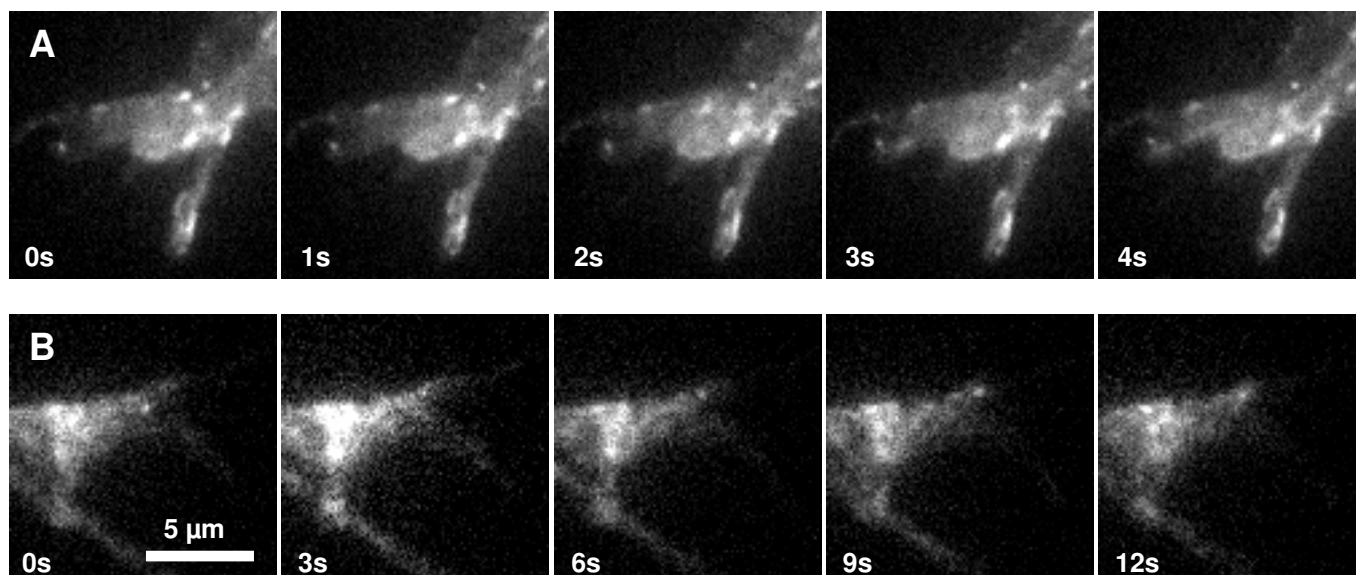
A la lumière des travaux des équipes de H. Kamiguchi (RIKEN Brain Science Institut, Japon) et de T. Galli (Institut Jacques Monod, Paris) évoqués dans l'introduction, il nous est apparu pertinent de poursuivre sous un aspect dynamique l'étude des contacts homophiles L1 initiée par P. Alberts dans l'équipe de T. Galli (Alberts et al., 2003). Nous avons cherché à mettre en évidence le rôle respectif de la diffusion à la membrane et du trafic intracellulaire dans l'enrichissement et le renouvellement de ces contacts adhésifs. Dans ce cadre, nous avons utilisé plusieurs approches expérimentales en microscopie optique pour caractériser la dynamique de contacts formés entre billes recouvertes de protéines d'adhésion et neurones : retour de fluorescence après photoblanchiment ou FRAP, recrutement de protéines au contact après manipulation par pinces optiques, suivi du déplacement à la membrane de particules uniques par Quantum-dot. Nous avons pour cela utilisé de façon extensive une construction L1 fusionnée à la séquence de la GFP, transfectée dans des neurones issus de cultures jeunes (2-3 DIV) et observée avant 8 DIV. L'étiquette GFP est située à l'extrémité N-terminale de la molécule L1, et séparée du reste de la molécule par une séquence clivage avec la protéase thrombine. J'ai mis au point des conditions d'un clivage rapide et spécifique de la GFP par la thrombine, de sorte que l'on fait totalement disparaître la composante surfacique de la fluorescence L1-GFP. Cet outil permet ainsi de distinguer sur les neurones vivants les composantes intracellulaires et surfaciques du signal L1. Ces données nous ont permis d'évaluer le comportement des molécules L1 au cône de croissance, lieu privilégié du trafic et de l'établissement de contacts adhésifs, dans plusieurs configurations : contacts à l'équilibre, initiation d'un contact, absence de contact.

1- ARTICLE I : "Fast turnover of L1 adhesions in neuronal growth cones involving both surface diffusion and exo/endocytosis of L1 molecules"

A l'aide de marquages en immunocytochimie avec ou sans perméabilisation de la membrane, nous avons tout d'abord vérifié que la construction L1GFP s'exprimait bien à la membrane des neurones transfectés (43 ± 9 % de l'expression totale), et se distribuait de façon analogue à la molécule L1 endogène. Nous avons évalué l'exocytose de L1GFP en mesurant le signal de fluorescence obtenu après traitement par la thrombine puis un temps d'incubation entre 0 et 2 heures, temps après lequel la valeur de la fluorescence est comparable à celle du départ. La cinétique de ce processus d'exocytose est donc relativement lente : la fluorescence normalisée revient avec une vitesse d'environ 0.012 min^{-1} , et il faut plus d'une heure pour revenir à la valeur initiale de la fluorescence à la membrane (fig. 1, p. 3 de l'article).

Pour évaluer la dynamique de la fraction intracellulaire de L1, on a observé pendant quelques minutes avec

une fréquence d'acquisition élevée (5 images par seconde) des cônes de croissance préalablement traités à la thrombine. La faible intensité du signal et l'importance du photoblanchiment ont limité la durée de ces enregistrements. Le clivage de l'étiquette GFP fait apparaître des compartiments intracellulaires de taille variées, mais certains très gros (de l'ordre du micron), parmi lesquels une proportion importante semble immobile dans le domaine central du cône de croissance, alors que d'autres montrent des mouvements dirigés centripètes ou centrifuges dans le neurite et le cône de croissance (fig. 2, p. 4 de l'article). Le mouvement de ces vésicules mobiles s'effectue sur des trajectoires rectilignes et à une vitesse de $1.6 \pm 0.1 \mu\text{m/s}$, suggérant qu'elles sont transportés par un mécanisme dépendant des microtubules. Cette implication des microtubules a été démontrée en effectuant les mêmes observations des vésicules L1-GFP après traitement à la cytochalasine D et au nocodazole : dans le premier cas, le mouvement dirigé des vésicules L1-GFP a encore lieu, et dans le second, les vésicules mobiles montrent un mouvement erratique (fig. 34). Nous nous sommes alors demandés si les molécules L1-GFP présentes à la surface montraient elles aussi un mouvement dirigé.



Suivi de vésicules L1-GFP après traitement à la cytochalasine D (A) et au nocodazole (B)
A De nombreuses vésicules montrent un trajectoire dirigée. **B** Les vésicules mobiles montrent un mouvement erratique.

Figure 34

On peut coupler spécifiquement des quantum-dots à l'étiquette GFP portée par une protéine membranaire en extracellulaire afin de marquer un petit nombre des protéines à la membrane, chaque quantum-dot se liant, en théorie, à une molécule. Si l'on suit sa trajectoire, enregistrée à haute fréquence d'acquisition (9 images par secondes), on peut déterminer la nature du mouvement de la molécule : brownien, confiné ou diffusif, et évaluer son coefficient de diffusion. Cette méthode a été utilisée pour suivre le mouvement de L1-GFP à la surface de cône de croissance de neurones. Par cette méthode, on montre que ce mouvement est diffusif et on peut analyser la distribution des coefficients de diffusion de la molécule à la membrane (fig. 3, p. 5 de l'article). Si elles reflètent la grande taille du domaine extracellulaire

de L1, ces valeurs sont assez grandes, et telles que les phénomènes de diffusion ne sont pas limitants pour la cinétique du recrutement ou du renouvellement des molécules L1 aux contacts adhésifs (Thoumine et al., 2005).

Pour savoir si une partie des quantum-dots était internalisée, nous avons voulu cliver les molécules portant les quantum-dots par la thrombine. Cependant cette expérience n'a pu être réalisée car les quantum-dots ne quittent pas la surface du cône traité. Le clivage semble empêché par la liaison de l'anticorps de couplage au quantum-dot.

Afin de s'assurer de la validité des études menées sur les contacts entre les neurones et les billes, nous avons vérifié que ces contacts permettaient l'établissement d'un site d'adhésion homophile L1. Dans ce but, on incube les neurones avec un nombre de billes fixé et on mesure la moyenne du nombre de billes restant à la surface des neurones après rinçage. On observe une adhérence spécifique des billes recouvertes de L1 ou de l'anticorps anti-L1 sur les neurones non transfectés, révélant la présence de L1 endogène, et cette adhérence est encore plus forte si le neurone est transfecté avec L1-GFP, ce qui vérifie la capacité de L1-GFP à prendre part à un contact adhésif (fig. 4, p. 6 de l'article). On observe une accumulation de signal GFP aux sites de contacts, au niveau desquels on peut alors calculer un enrichissement relatif en L1-GFP de 2.2 ± 0.2 .

On peut donc évaluer la cinétique de l'accumulation de la protéine d'adhésion L1 lors de l'établissement d'un contact en mesurant l'enrichissement progressif de fluorescence au site de contact entre un neurone transfecté avec L1-GFP et une bille déposée au cône à l'aide de pinces optiques (fig. 5, p. 7 de l'article). Lors de ces expériences, les billes L1, anti-L1 et N-cadhérine (notre contrôle), positionnées à la périphérie du cône, adhèrent et se meuvent vers la zone centrale du cône de croissance, vraisemblablement couplées au flux rétrograde d'actine. Pour les billes anti-L1 et L1, on observe dans le même temps une accumulation de signal GFP, et on détermine des constantes d'association k_{on} de $1.30 \pm 0.35 \text{ min}^{-1}$ pour les billes L1 et de $0.54 \pm 0.15 \text{ min}^{-1}$ pour les billes anti-L1. On a alors effectué la même expérience après traitement préalable à la thrombine. Dans ce cas, on n'observe d'accumulation qu'au site de contact avec les billes L1, suggérant qu'il existe, dans le cas où un contact d'adhésion homophile est établi, un phénomène d'exocytose qui contribue de manière non négligeable à l'accumulation de L1-GFP observée lors de l'établissement d'un contact adhésif (la vitesse de l'accumulation L1-GFP due à l'exocytose, $k_{on} = 0.73 \pm 0.36 \text{ min}^{-1}$, est la moitié de la vitesse d'accumulation sans traitement thrombine). Ce phénomène d'exocytose intervient exclusivement au niveau de contacts dynamiques : si l'on effectue le traitement à la thrombine sur des contacts stables (billes incubées pendant au moins ½ heure), on n'observe pas de retour significatif de fluorescence (fig. 6, p. 8 de l'article), ce qui est cohérent avec les expériences d'évaluation de la cinétique d'exocytose déjà mentionnées. Existe-t-il tout de même un recyclage de la protéine d'adhésion L1 aux contacts stables ?

Pour répondre à cette question, nous avons photoblanchi des sites de contacts adhésifs de billes L1-Fc ou anti-L1 sur des neurones montrant une accumulation du signal de fluorescence L1-GFP et mesuré le retour de fluorescence dans les zones photoblanchies. Ce retour de fluorescence suit une double cinétique : aux temps courts, un retour rapide similaire à celui des zones contrôles (sans contacts), qui traduit la diffusion de molécules qui ne sont pas engagées dans le contact ; aux temps long, une contribution spécifique des contacts homophiles (billes L1) qui traduit le renouvellement des molécules L1 du contact. L'évolution du signal de fluorescence suit ainsi le modèle de réaction-diffusion (Thoumine et al., 2006), car le facteur limitant de la cinétique aux temps longs est en fait la dissociation des liens entre L1 de la bille et les molécules L1-GFP photoblanchies. On n'observe pas cette seconde contribution pour les contacts entre neurone et billes anti-L1 car la liaison anticorps – antigène qui est en jeu est trop stable. Par ajustement, on déduit un coefficient de dissociation pour la liaison L1-L1 : $k_{\text{off}} = 0.1 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$, qui s'avère être particulièrement labile (pour comparaison, $k_{\text{off N-cadhérine}} = 0.038 \pm 0.007 \text{ min}^{-1}$) et pour la liaison L1-anti-L1 : $k_{\text{off}} = 0.01 \pm 0.008 \text{ min}^{-1}$ (fig. 7, p. 9 de l'article).

Enfin, puisque l'exocytose prend part à l'accumulation de molécules adhésives à des sites de contacts dynamiques, nous avons cherché à savoir comment l'endocytose contribue au renouvellement des adhésions homophiles. Nous avons utilisé une construction de L1-GFP sans domaine intracellulaire, L1 Δ Cter-GFP, dont on a d'abord observé qu'elle était exprimée à la surface des neurones et recrutée par des billes L1-Fc. Ce mutant ne possède pas la séquence YRSLE d'internalisation par la clathrine, mais de nombreuses autres interactions sont également empêchées. Pour compléter l'étude, nous avons donc utilisé aussi un membre de la famille de L1 qui ne possède pas la séquence YRSLE d'internalisation par la clathrine, NrCAM-GFP. Nous avons mesuré le taux d'endocytose de ces protéines par une méthode d'immunomarquage de neurones vivant à froid puis révélation des anticorps internalisés après 15 minutes (fig. 8, p. 10 de l'article). Par cette expérience, on montre que L1 Δ Cter-GFP et NrCAM-GFP sont comparativement moins bien endocytés que L1-GFP. Nous avons utilisé le mutant L1 Δ Cter-GFP dans les expériences précédentes pour obtenir une information sur la contribution de l'endocytose dans la dynamique des contacts homophiles. L'étude des contacts stables par l'expérience de FRAP, menée avec L1 Δ Cter-GFP, montre que ces protéines d'adhésion mutantes recyclent significativement moins bien ($k_{\text{off}} = 0.03 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$) que les protéines possédant le domaine intracellulaire. On sait par ailleurs que pour la molécule NrCAM-GFP, la cinétique de retour de fluorescence après photoblanchiment ne montrent pas de composante aux temps longs (Falk et al., 2004). Ces résultats soulignent l'importance du domaine YRSLE et suggèrent que la vitesse d'internalisation de la protéine pourrait moduler la cinétique renouvellement des contacts homophiles : la disparition des molécules L1 de la surface par internalisation pourrait déplacer l'équilibre chimique de la liaison L1-L1 vers sa dissociation.

2- EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES

Observation de la disparition de vésicules L1-GFP au site de contact de billes L1-Fc, après clivage par la thrombine (fig. 35 et 36)

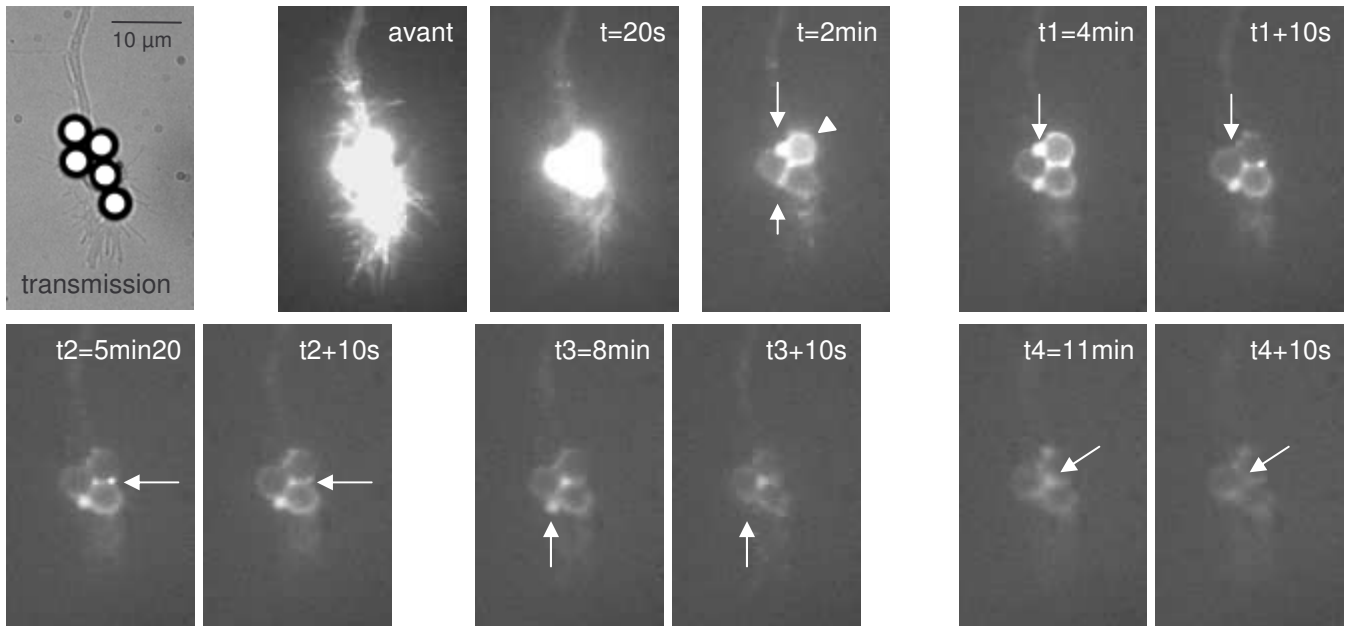
Les expériences de pinces optiques menées après traitement par la thrombine nous indiquent que l'existence d'un contact adhésif homophile L1 permet un retour de fluorescence rapide et implique que cette adhésion homophile active des phénomènes d'exocytose. Une question qui reste en suspens est la localisation de ces sites d'exocytose par rapport au site d'adhésion. On n'a cependant pas pu observer la survenue de phénomènes d'exocytose lors de ce type d'expériences à cause d'un manque de résolution optique (faible signal, vésicules de petite taille). Nous avons également cherché à utiliser la technique de TIRF pour mieux observer les événements membranaires, mais ces expériences nécessitaient une quantité de ligand L1-Fc importante que nous n'avions pas.

Dans un contact où L1-GFP est fortement enrichi, une partie des molécules recrutées reste observable après application de thrombine, et ce sont des vésicules riches en L1-GFP que l'on peut alors observer après le traitement, comme le montrent les expériences de traitement thrombine sur des contacts à l'équilibre. Ces vésicules sont parfois de tailles importantes (de type vacuole). Selon la hauteur de focalisation (sur la cellule ou sur la bille), elles montrent des aspects différents. Si l'objectif focalise sur la bille, la vésicule est hors de focalisation et sa fluorescence est diffractée par la bille : on observe souvent une fluorescence en anneau autour de la bille, due à la présence de vésicules intracellulaires au site de contact.

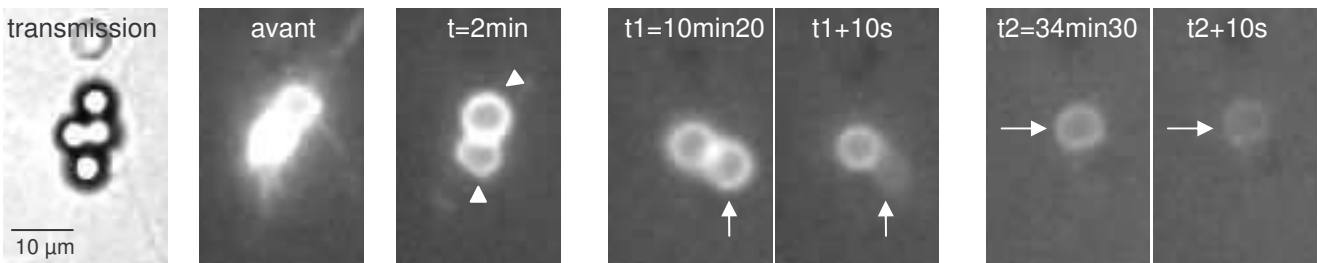
Sur des neurones sur lesquels les billes avaient été posées 30 minutes auparavant, on a effectué un traitement thrombine pendant l'observation, et sur quelques exemples, exclusivement aux cônes de croissance, on a pu observer la disparition de vésicules fluorescentes présentes au site de contact avec une bille L1-Fc (signal focalisé ou diffracté par la bille, fig. 35). Le faible nombre d'expériences obtenues (n = 4) s'explique par les conditions nécessaires à la survenue de cette exocytose : en théorie, il faut que le contact soit resté dynamique, mais que les vésicules soient assez grosses pour permettre l'observation. On se situe donc dans un état intermédiaire entre le contact stable enrichi (expérience de traitement thrombine) et le contact en formation (expérience de pinces optiques). Cependant ces exemples sont très informatifs quant à la survenue de l'évènement d'exocytose au site de contact homophile L1.

Remarquons également que les vésicules observées dans le premier exemple semblent augmenter de taille progressivement avant leur disparition rapide. Ceci peut être dû au regroupement de plusieurs petites vésicules ou bien à l'endocytose de L1GFP membranaire résiduel, avec dans ce cas un effet de concentration important. Ce second mécanisme serait rendu possible grâce à l'internalisation de la molécule activée par l'adhésion homophile L1.

A Expérience du 17 décembre 2004



B Expérience du 4 février 2005

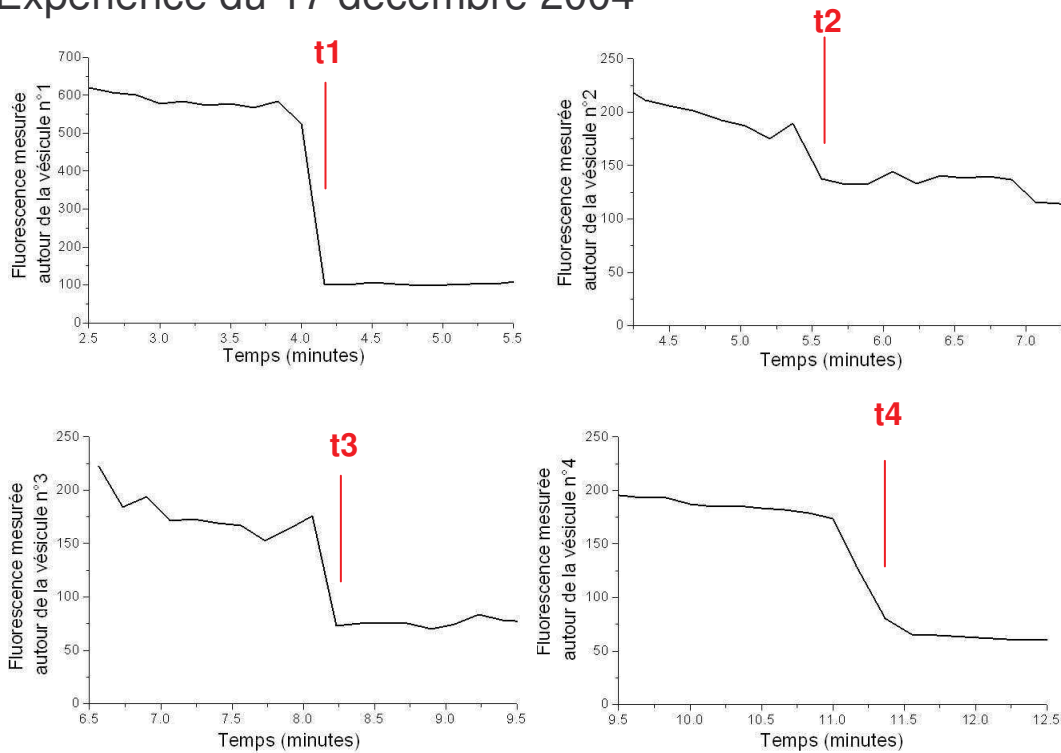


Disparition de vésicules L1-GFP au site de contact de billes L1-Fc

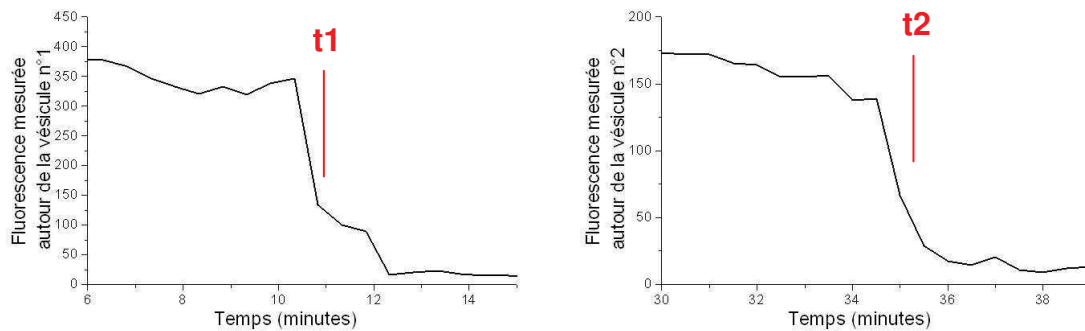
On effectue une expérience de traitement thrombine sur des neurones portant des billes L1Fc au contact desquelles il existe un enrichissement de fluorescence L1-GFP. La fluorescence avant le traitement est saturée afin d'observé nettement les images ultérieures (l'échelle de gris est conservée). Images en épifluorescence à différents temps avant et après le traitement. **A** à $t=2\text{min}$, on observe que l'application de thrombine a permis de révéler une fluorescence intracellulaire en vésicules (flèches) ou en anneau autour de la bille (pointe de flèche). **A** A quatre temps différents (t_1 à t_4), on observe la disparition rapide d'une vésicule donnée (flèches). **B** A deux temps différents (t_1 et t_2), on observe la disparition rapide de la fluorescence en anneau autour d'une bille donnée (flèches).

Figure 35

A Expérience du 17 décembre 2004



B Expérience du 2 février 2005



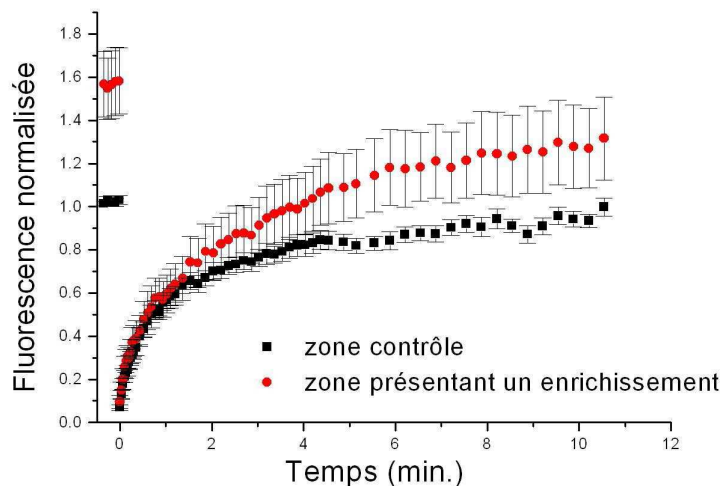
Disparition de vésicules L1-GFP au site de contact de billes L1-Fc

Analyse en intensité de fluorescence. Les diminutions rapides de fluorescence correspondent au moment de disparition des vésicules.

Figure 36

Dynamique des contacts homophiles L1 matures entre cellules (fig. 37)

Dans quelle mesure la dynamique des contacts artificiels entre un neurone et une bille recouverte de protéine d'adhésion reflète-t-elle la dynamique de contacts cellulaires ? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons étudié la dynamique de l'adhésion homophile L1 sur des neurones issus de cultures plus âgées (15DIV) afin d'être sûrs que les neurones aient établis entre eux des contacts, et transfecté pour L1-GFP à 8 DIV. Nous avons mesuré le retour de fluorescence après photoblanchiment de zones montrant un enrichissement L1-GFP, en les comparant à de zones ne montrant pas d'enrichissement, qu'on suppose donc n'être pas engagés dans un contact adhésif homophile. La cinétique de retour de fluorescence pour ces zones enrichies possède une composante aux temps longs comme pour ce qui a été observé pour les billes L1, et ce retour de fluorescence aux temps longs correspondrait à la dissociation des liens L1-L1 entre neurones.



Expérience de FRAP sur neurones matures transfectés L1-GFP

Analyse de la fluorescence normalisée par rapport à une zone sans enrichissement. On observe que la dynamique du retour de fluorescence de ces zones enrichies, qui peuvent être des zones de contacts, possède une composante aux temps longs comme pour l'expérience de FRAP sur les billes L1-Fc.

Figure 37

II/ DISCUSSION

La part de mon travail de thèse consacrée à l'étude des contacts adhésifs L1 a permis de mieux comprendre la dynamique des contacts homophiles L1. Cette étude s'inscrit dans le cadre de la caractérisation biophysique des adhésions entre protéines membranaires, travail déjà bien avancé pour les cadhérines (Perret et al., 2004), (du Roure et al., 2006), (Thoumine et al., 2006)). Mes résultats donnent une idée du caractère particulièrement labile de cette adhésion homophile L1 et de la relation entre adhésion et trafic cellulaire.

A la suite d'études effectuées sur des neurones du ganglion de la racine dorsale (DRG), cultivés sur des substrats fonctionnalisés L1, H. Kamiguchi a proposé un modèle de recyclage actif au cône de

croissance : la théorie du gradient, où L1 est exocyté à la périphérie du cône de croissance, prend part à un contact adhésif avec le substrat, bouge vers le domaine central et est finalement endocyté, puis transporté vers la périphérie. Notre étude corrobore en partie les données de cette équipe (rôle de l'endocytose, trafic dirigé) dans un système différent, les neurones d'hippocampe, dans lesquels L1 pourrait jouer un autre rôle. En effet, les neurones DRG montrent un degré de fasciculation important et des axones de très grande taille, il est probable que le cône de croissance joue un rôle particulièrement important dans la progression rapide de l'axone sur le substrat L1 des neurites fasciculés. Dans l'hippocampe, les axones sont moins longs et potentiellement moins fasciculés, et on a vu que dans ce système, L1 intervient dans la localisation somatique des contacts synaptiques GABAergiques. Nous avons observé que le trafic intracellulaire de L1 dans le cône de croissance était important également dans ce système.

La particularité de cette étude est l'utilisation d'une stimulation locale de l'adhésion homophile L1 grâce aux microsphères recouvertes de L1-Fc. Ce modèle, qui cumule des approches expérimentales de biologie cellulaire / imagerie et de biophysique, m'a donné la possibilité de sonder la dynamique des contacts homophiles L1 sous un aspect dynamique et de révéler des détails qui n'étaient pas accessibles avec des méthodes d'immunocytochimie classiques. Ces expériences nous ont également permis de prouver que l'adhésion active l'exocytose, et des données préliminaires suggèrent cette exocytose pourrait survenir au moins partiellement aux sites de contact eux-mêmes.

Pour faire le lien entre ces expériences des billes et les expériences effectuées sur le substrat L1, il faut immobiliser la bille, par exemple avec le système de micromanipulateur mécanique ou magnétique (système que j'ai commencé à construire pendant mon travail de thèse selon un modèle publié (Fass and Odde, 2003)), ou de pinces magnétique. En effet, nous avons évoqué le fait que la tension mécanique pourrait jouer un rôle dans le signal déclenché par l'adhésion. Dans ce cadre, il serait pertinent d'effectuer pour l'adhésion L1 les expériences de stimulation mécanique initiées pour l'adhésion N-cadhérine.

Un des enjeux importants de cette étude était de faire le lien entre le modèle de recyclage actif en « tapis roulant » et la découverte par T. Galli de la molécule TI-VAMP de l'exocytose axonale. Nous avons en effet mis en évidence le fait que l'exocytose concourt à l'établissement de contacts adhésifs, et que l'endocytose semblait être nécessaire au recyclage de ces contacts.

Cependant, il semble à présent que ce point aurait pu être mieux développé, car plusieurs points restent en suspens :

- Quelle relation existe-t-il entre les vésicules riches en L1 observées et les vésicules TI-VAMP (Alberts et al., 2006) ? Peut-on considérer qu'il s'agit d'un seul et même compartiment? Des expériences d'immunomarquage permettraient d'affiner cette question.
- Quelles sont les relations moléculaires entre L1 et TI-VAMP ?

S'il est vrai que L1 peut être endocyté par la clathrine, rien n'indique que c'est le seul mécanisme

d'internalisation de la protéine. Nous avons observé que le mutant de L1-GFP ne possédant pas de domaine cytoplasmique, donc pas de signal d'endocytose, peut encore s'endocyter partiellement, tout comme NrCAM-GFP qui ne possède pas de séquence YRSLE. Selon une étude de microscopie électronique précédemment évoquées (Dailey and Bridgman, 1993), il existe un compartiment particulier, des vacuoles de grande taille et de faible indice de réfraction optique, qui pourrait être produit lors de la rétraction du cône, voire de l'effondrement périodique des structures motiles (filopodes, lamellipodes). On pourrait distinguer deux voies d'internalisation indépendantes de l'activité électrique du neurone : une endocytose par la clathrine dépendante de l'existence d'un contact adhésif (Schaefer et al., 2002), et une voie non spécifique. Cependant, la compartimentalisation dans le cône de croissance garde encore des zones d'ombre.

Nous nous sommes attachés à distinguer les contributions de la diffusion et du trafic intracellulaire dans le renouvellement des contacts adhésifs, mais il faut se demander aussi quelle est la part respective du recyclage et de l'apport de nouvelles membranes au cône de croissance. Pour répondre à ces questions, il faut coupler des expériences en dynamique (immunomarquage croisés, pulse-chase) et des analyses structurales fines. Ces analyses pourraient bénéficier d'autres techniques d'imagerie :

- Le suivi intra-cellulaire de molécules par quantum-dots (Sundara Rajan and Vu, 2006).
- L'utilisation du TIRF (total internal reflexion microscopy) et de l'imagerie combinée TIRF/FSM (Fluorescent Speckle Microscopy) ((Hu et al., 2007), (Medeiros et al., 2006))

En conclusion, il est possible de dresser un premier modèle du trafic au sein du cône de croissance du neurone d'hippocampe en culture, faisant intervenir L1 en présence ou non de son partenaire d'adhésion homophile. Beaucoup de travail reste à accomplir pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires gouvernant ces processus, et les interactions entre les différents systèmes adhésifs existants, et en premier lieu les autres Ig-CAM.

Fast Turnover of L1 Adhesions in Neuronal Growth Cones Involving Both Surface Diffusion and Exo/Endocytosis of L1 Molecules ^D ^V

Caroline Dequidt,* Lydia Danglot,[†] Philipp Alberts,[†] Thierry Galli,[†] Daniel Choquet,* and Olivier Thoumine*

*Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 5091, Institut François Magendie, Université Bordeaux 2, 33077 Bordeaux, France; and [†]Membrane Traffic in Epithelial and Neuronal Morphogenesis, Equipe Avenir Inserm, Institut Jacques Monod, Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 7592, Universités Paris 6 et 7, 75251 Paris, France

Submitted December 13, 2006; Revised May 7, 2007; Accepted May 18, 2007

Monitoring Editor: Paul Forscher

We investigated the interplay between surface trafficking and binding dynamics of the immunoglobulin cell adhesion molecule L1 at neuronal growth cones. Primary neurons were transfected with L1 constructs bearing thrombin-cleavable green fluorescent protein (GFP), allowing visualization of newly exocytosed L1 or labeling of membrane L1 molecules by Quantum dots. Intracellular L1–GFP vesicles showed preferential centrifugal motion, whereas surface L1–GFP diffused randomly, revealing two pathways to address L1 to adhesive sites. We triggered L1 adhesions using microspheres coated with L1–Fc protein or anti-L1 antibodies, manipulated by optical tweezers. Microspheres coupled to the actin retrograde flow at the growth cone periphery while recruiting L1–GFP molecules, of which 50% relied on exocytosis. Fluorescence recovery after photobleaching experiments revealed a rapid recycling of L1–GFP molecules at L1–Fc (but not anti-L1) bead contacts, attributed to a high lability of L1–L1 bonds at equilibrium. L1–GFP molecules truncated in the intracellular tail as well as neuronal cell adhesion molecules (NrcAMs) missing the clathrin adaptor binding sequence showed both little internalization and reduced turnover rates, indicating a role of endocytosis in the recycling of mature L1 contacts at the base of the growth cone. Thus, unlike for other molecules such as NrcAM or N-cadherin, diffusion/trapping and exo/endocytosis events cooperate to allow the fast renewal of L1 adhesions.

INTRODUCTION

Cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily (IgCAMs), including L1, play essential roles in the developing nervous system. Indeed, pathological mutations in the L1 gene are related to a variety of neurological disorders in humans, including mental retardation and hydrocephalus (De Angelis *et al.*, 1999). L1 knockout mice also show severe brain abnormalities (Kamiguchi *et al.*, 1998a; Itoh *et al.*, 2004). IgCAMs mediate axonal elongation, fasciculation, and guidance. These functions involve both homophilic and heterophilic adhesions between IgCAM members as well as anchoring of ligated receptors to the actin cytoskeleton, which allows for force transmission and enables neuronal growth cones to move forward (Suter *et al.*, 1998; Brummendorf and Lemmon, 2001).

L1-family IgCAMs are transmembrane proteins with an ectodomain formed of several FnIII and Ig-like repeats, responsible for parallel and antiparallel associations with a variety of ligands, and a conserved cytoplasmic tail mediating interactions with ankyrin (Tuvia *et al.*, 1997), ezrin–radixin–moesin members (Dickson *et al.*, 2002), the clathrin adaptor protein AP-2 (Kamiguchi *et al.*, 1998b), and postsynaptic density 95/disc-large/zona occludens domain proteins (Koroll *et al.*, 2001). By modulating these interactions, neurons can regulate the availability of IgCAMs at their surface and the mobility or anchoring of these receptors. For example, the tyrosine phosphorylation-dependent binding of neurofascin/L1 to ankyrin governs its lateral diffusion and coupling to the actin retrograde flow in growth cones (Garver *et al.*, 1997; Gil *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2003). Binding of L1 to AP-2 and the clathrin pathway via an YRSLE motif in its cytoplasmic tail enables L1 to be actively recycled in growth cones, being endocytosed in the central domain and exocytosed at the periphery (Kamiguchi and Lemmon, 2000). This mechanism generates a density gradient of L1 molecules that helps growth cones to progress over an L1-coated substrate (Kamiguchi and Yoshihara, 2001).

It is well established that L1 adhesiveness is regulated by trafficking, e.g., reducing L1 exocytosis by tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) silencing leads to impaired binding of L1-coated beads on PC-12 cells (Alberts *et al.*, 2003), whereas preventing L1 endocytosis by removing the neuronal RSLE sequence promotes L1-dependent cell aggregation (Long *et al.*,

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E06-12-1101>) on May 30, 2007.

^D ^V The online version of this article contains supplemental material at *MBC Online* (<http://www.molbiolcell.org>).

Address correspondence to: Olivier Thoumine (olivier.thoumine@pcs.u-bordeaux2.fr).

Abbreviations used: DIV, days in vitro; DRG, dorsal root ganglion; L1–Fc, L1 extracellular domain fused to human Fc; L1–GFP, L1 fused to GFP; MSD, mean squared displacement; QD, quantum dot.

2001). However, the actual interplay between L1 molecule trafficking and L1 homophilic adhesion remains unclear. In particular, does the formation of new L1/L1 bonds absolutely require directed exocytosis, or can it simply involve surface receptors that would diffuse randomly on growth cones? Are L1 adhesions at the tip of growth cones more stable than those formed at the rear? How many binding–unbinding events can occur before L1 molecules are endocytosed?

To answer these questions, we mimicked L1-specific contacts by using microspheres coated with purified L1-Fc in contact with neurons transfected with L1-green fluorescent protein (GFP). Using live imaging experiments, we show that L1 adhesions at growth cones form initially via L1 exocytosis and lateral diffusion, accompanied by a coupling to the actin flow. As they mature, L1 contacts continue to recycle through exchange with the membrane pool and endocytosis of L1 molecules.

MATERIALS AND METHODS

GFP-tagged L1 Constructs

For construction of full-length *L1-GFP*, GFP was first amplified by polymerase chain reaction (PCR) from pEGFPc1 (Clontech, Mountain View, CA) by using oligonucleotides inserting a thrombin cleavage site (ctggtagcccccaggatct) at the 3' end and BamHI sites at each ends. This "GFP–thrombin site" PCR product was purified, digested by BamHI, and inserted into the BamHI site of L1-mouse cDNA (L1-WT in pcDNA3; a kind gift from M. Schachner). This resulted in an L1-GFP construct where the N-terminal GFP could be cleaved by extracellular thrombin. For construction of L1 deleted of its intracellular region, L1 was first amplified by PCR from L1-mouse cDNA by using T7 oligonucleotide (upstream start codon) and a designed oligonucleotide (agtcgatctagtagtattggcaccctctgctgcg) inserting a stop codon after the transmembrane domain of L1. The PCR product was cloned by TA cloning, digested by NHEI and EcoRV. The NHEI–EcoRV fragment was subcloned in the NHEI–EcoRI sites of L1-GFP construction. This resulted in a GFP-tagged truncated form of L1 (1153 codons instead of 1259) called *L1-GFPΔCter*. *NrCAM-GFP* where the FnIII domains are replaced by GFP was a gift from J. Falk and C. Faivre Sarrailh (Falk *et al.*, 2004), the original rat neuronal cell adhesion molecule (NrCAM) clone being a gift of V. Bennett. Sequencing of the intracellular region and alignment against the mouse L1 sequence show that NrCAM bears an YSDAE motif in place of the YRSLE internalization motif in L1.

Biochemical Characterization of L1-GFP Proteins

COS-7 cells at a density of 3×10^5 /60-mm Petri dishes were transfected with L1-WT, L1-GFP, L1-GFPΔCter, or empty vector by using Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA), and they were cultured in DMEM containing 10% fetal calf serum. After 2 d, cells were rinsed in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and scraped in TSE buffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, and cocktail protease inhibitors [Roche Diagnostics, Mannheim, Germany]) after 30 min at 4°C. Lysates were then centrifuged at 13,000 rpm for 20 min, and the supernatant was frozen. Samples were boiled for 5 min in SDS sample buffer and separated on a 4–12% Bis-Tris NuPage gels (Invitrogen). Proteins were transferred onto 0.45- μ m nitrocellulose membranes and immunoblotted using rabbit antibodies against the L1 extracellular domain (1/2000; a gift from F. Rathjen), followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies (1/10 000; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) and developed using the enhanced chemiluminescence method (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom).

Production and Purification of L1-Fc

The *L1-Fc* construct composed of the full extracellular domain of L1 fused to the constant fragment of human IgG was a gift from T. Brummendorf (De Angelis *et al.*, 1999). Human embryonic kidney cells in four flasks of 150 cm² were transfected with L1-Fc by using FuGENE (Roche Diagnostics) and cultured for 4 d in DMEM containing 1% Ig-free serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Conditioned medium was collected, filtrated at 0.2 μ m, and incubated overnight at 4°C with 500 μ l of protein G-Sepharose (GE Healthcare). Beads were rinsed three times in PBS by centrifugation at 2500 rpm for 10 min, and they were placed in a 0.2- μ m column (Bio-Rad, Hercules, CA). L1-Fc was eluted for 1 min by using 500 μ l of 0.1 M glycine, pH 3.0, and fractions of 240 μ l were collected into tubes containing 10 μ l of 1 M Tris, pH 9.0, to buffer the pH at 7.2. Protein purity was assessed by gel electrophoresis followed by Coomassie staining, or by immunoblots using mouse anti-Fc (The Jackson Laboratory) as a primary antibody. Protein concentration of 150

μ g/ml was measured by a protein assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) as a standard.

Microsphere Coating

Latex microspheres (4- μ m sulfate; Ideal Latex) were coated with goat anti-human Fc or anti-rabbit Fc antibodies (The Jackson Laboratory) by using 10 μ g of antibody for 10 μ l of the 8% solids bead stock solution (overnight incubation at 4°C in 0.2 M borate buffer, pH 8.5). Beads were rinsed in borate buffer containing 0.3% globulin-free BSA (Sigma-Aldrich), and then they were incubated with 2 μ g of L1-Fc, human Fc (The Jackson Laboratory), or 5 μ l of rabbit anti-L1 for 3 h at room temperature, rinsed, and resuspended in 100 μ l of borate-BSA. Coated beads were kept on ice and used within 8 h.

Neuronal Culture, Transfection, and Incubation with Microspheres

Hippocampal neurons from embryonic day 18 Sprague-Dawley rat embryos were seeded on 15-mm polylysine-coated glass coverslips at a density of 10,000 cells/cm², and they were cultured on a layer of glial cells in Neurobasal medium supplemented with B27 (Invitrogen), as described previously (Goslin *et al.*, 1991). Two to 3 d after plating, neurons were transfected with L1-GFP, L1-GFPΔCter, NrCAM-GFP, or GFP by using a phosphate calcium method with 30 μ g of DNA for five coverslips (Xia *et al.*, 1996), and they were processed 48 h later. Cells were placed in 1 ml of culture medium supplemented with 1% BSA, 20 mM HEPES, and 10 μ l of the bead solution, left at 37°C for 0.5 h (except for optical tweezers experiments, where cells were processed immediately), and then rinsed three times in warm medium and mounted in an observation chamber, or fixed for bead counting. When scanning a 15-mm coverslip, one can find an average of 50 transfected cells, representing a transfection efficiency of ~0.5%. This was enough both in immunocytochemistry and live studies to obtain statistically meaningful samples.

Thrombin Treatment

Cells transfected with L1-GFP were treated with 0.1 μ M human thrombin (Sigma-Aldrich) at 20 U/ml for 100 s, and then they were rinsed with culture medium containing 50 μ M PPACK (Calbiochem, San Diego, CA), a highly selective thrombin inhibitor. This was done just before mounting cells for optical tweezers experiments, or after 0.5-h incubation with microspheres, in which case a perfusion system on the microscope was used in to follow the fluorescence baseline and recovery. Thrombin-treated cells were also allowed to recover up to 2 h, and then they were processed for L1-GFP surface labeling at various time intervals.

Optical Tweezers and Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

The setup combining optical tweezers and FRAP was described previously (Falk *et al.*, 2004; Thoumine *et al.*, 2006). Briefly, it consists of an inverted microscope (IX 70; Olympus, Tokyo, Japan) fed through its epifluorescence port by a Nd:YAG laser beam (Compass 1064-nm series; Coherent, Santa Clara, CA) and the 488-nm line of an argon laser (Innova 300; Coherent) with appropriate lenses, filter sets, and dichroic mirrors (Chroma Technology, Brattleboro, VT). The laser power at the back of the 100 \times /1.4 numerical aperture objective is 100 mW for optical trapping and 2.5 mW for photobleaching. Using a motorized stage (MarzHauser, Wetzlar, Germany), microbeads are captured and maintained on neuronal growth cones for 10 s. Images are acquired every 10 s with exposure times of 100–200 ms with a cooled charge-coupled device camera (HQ Cool Snap; Roper Scientific, Tinton, NJ). Using shutters (Uniblitz; Vincent Associates, Rochester, NY), we alternate between bright field and GFP illumination, achieved through a 75-W xenon lamp oriented at a 90° angle and reflected into the epifluorescence port by an infrared dichroic mirror (optical trap) or 70/30 beam splitter (FRAP). The camera and shutters are driven by the MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). For FRAP, a region of interest on a neuron expressing L1-GFP is brought to the position of the laser spot. After acquisition of the baseline level, the sample is bleached for 0.3 s on a 4- μ m-diameter area, and fluorescence recovery is recorded for 12 min, with progressively decreasing sampling times. Three optical trapping or FRAP sequences were run at best per coverslip, bringing each experiment duration to ~45 min. Temperature was maintained at 37°C with an air blower (WPI, Sarasota, FL) and an objective heater (Biopetechs, Butler, PA).

Quantum Dot (QD) Labeling and Tracking

One microliter of 655-nm QD conjugated with goat (Fab')₂ anti-mouse immunoglobulin (Ig)G (Quantum Dot) was incubated with 1 μ l of monoclonal anti-GFP (Roche Diagnostics) for 20 min, blocked with 1% casein (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and kept on ice for 1–2 d. After binding to microspheres, cells were incubated with the QD suspension (1:10,000) for 5 min in culture medium containing 0.3% BSA, and they were rinsed before mounting on the microscope. QDs were visualized using a 545- to 580-nm excitation filter, 590-nm dichroic mirror, and BA610-nm emission filter

(Chroma Technology). Digital images were recorded at a rate of 10 Hz for 100 s. QD positions were tracked using wavelet transform-based multidimensional analysis algorithms included in the MetaMorph software (Racine *et al.*, 2006), and trajectories were reconnected using routines written in the MathLab software (MathWorks, Natick, MA) described previously (Tardin *et al.*, 2003). Traces longer than 6 s were selected. The mean squared displacement was calculated for each trajectory and fit by linear regression on the first 3 s, giving an instantaneous diffusion coefficient.

Immunocytochemistry

For staining of total endogenous L1 or L1-GFP, cells were fixed for 10 min in warm 4% paraformaldehyde–4% sucrose in PBS, and the remaining active sites were saturated with 50 mM NH₄Cl in PBS for 15 min. Cells were permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS for 5 min, and nonspecific binding sites were blocked with 1% BSA in PBS for 30 min. Cells were incubated in PBS-BSA with 1:400 rabbit anti-GFP (Invitrogen) or 1:100 anti-L1 for 2 h, rinsed extensively, and incubated with 1:800 Alexa 568-conjugated goat anti-rabbit antibody (2 mg/ml; Invitrogen) for 1 h, and mounted in Vectashield (Vector Laboratories). To estimate the amount of endogenous L1 in nontransfected cells, we subtracted the staining obtained with the secondary antibody alone from the anti-L1 staining (Supplemental Figure 1).

To estimate the proportion of surface versus intracellular L1 molecules, L1-GFP-transfected cells were labeled using 1:400 rabbit anti-GFP as a primary antibody under permeabilized or nonpermeabilized conditions, respectively, and the fluorescent signals on growth cones were compared. For surface staining, neurons transfected for L1-GFP were incubated in 50 μl of culture medium containing 1% BSA and 1 μl of monoclonal anti-GFP (Roche) for 10 min at room temperature. The neurons were then rinsed and processed as described above without the permeabilization step.

For assessment of endocytosed receptors, neurons transfected with L1-GFP, L1-GFPΔCter, or NrCAM-GFP (comparisons made on the same batches) were incubated with 1:50 monoclonal anti-GFP at 4°C for 5 min. The cold condition is used to avoid massive internalization of primary antibody

complexes during the labeling period. Cells were then fixed immediately with paraformaldehyde or placed at 37°C for 15 min, allowing endocytosis to proceed. L1-GFP molecules remaining at the cell surface were efficiently blocked with a mixture of 1:20 unconjugated goat anti-mouse Fc (2 mg/ml; The Jackson Laboratory) and 1:20 Alexa 350-conjugated (irrelevant fluorophore) goat antibodies against both heavy and light chains mouse IgG (Invitrogen). Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 1 min before labeling with 1:800 Alexa 568-conjugated anti-mouse antibody. We selected neurons with intermediate L1-GFP expression levels, and we took images of the L1-GFP fluorescence and the anti-GFP immunostaining with constant exposure times. The Alexa 568/anti-GFP signal was then divided by the corresponding L1-GFP signal on the same growth cones, and the ratio was averaged.

RESULTS

Surface Expression and Exocytosis of L1-GFP Molecules

To distinguish L1 molecules expressed at the cell surface from the internal pool, we fused the GFP sequence to the N terminus of the full-length mouse L1 gene (*L1-GFP*), by using a linker that can be cleaved with thrombin. We also produced an L1-GFP receptor deleted of the intracellular domain, *L1-GFPΔCter* (Figure 1A), to abolish interactions with the cytoskeleton and the endocytotic pathway. Expression of both constructs in COS cells yielded protein products at the expected molecular weights ~200 kDa (Figure 1A). When transfected into rat hippocampal neurons at 3–4 d in vitro (DIV), L1-GFP molecules were distributed at the growth cone surface, and they also were present intracellu-

AQ:16

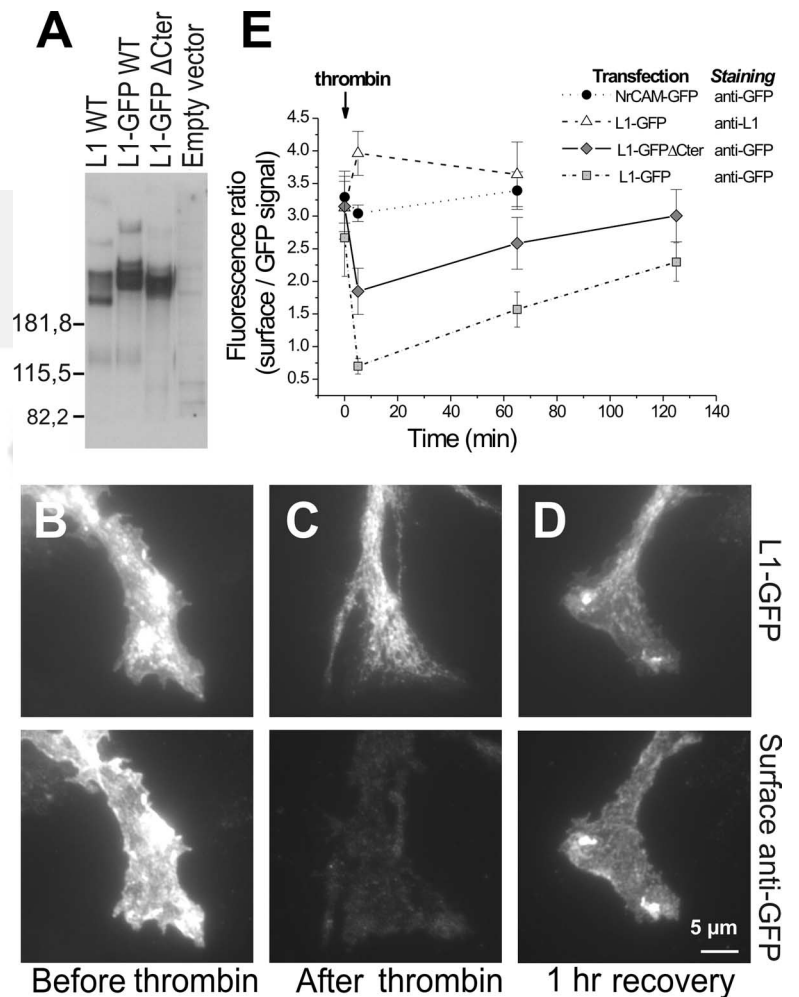


Figure 1. Biochemical characterization and distribution of L1-GFP fusion proteins. (A) L1-WT, L1-GFP, L1-GFPΔCter, or the empty vector were transfected into COS cells, and cell lysates were processed for immunoblotting with anti-L1. Note the shift in molecular weight between the various constructs and the absence of non-specific staining. Neurons transfected for L1-GFP, L1-GFPΔCter, or NrCAM-GFP were treated with thrombin for 100 s, and then they were rinsed and allowed to recover for selected time intervals. Cells were then incubated live with anti-GFP or anti-L1 antibodies for 5 min, fixed, and stained with secondary antibodies conjugated to Alexa 568. (B–D) Representative images of growth cones from cells transfected for L1-GFP (top) and surface stained with anti-GFP (bottom), before (B), right after (C), or 1 h after (D) thrombin treatment. (E) Time course of surface fluorescence recovery after thrombin treatment at time zero, for all conditions. Data are expressed as the average ± SEM of the ratio of Alexa 568/GFP signal for at least 10 growth cones in each condition. Dashed lines are linear regressions through the data and give the basal export rates of L1 molecules to the growth cone surface (0.012 and 0.0097 min⁻¹ for L1-GFP and L1-GFPΔCter, respectively).

C. Dequidt *et al.*

larly at the base of growth cones (Figure 1B). L1-GFP was also expressed at high levels within the cell body, in a perinuclear area likely corresponding to the synthesis and secretion pathway (Supplemental Figure 1B). By comparing detergent-permeabilized and -nonpermeabilized L1-GFP-expressing cells immunostained with anti-GFP antibodies, we estimated that $43 \pm 9\%$ of L1-GFP ($n = 16$ cells) and $23 \pm 3\%$ of L1-GFP Δ Cter ($n = 10$) at growth cones were surface associated. By comparing L1-GFP-positive cells to nontransfected counterparts both immunostained with anti-L1 antibodies (Supplemental Figure 1), we estimate that the ratio of exogenous L1-GFP protein to that of endogenous L1 is 5 ± 1 at the surface ($n = 10$ cells). Such overexpression does not perturb the correct targeting and axonal compartmentalization of NgCAM, the chick homologue of L1, in the same cultures (Sampo *et al.*, 2003; Wisco *et al.*, 2003).

To evaluate the rate and spatial distribution of L1 exocytosis, L1-GFP-transfected neurons were briefly treated with thrombin to cleave the GFP-tag of surface L1-GFP molecules, and then the neurons were allowed to recover. We observed an immediate 80% loss of surface staining (Figure 1, C and E), with a simultaneous 40% decrease in L1-GFP signal preferentially from the lamellipodium. The 60% leftover was mainly due to the presence of intracellular L1-GFP in the central domain (Figure 1C). Anti-GFP surface staining came back to baseline in several hours with a characteristic rate on the order of 0.01 min^{-1} (Figure 1, D and E), revealing a progressive exocytosis of L1-GFP. An enrichment of newly exported L1-GFP molecules at the periphery of growth

cones, especially in ruffles, was sometimes observed (Figure 1D). Thrombin acted specifically, because it affected neither the distribution of surface L1 nor that of NrCAM bearing a noncleavable GFP-tag (Figure 1E). Although hippocampal neurons express thrombin receptors (Yang *et al.*, 1997), thrombin can induce significant effects only when applied at much higher concentrations and for longer times than the times used here (Brewer, 1996; Donovan *et al.*, 1997). Indeed, thrombin did not alter growth cone motility or cause neurite retraction in our conditions (Figure 5). The L1-GFP Δ Cter mutant was slightly less expressed at the cell surface than wild-type L1, as reflected by a less efficient thrombin cleavage, but it showed a similar export dynamics to the growth cone surface (Figure 1E). This agrees with the finding that mutated NgCAM molecules go to the axonal surface even in the absence of interactions with intracellular partners (Boiko *et al.*, 2007).

Intracellular L1 Molecules Undergo Polarized Trafficking in Growth Cones

We further used thrombin to enhance the visualization of internal L1-GFP-rich vesicles in growth cones. Most vesicles were stuck at the base of growth cones, with undetectable motion (Figure 2, A and B, arrowheads). However, we also observed the rapid and highly directed movement of L1-GFP-rich vesicles, in either the retrograde or anterograde directions (Figure 2, A and B, circles). Vesicles were found to move at high speed along neurites and into the central area (Figure 2A), whereas those in the lamellipodium moved

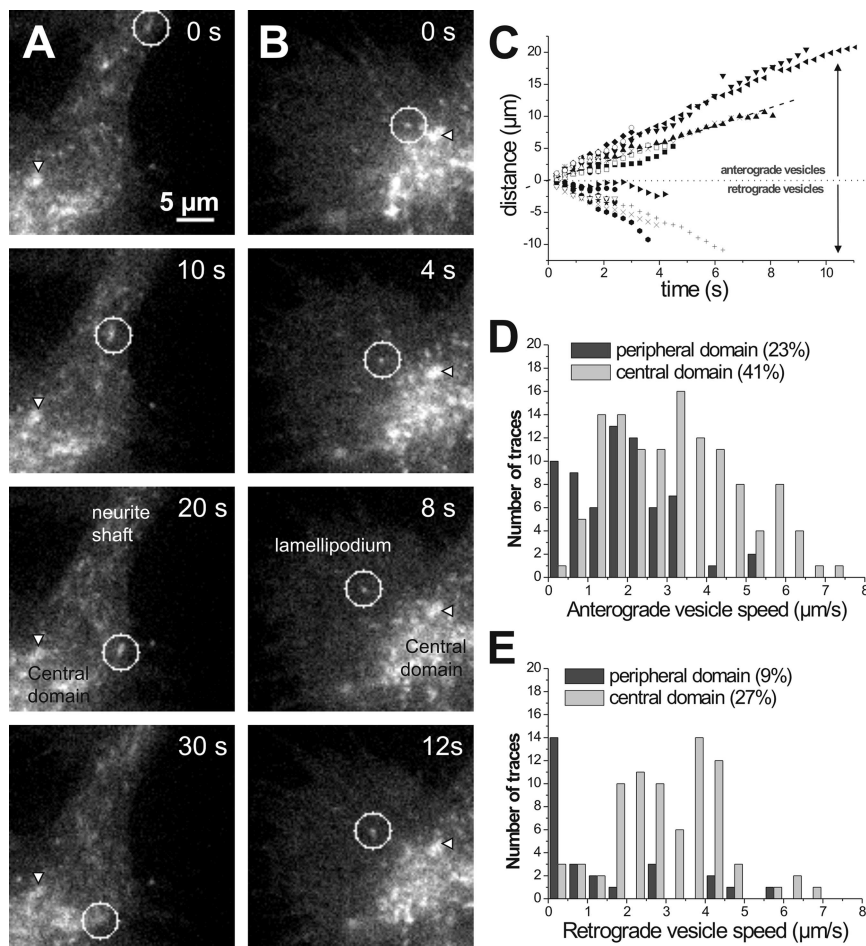
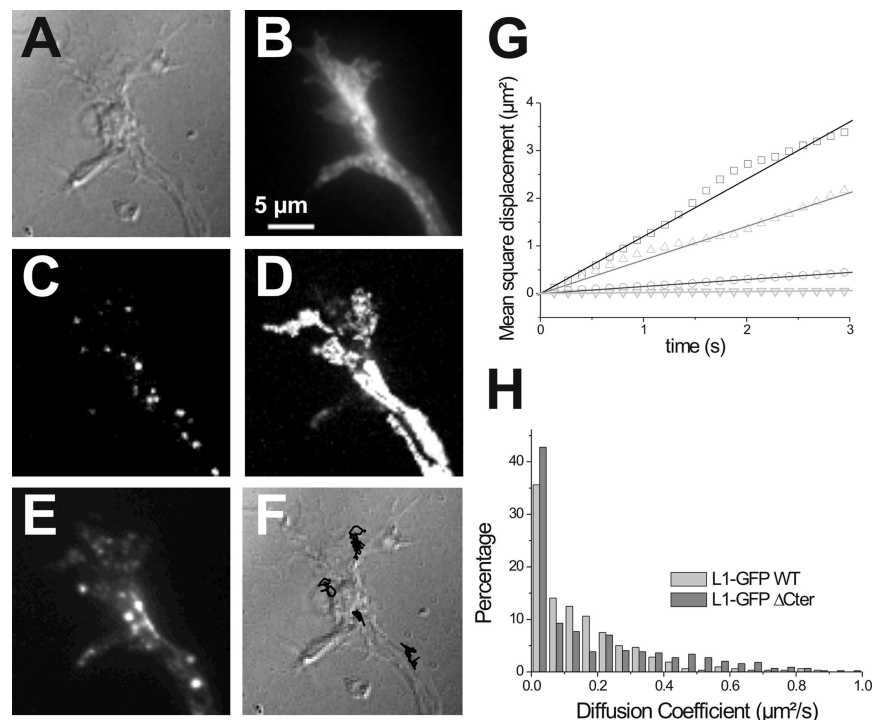


Figure 2. Directed motion of L1-GFP-rich vesicles within growth cones. Neurons transfected with L1-GFP were treated with thrombin for 100 s, and then they were rinsed and observed under the microscope. The distribution of intracellular L1-GFP fluorescence within growth cones was filmed at a rate of three to five images per second. The majority of L1-GFP-rich vesicles stayed confined at the base of the growth cone (arrowheads). (A and B) Representative examples of two vesicles moving forward on the same growth cone (circles), one in the neurite shaft (A) and the other in the lamellipodium (B). (C) The position of such vesicles was tracked, and their displacement was plotted over time. The relationship was fairly linear, the slope of which being taken as the vesicle velocity. The velocity of both anterograde (D) and retrograde (E) moving vesicles was computed, and it is plotted as histograms. By applying an intensity threshold on the L1-GFP fluorescence image, we distinguished a rather uniform less intense zone at the periphery of growth cones (the peripheral domain), and a more intense zone rich in L1-GFP vesicles at the base of growth cones (the central domain). Moving vesicles are classified according to their presence in either of these two areas (black and gray bars, respectively).

Figure 3. Random diffusion of individual L1-GFP molecules at the growth cone surface. Neurons transfected for L1-GFP or L1-GFP Δ Cter were labeled with anti-GFP-coated quantum dots. (A) Differential interference contrast (DIC) image. (B) L1-GFP image. (C) Instantaneous image of QDs bound to the growth cone. (D) Image of the maximum intensity from the QD channel detected for each pixel integrated along a 1-min sequence, representing the global area explored by QD. (E) Image of the average intensity from the QD channel detected for each pixel along a 1-min sequence, representing the preferential zones of QD immobilization. (F) Examples of four trajectories superimposed on the DIC image. (G) Mean squared displacement versus time for typical trajectories, from immobile to very mobile. The linear fits give the corresponding diffusion coefficients. (H) Histogram of the diffusion coefficients for L1-GFP and L1-GFP Δ Cter computed from 537 and 688 traces, respectively.



more slowly (Figure 2B). Overall, there was a preference for anterograde motion (64% of vesicles) versus retrograde motion (36%), especially in the growth cone lamellipodium (27 vs. 9%, respectively), indicating a selective transport of L1-rich vesicles toward the growth cone periphery (Figure 2D). Indeed, we sometimes saw vesicles originating from the base of growth cones and disappearing at their periphery, possibly by fusion with the plasma membrane (Supplemental Movie 1). Vesicles in the neurite shaft and central domain moved at the same speed in both anterograde and retrograde directions, with an average velocity of 3 μm/s (Figure 2, D and E), which compares well with that of microtubule motors. Furthermore, the very straight trajectories (Figure 2C) suggest that these L1-GFP vesicles are transported along dynamic microtubules, which have been reported to invade the growth cone lamellipodium (Dent and Gertler, 2003). Indeed, in the presence of the microtubule-depolymerizing drug nocodazole, vesicles seemed to exhibit higher Brownian diffusion, and very few adopted a directed movement (data not shown). Regardless of the direction, vesicles moved more slowly in the lamellipodium than in the neurite shaft, with average velocity around 1 μm/s close to that reported for *N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino)styryl)pyridinium dibromide loaded or VAMP-2-containing vesicles toward the growth cone peripheral domain in dorsal root ganglion (DRG) neurons (Tojima *et al.*, 2007). This suggested a different transport mechanism or a steric difficulty to progress through a dense actin network moving backward. In support of the latter hypothesis, treatment with the actin-depolymerizing drug cytochalasin D accelerated vesicle motion (Supplemental Movie 2). We observed similar velocities for L1-GFP and L1-GFP Δ Cter, further indicating that this mutant underwent normal export. We next assessed whether this polarized trafficking of L1 was also present at the cell surface.

L1 Molecules Diffuse Randomly on the Growth Cone Surface

To visualize the lateral motion of plasma membrane L1 molecules, we labeled a subset of surface-associated L1-GFP molecules by using anti-GFP-coated QDs (Supplemental Movie 3). QDs bound exclusively to transfected neurons, and they moved over the growth cone area (Figure 3, A-E). Their trajectories were automatically tracked (Figure 3F) and analyzed by calculation of the mean squared displacement (MSD) over time (Figure 3G). The MSD was fairly linear over time, indicating a predominance of Brownian motion. This was in agreement with a recent study showing that neurofascin diffuses randomly in the distal axon at a similar developmental stage (4 DIV) (Boiko *et al.*, 2007). We never observed any clear directionality, which would occur as a parabolic MSD (Sheetz *et al.*, 1990). As a global estimation of lateral mobility, we quantified the instantaneous diffusion coefficient of individual trajectories, taken as the slope of the MSD (Figure 3H). Because of the heterogeneity of behaviors, the data show up as a distribution of diffusion coefficients (Figure 3G). The average value for L1-GFP was $0.25 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 537$ trajectories), slightly greater than the value reported for neurofascin by using 1-μm latex beads, likely owing to probe size (Boiko *et al.*, 2007). The distribution for the L1 Δ Cter mutant was shifted to higher diffusion values, with a mean diffusion coefficient of $0.29 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 689$ trajectories). Setting a threshold of $0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$, we defined an immobile fraction which reaches 30% for L1-GFP and 40% for L1-GFP Δ Cter. A fraction of immobile QDs (roughly 50%) was distributed at the base of growth cones (Figure 3E) and partially colocalized with clathrin-DsRed clusters (data not shown), suggesting that they were associated with endocytotic compartments. However, the colocalization of immobile QD with clathrin-coated pits was not total, because QDs may sterically restrict the accessibility of L1-GFP to these compartments, or because L1-GFP mole-

C. Dequidt *et al.*

cules are trapped in other compartments (e.g., by interaction with immobile cytoskeletal components).

L1-Fc and Anti-L1-coated Microspheres Adhere Specifically to L1-expressing Neurons

We then assessed the relative contributions of these two apparently coexisting pathways, i.e., directed exocytosis versus membrane diffusion, in the formation of nascent L1-dependent adhesions. To create L1-specific contacts, we purified a recombinant L1-Fc molecule making up the extracellular domain of L1 fused with human Fc (Figure 4C). We also used antibodies against the extracellular domain of L1 as a positive control, and human Fc alone as a negative control. Microspheres coated with L1-Fc but not with human Fc adhered stably to the surface of untransfected cells, indicating adhesion specificity (Figure 4, A and B). Beads coated with anti-L1 also adhered strongly, revealing the presence of endogenous L1. Neurons transfected with L1-GFP bound ~2 times more L1-Fc and anti-L1-coated microspheres than untransfected cells or cells transfected with GFP alone (Figure 4, A and B), indicating that the L1-GFP

protein was expressed at the cell surface and could form homophilic interactions with L1-Fc ligands. Moreover, both anti-L1-coated and L1-Fc-coated microspheres recruited L1-GFP molecules (Figure 4A). Only a fraction of microspheres (roughly 30%) showed significant accumulation of L1-GFP molecules: this heterogeneity may reflect variability in L1-Fc ligand coating or availability of L1-GFP molecules. For example, beads at the cell body generally recruited less L1-GFP than at the growth cones (Figure 4A), possibly owing to, respectively, a lower concentration of L1-GFP at the cell surface (Supplemental Figure 1C) or a reduced binding due to a lack of selective L1-GFP export (see next paragraph). We quantified an enrichment factor as the fluorescence level within bead contacts divided by the control level on adjacent regions, which reaches a value of ~2 at equilibrium.

The Early Accumulation of L1 at Adhesive Contacts Partially Relies on Exocytosis

To probe the early phase of L1-GFP accumulation at adhesive contacts, we placed L1-Fc- or anti-L1-coated microspheres on motile growth cones with optical tweezers, and we monitored the redistribution of L1-GFP by fluorescence imaging (Supplemental Movie 4). As a negative control, we used microspheres coated with N-cadherin-Fc (Thoumine *et al.*, 2006). Beads adhered firmly and started to move rearward, and then they slowed down as they reached the base of the growth cones (Figure 5, A and B). The initial retrograde velocity (4 $\mu\text{m}/\text{min}$) was relatively independent of ligand coating (Figure 5E). That velocity corresponded closely to the actin flow rate (Diefenbach *et al.*, 2002), suggesting that beads were coupled to the actin cytoskeleton. Meanwhile, we observed a progressive accumulation of L1-GFP fluorescence around L1-Fc- and anti-L1-coated beads, reaching a plateau in a few minutes, whereas microspheres coated with N-cadherin accumulated significantly less signal (Figure 5C). The instantaneous enrichment factor was fit by an equation derived from first-order chemical kinetics (Figure 5C), giving a characteristic accumulation rate in units of minutes^{-1} (Table 1). The rates of L1-GFP accumulation at L1-Fc beads was, respectively, 4 and 14 times larger than for microspheres coated with anti-L1 or anti-GFP antibodies (Table 1). This demonstrated high ligand specificity in the recruitment of L1 molecules, with L1-Fc likely inducing stronger activation than nonperturbing antibodies.

To determine the compartments (surface vs. intracellular) involved in such accumulation of L1 molecules around microspheres, cells were pretreated with thrombin for 1 min before placing the microspheres on growth cones, to initially remove surface fluorescence. We still observed a notable accumulation of L1-GFP around beads coated with L1-Fc and anti-L1 antibodies, indicating a significant contribution from newly exocytosed L1-GFP molecules. Normalization of the L1-GFP signal at bead contacts by a control level on the same growth cone (enrichment factor) compensates for photobleaching and/or basal increase in L1-GFP outside bead contacts and measures the true accumulation of L1-GFP on the bead surface. Given the relatively large diameter of the bead (4 μm) with respect to the size of the growth cone (10–15 μm), we cannot tell with precision whether exocytosis occurs directly at the bead contact or nearby, followed by fast diffusion. However, in the continuous presence of thrombin, we occasionally observed the sudden disappearance of vesicles at L1-Fc microspheres, suggesting that they were fusing with the plasma membrane directly at the bead contact (Supplemental Movie 6). Control beads coated with Ncad-Fc exhibited some residual accumulation in L1-GFP

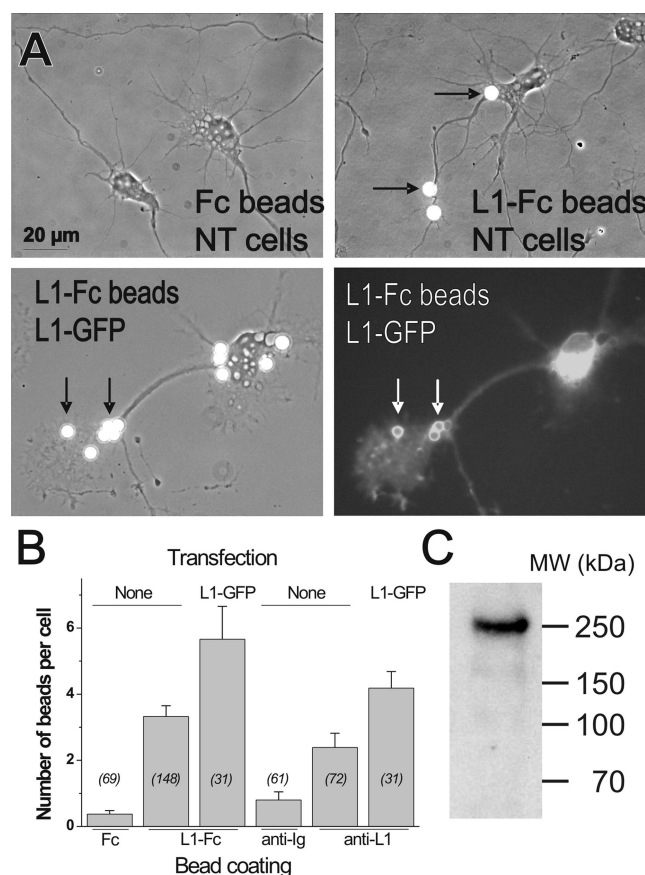
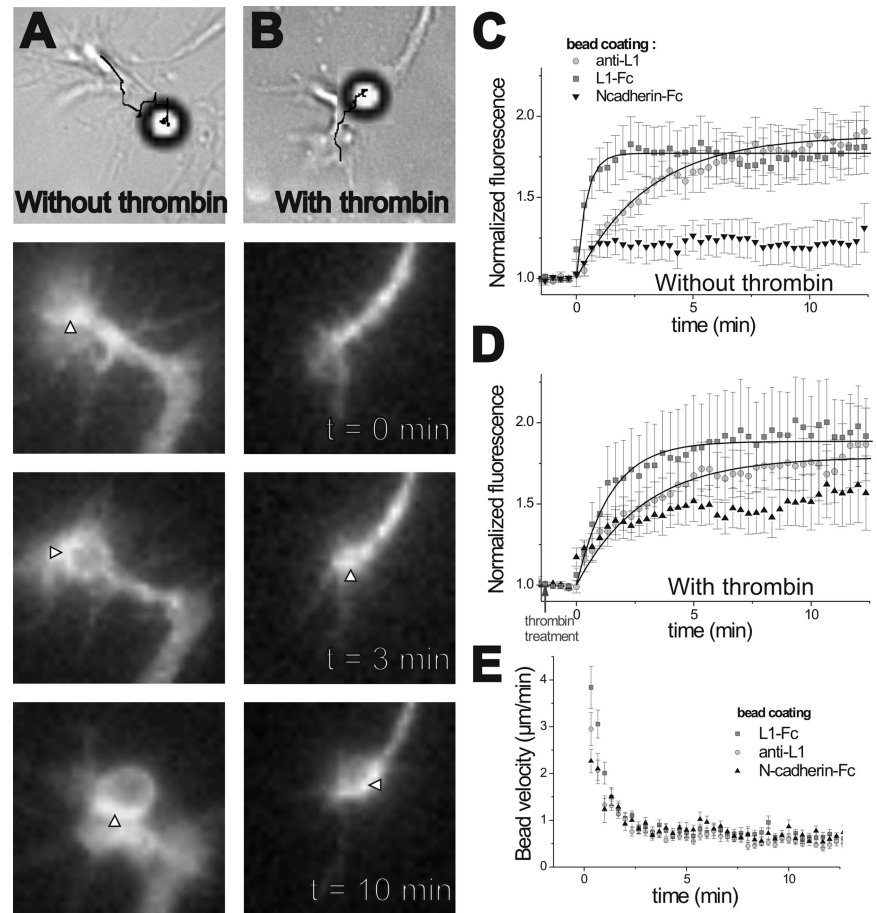


Figure 4. Specific binding of L1-Fc and anti-L1-coated microspheres to neurons. (A) Untransfected neurons (NT) or neurons transfected for L1-GFP were incubated for 0.5 h with latex microspheres coated with human Fc, L1-Fc, or anti-L1 antibodies, and then they were rinsed and fixed. Note the accumulation of L1-GFP fluorescence around L1-Fc- or anti-L1-coated microspheres (white arrows). (B) The number of beads bound per cell in each condition is expressed as mean \pm SEM, with the number of cells examined in italics. (C) The purified L1-Fc protein was run on a polyacrylamide gel and immunoblotted with antibodies against L1, showing migration at the expected molecular weight.

Figure 5. Microspheres move rearward on growth cones and progressively accumulate L1-GFP molecules. Microspheres coated with L1-Fc, Ncad-Fc, or antibodies against L1 were placed for 10 s at the periphery of growth cones from L1-GFP-transfected neurons, by using an optical trap. (A and B) The movement of the bead and the fluorescence accumulation at the bead contact (arrowheads) were followed for 10 min. The black trace on the white field upper image indicates the bead trajectory, and the bead position is shown at the end of the experiment (for better contrast, we superimposed the white field image of the bead to a DIC image of the growth cone obtained at the end of the sequence). Cells were either left untreated (A) or pretreated with thrombin for 1 min, and then they were rinsed in the presence of PPACK before optical tweezers manipulation (B). The fluorescence level around the bead was normalized by that on adjacent regions and plotted over time for untreated cells (C) or cells pretreated with thrombin (D). Data are expressed as mean \pm SEM, and they are fit with a first-order kinetics model (plain curves) (Thoumine *et al.*, 2006). (E) The instantaneous bead velocity is plotted over time for the different bead coatings, pooling data from conditions with or without thrombin, which did not differ in terms of velocity. The number of experiments (between 10 and 20) is given in Table 1.



after initial thrombin treatment (Figure 5D), due to the fact that microspheres were progressively reaching the base of growth cones rich in L1-GFP vesicles. These experiments represent the nonspecific component, and fitting the data would give recruitment rates that are not meaningful.

The steady-state fluorescence accumulation was similar in the absence and presence of thrombin, but we cannot directly compare these equilibrium values because the normalization is based on a different internal control for each condition (total vs. intracellular receptors outside bead contacts). More informative are the accumulation rates. Indeed, L1-GFP molecules accumulated approxi-

mately twofold slower at L1-Fc beads in the presence of thrombin but still much faster than the baseline export rate outside bead contacts (Table 1), indicating preferential exocytosis at L1-Fc adhesions. The effect was less pronounced for anti-L1-coated beads (Table 1), suggesting some ligand specificity in this export of L1 molecules. If one considers membrane diffusion and trafficking as two parallel pathways, the overall accumulation rate in the absence of thrombin should be the sum of that due to exocytosis (in the presence of thrombin) and that due to lateral motion. We can thus deduce that lateral diffusion and exocytosis contribute equally to L1 molecule recruitment at L1-Fc contacts.

Table 1. Rates of accumulation of L1-GFP molecules at L1-Fc, anti-L1-, or anti-GFP-coated microspheres, in the presence (+) or absence (-) of initial thrombin cleavage

Ligand	Thrombin cleavage					
	-	-	-	+	+	+
k_{on} (min ⁻¹)	L1-Fc 1.30 \pm 0.35	Anti-L1 0.32 \pm 0.05**	Anti-GFP 0.09 \pm 0.02****	L1-Fc 0.63 \pm 0.09*	Anti-L1 0.23 \pm 0.05	No bead 0.012
n	17	19	13	11	13	NA

The data for anti-GFP beads is taken from Thoumine *et al.* (2005). The rate for the no bead condition is calculated from immunostaining of surface anti-GFP after thrombin cleavage (see Figure 1E), from which we could not calculate a variance. Data are expressed as mean \pm SEM, with n representing the number of beads. NA, not applicable. Rates were found to be statistically different by ANOVA and compared with the L1-Fc condition without thrombin by Tukey's test (*p < 0.05; **p < 0.01; ****p < 0.001).

L1 Molecule Exocytosis Does Not Occur at Mature L1 Adhesions

To assess whether exocytosis was also occurring in stable L1-based adhesions, we incubated L1-GFP-transfected neurons with L1-Fc and anti-L1-coated beads for 0.5 h. We then selected areas with beads showing L1-GFP accumulation, perfused cells with thrombin for 1 min, and monitored L1-GFP distribution at bead contacts after washing (Figure 6A and Supplemental Movie 6). Treatment with thrombin caused a rapid 60% drop of fluorescence signal around beads, corresponding to the cleavage of the GFP-tag on L1-GFP-associated with beads at the cell surface (Figure 6B). After washing, the fluorescence at bead contacts recovered very slowly for both types of beads, revealing almost no detectable exocytosis of L1-GFP molecules. We took care to image at a sufficiently slow rate and with high pixel binning so as to cause minimal photobleaching during image acquisition. Furthermore, the lack of recovery was not due to the presence of persistent thrombin, because we added in the washing buffer a highly selective thrombin inhibitor (PPACK), which totally blocks the GFP cleavage (Figure 6B). Thus, L1 molecules are no longer exocytosed at stable L1-contact sites. This begged the question of whether receptor recycling could still occur in mature L1 adhesions.

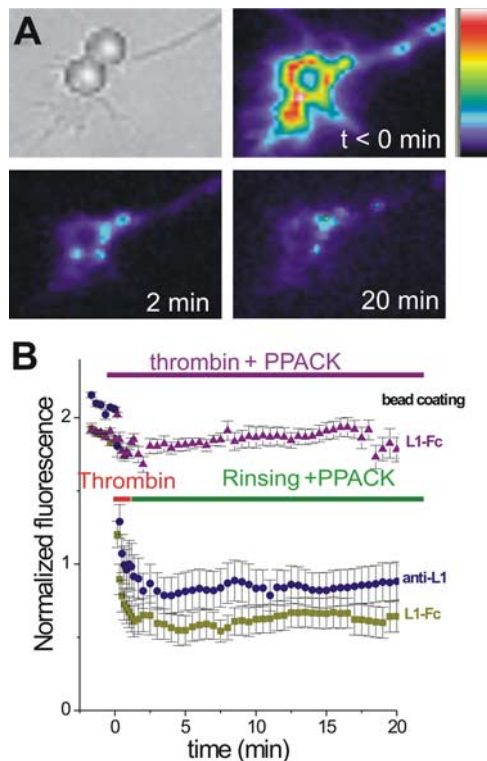


Figure 6. Lack of fluorescence recovery at L1-GFP-rich contacts after GFP cleavage by thrombin. (A) Neurons transfected for L1-GFP were incubated for 0.5 h with anti-L1- or L1-Fc-coated microspheres, leading to fluorescence accumulation around beads. Cells were treated with thrombin for 100 s, resulting in a dramatic decrease in fluorescence around beads, and then they were rinsed with fresh buffer containing a highly selective thrombin inhibitor (PPACK) and imaged for 20 min. (B) The enrichment factor (bead/control area) is plotted over time for L1-Fc and anti-L1 beads, thrombin being applied at time 0. In some experiments (triangles), cells were treated with thrombin + PPACK for 20 min. Data from 15 to 18 individual beads are expressed as mean \pm SEM.

At Equilibrium, L1/L1 but Not Anti-L1/L1 Adhesions Quickly Turnover

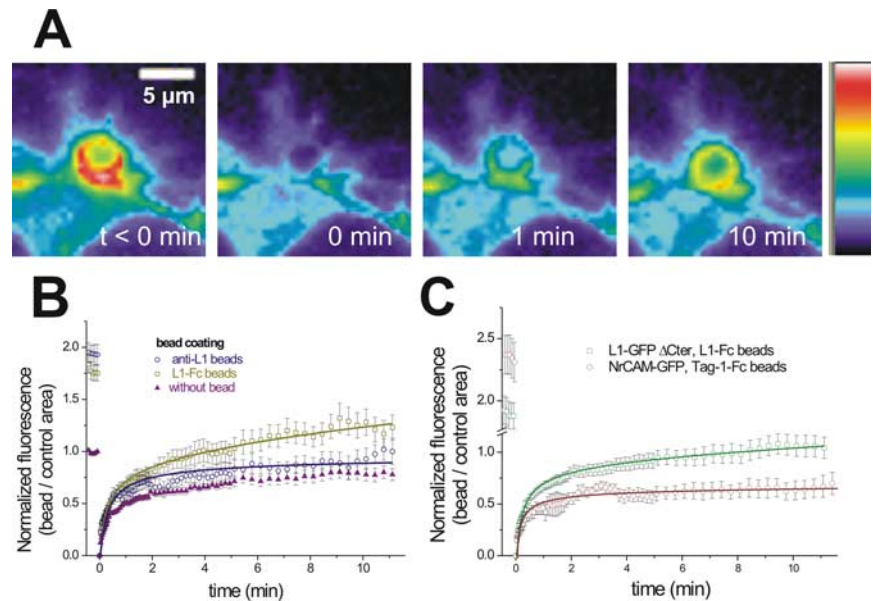
To investigate whether stable L1-dependent adhesions were capable of turnover, we allowed L1-Fc or anti-L1-coated beads to stay in contact with neurons for 0.5 h, leading to equilibrium accumulation of L1-GFP around beads. The enrichment factor was, respectively, 1.8 and 2 for L1-Fc and anti-L1-coated beads, corresponding well to the steady-state values obtained from recruitment experiments (Figure 5C). We then selectively photobleached bead-to-cell contacts by using a defocused laser spot precisely matching the bead diameter, and we measured the fluorescence recovery in the same bead area (Figure 7A), a protocol previously used to estimate N-cadherin recycling rates (Thoumine *et al.*, 2006). We compared these experiments with similar control recordings performed on neurites or growth cones (no bead). The difference between the two conditions (bead vs. no bead) is expected to reflect the specific behavior of bound receptors at the bead contact. Indeed, for L1-Fc beads the signal increased in two steps (Figure 7B): 1) a rapid phase during the first 2 min, superimposable to the no-bead condition, likely reflecting the diffusion of unbound and intracellular receptors; and 2) a slower phase reaching higher levels than on control areas (1.3 in 12 min), indicating that bleached L1-GFP molecules initially trapped by the L1-Fc-coated beads were progressively replaced by fresh L1-GFP. The data were fitted by a diffusion-reaction model (Thoumine *et al.*, 2006), allowing the characterization of the equilibrium turnover rate of L1-L1 homophilic bonds (Figure 7B). In contrast, the second recovery phase was almost absent for beads coated with anti-L1 antibodies, which exhibited fourfold lower turnover rates attributed to the intrinsic stability of antibody-antigen bonds (Figure 7C). A similar behavior was observed for microspheres coated with anti-GFP antibodies (data not shown). Thus, there is a selective turnover of L1-L1 adhesions at equilibrium.

Endocytosis Is Involved in the Turnover of Stable L1-L1 Adhesions

We finally asked the question of whether endocytosis could be implicated in the turnover of mature L1 adhesions. For this, we made an L1-GFP construct deleted of its intracellular domain, to prevent interactions with the endocytotic pathway (Kamiguchi *et al.*, 1998b). The L1-GFP Δ Cter protein, which carries the proper signal peptide, was correctly addressed to the cell surface (Figure 8, A and B), and it was recruited around L1-Fc-coated microspheres (enrichment factor = 1.9 ± 0.1 ; $n = 20$ beads), showing that it retained homophilic binding activity, as reported previously (Wong *et al.*, 1995). Using an antibody feeding assay, we compared the endocytosis of L1-GFP and L1-GFP Δ Cter molecules. After a 15-min internalization period, the typical time course of a FRAP experiment, newly endocytosed L1-GFP molecules were found as discrete spots localizing mainly in the central region of the growth cone (Figure 8, C and D). There was a significant 30% decrease in the internalization of L1-GFP Δ Cter molecules in this region, compared with wild-type L1-GFP molecules (Figure 8, C-E).

We then carried out FRAP experiments using the L1-GFP Δ Cter construct at L1-Fc bead contacts (Figure 7C). L1-GFP Δ Cter molecules recycled approximately threefold more slowly than wild-type counterparts (Table 2). This effect may implicate differences in lateral mobility, surface expression, or endocytosis rate, which all potentially contribute to the recycling of L1 adhesions. The fact that L1-GFP Δ Cter shows increased surface diffusion should increase

Figure 7. Rapid turnover of L1 molecules within L1–Fc bead contacts at equilibrium. Neurons transfected for L1–GFP or L1–GFP Δ Cter were incubated for 0.5 h with anti-L1- or L1–Fc-coated microspheres, which recruited L1–GFP up to saturation. The L1–GFP signal on microspheres or on adjacent regions was photobleached at time 0, and the recovery of fluorescence was followed for 12 min. (A) Time sequence of a typical FRAP experiment. (B) Normalized enrichment factor over time. Data are expressed as mean \pm SEM, and the plain curves are fits with a diffusion-reaction model (Thoumine *et al.*, 2006). In this analysis, we continue using the enrichment factor (ratio bead/control area), starting with a prebleach value of ~ 1.8 , and reason essentially on the 80% fraction representing the L1–GFP specifically accumulated at the bead surface. When we photobleach the whole L1–GFP signal at a bead contact, we bleach the 100% fraction, which behaves like L1–GFP outside the bead contact (intracellular + unbound molecules), and which recovers rapidly (no bead curve). We simultaneously bleach the 80% L1–GFP molecules associated with the bead contact, and this fraction recovers more slowly (second regime) for L1–Fc beads. In the case of anti-L1 beads, it does not recover at all, the anti-L1 curve staying at the same level as the “no bead” condition. This demonstrates that these receptors are permanently immobilized by antibodies on the cell surface. (C) FRAP curves for L1–GFP Δ Cter at L1–Fc contacts in hippocampal neurons and NrCAM–GFP at TAG-1 bead contacts in B104 neuroblastoma cells. The turnover rates calculated from the model are given in Table 2 with the corresponding number of experiments.



the L1–GFP Δ Cter renewal rate and not the contrary. In addition, the lower availability of L1–GFP Δ Cter mutant at the cell surface should accelerate the adhesion turnover rate, by displacing the ligand–receptor binding reaction toward faster dissociation. Thus, the reduced endocytosis of L1–GFP Δ Cter caused by a lack of interaction with the endocytotic pathway may be the primary mechanism of its reduced turnover rate at L1–Fc contacts. The fact that the modest 30% decrease in endocytosis rate for L1–GFP Δ Cter measured outside bead contacts is paralleled by a threefold decrease in turnover rate suggests a nonlinear response, in which L1 molecules trapped at L1–Fc microspheres, could undergo higher endocytosis than free molecules, as reported to occur for ligand-bound L1 in a phosphorylation-dependent manner (Schaefer *et al.*, 2002). Internalization would then represent a driving force that promotes unbinding by making L1 molecules selectively disappear from the membrane.

To further examine the role of L1 endocytosis in adhesion turnover and establish the specificity of the L1–L1 interaction in comparison to other IgCAMs, we used an NrCAM–GFP construct, which shows high homology to L1 in the intracellular domain except that it bears an YSDAE sequence in place of the YRSLE AP-2 binding motif (Falk *et al.*, 2004). NrCAM–GFP was indeed less internalized than both L1–GFP and L1–GFP Δ Cter (Figure 8C). We also measured the adhesion turnover rate of NrCAM–GFP by reanalyzing previous FRAP experiments using TAG-1–Fc coated beads (Falk *et al.*, 2004). TAG-1 is a member of the IgCAM family showing homology with the L1 extracellular domain, and it is a natural ligand for NrCAM. We monitored a complete absence of recycling of NrCAM–GFP at TAG-1–Fc bead contacts (Figure 7C and Table 2). Although a possible difference in affinity between the NrCAM–TAG-1 and L1–L1 interactions may also affect turnover rate, this finding represents a strong evidence for the implication of endocytosis in the recycling of L1 adhesions.

DISCUSSION

Validation of the Experimental System

Mutations in the L1 gene that impair L1 homophilic adhesion are associated with severe brain pathologies in humans (De Angelis *et al.*, 1999), hydrocephalus in certain strains of knockin mice (Itoh *et al.*, 2004), and misplacement of neurons in *Caenorhabditis elegans* (Sasakura *et al.*, 2005). Thus, considering the importance of L1 adhesion in axonal migration and targeting (Kamiguchi *et al.*, 1998a; Brummendorf and Lemmon, 2001), we focused here on the dynamics of L1–L1 interactions in the growth cone. We cultured primary hippocampal neurons, and we transfected them with L1–GFP to monitor L1 molecule redistribution in various assays. L1 is detectable as mRNA in the hippocampus (Horinouchi *et al.*, 2005), whereas there are contrasting results concerning the presence of L1 protein (Miller *et al.*, 1993; Munakata *et al.*, 2003), probably depending on antibody reactivity, staining protocols, or mouse strains. Nevertheless, L1 plays a functional role in this brain region (Itoh *et al.*, 2005). L1–GFP molecules were correctly expressed at the cell surface, and they could be endocytosed and exocytosed with rates similar to those measured previously in DRG neurons by using pulse-chase experiments with antibodies against endogenous L1 (Kamiguchi and Lemmon, 2000), revealing the functionality of the L1–GFP protein. We mimicked L1-specific contacts by using microspheres coated with L1–Fc or anti-L1 antibodies, allowing a precise control of the type of ligands presented to neurons and of the initial time of the interaction (Pollerberg *et al.*, 1990). We confirmed that the turnover rates we measured on microspheres correlated well with those obtained for spontaneous neuronal adhesions formed in slightly older cultures (Supplemental Figure 3). L1–GFP accumulated at L1–Fc-coated microspheres, indicating a preservation of homophilic binding despite the presence of a GFP-tag at the N terminus. This was somewhat expected,

C. Dequidt *et al.*

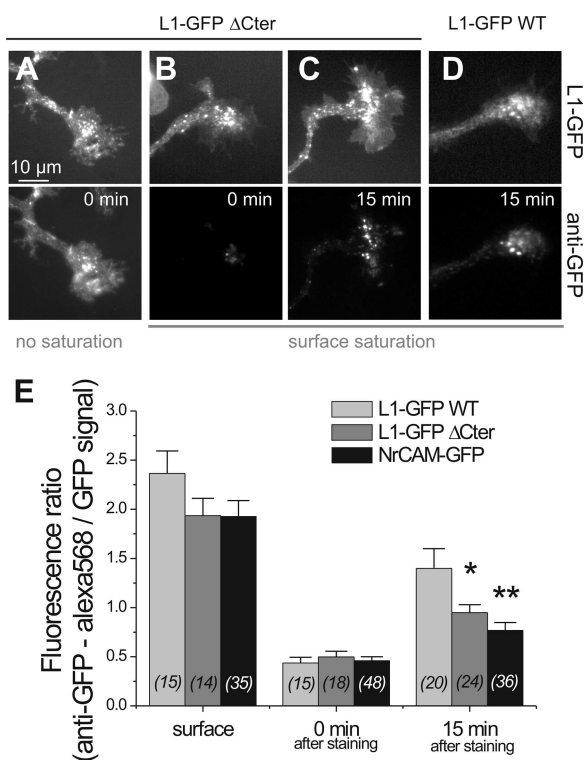


Figure 8. Endocytosis of L1 at the base of growth cones. (A–D) Neurons transfected for L1–GFP, L1–GFPΔCter, or NrCAM–GFP were briefly fixed with soluble antibody against GFP, and then they were either fixed immediately (A and B) or placed at 37°C for 15 min to promote internalization of receptor–antibody complexes (C and D). (A) Surface anti–GFP–labeled receptors were stained with fluorescent secondary antibody without cell permeabilization. (B–D) Surface labeling was quenched by high concentrations of unconjugated secondary antibody, and internalized L1–GFP molecules were labeled with fluorescent secondary antibody after brief permeabilization. (E) Ratio of Alexa 568 anti–GFP versus L1–GFP signal on the growth cone area, for the different time points and constructs. Data are expressed as mean ± SEM, with (n) the number of growth cones examined, and data re compared by analysis of variance (ANOVA) and Tukey’s test (*p = 0.06; **p < 0.01).

because L1–L1 adhesion seems to involve immunoglobulin domains relatively deep in the molecule, in particular Ig2 (Zhao *et al.*, 1998) and Ig6 (Itoh *et al.*, 2004). Furthermore,

Table 2. Turnover rates calculated from FRAP experiments for the various ligand–receptor interactions at bead contacts

	Transfection			
	L1–GFP	L1–GFP	L1–GFPΔCter	NrCAM–GFP
Ligand	L1–Fc	Anti–L1	L1–Fc	TAG–1
k_{off} (h ⁻¹)	6.1 ± 1.6	1.0 ± 0.5**	2.2 ± 0.8*	0.18 ± 0.07****
n	24	13	17	8

Data are expressed as mean ± SEM, where n is the number of beads tested. Turnover rates were found to be statistically different by ANOVA and compared with the L1–GFP/L1–Fc condition by Tukey’s test (*p = 0.06; **p < 0.01; ****p < 0.001). Data for NrCAM–GFP at TAG–1 bead contacts in B104 neuroblastoma cells were obtained previously (Falk *et al.*, 2004) and are reanalyzed here.

L1–L1 binding requires the folding of a hinge region between Ig2 and Ig3 domains (De Angelis *et al.*, 2002) and the adoption of a horseshoe conformation (Schurmann *et al.*, 2001; Kim and Leckband, 2006), in which the N-terminal GFP should not be a hindrance.

Exocytosis of L1 Molecules Contribute to the Initiation of L1 Homophilic Adhesions

Using these tools, we detailed the respective contributions of diffusion/trapping versus membrane trafficking in the formation and renewal of L1 adhesions (Figure 9). It was previously shown in DRG neurons that polarized trafficking of L1 molecules through endosomal compartments within the growth cone, allows growth cone migration on an L1 substrate (Kamiguchi and Lemmon, 2000; Kamiguchi and Yoshihara, 2001). However, how exo/endocytosis events were linked to the formation and dissociation of L1 adhesions at the plasma membrane remained unclear. Our experiments with L1–Fc or anti–L1–coated microsphere bring an answer to this question. When L1–Fc-coated microspheres were initially presented to the growth cone, we measured a very rapid increase in L1–GFP receptor accumulation, reaching equilibrium in ~2 min. We calculated that half of the accumulated receptors came from passive membrane diffusion, which we directly visualized in some experiments by the selective trapping of QD-labeled L1–GFP molecules at L1–Fc bead contacts (data not shown). The

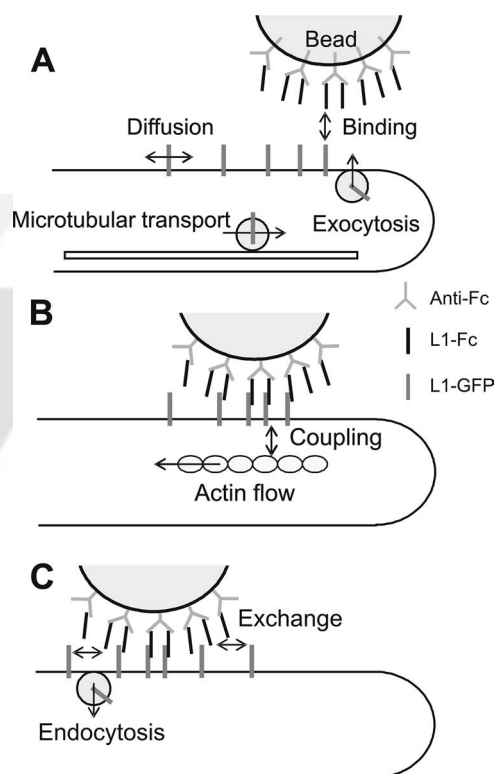


Figure 9. Model showing the cooperation between lateral diffusion and exo/endocytosis events in the dynamics of L1 homophilic contacts. (A) Initial contact formation at the growth cone periphery involves both directed exocytosis and lateral diffusion. (B) Beads rapidly couple to the actin flow and travel to the base of growth cones, as more receptors are being recruited. (C) Mature contacts in the central domain are still capable of turnover and recycle by diffusion/untrapping as well as endocytosis, which occurs preferentially in this region.

other half came from freshly exocytosed L1 molecules, likely via the selective transport and delivery of L1–GFP-rich vesicles at the growth cone periphery (Figure 9A). This process was selective of the L1–Fc ligand, because beads coated with anti-L1 (this study) or anti-GFP (Thoumine *et al.*, 2005) recruited essentially surface receptors, with a slower rate. Thus, there must be a signaling process specific of the L1–Fc ligand. Accordingly, in DRG neurons the selective addressing of L1 at the growth cone extremity is specific of cells migrating on an L1 substrate, and it does not occur on an N-cadherin substrate (Kamiguchi and Yoshihara, 2001). Overall, L1 molecules accumulate at L1–Fc contacts threefold faster than N-cadherin receptors at Ncad–Fc contacts (Thoumine *et al.*, 2006), revealing both a faster homophilic interaction kinetics, and a selective addressing by exocytosis. How is this achieved? It is possible that L1 ligation initiates a signaling pathway that triggers exocytosis of L1-rich vesicles to the nascent contact (for a review of L1 and NCAM-based signaling pathways, see (Maness and Schachner, 2007). For example, calcium transients were found to activate VAMP-2-mediated exocytosis involved in growth cone turning on L1–Fc-coated substrates (Tojima *et al.*, 2007). We recently reported a close association between L1 adhesions, the soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein TI-VAMP and the actin cytoskeleton in growth cones (Alberts *et al.*, 2006). In particular, we showed that TI-VAMP silencing reduces L1 adhesiveness without affecting L1 cell surface expression (Alberts *et al.*, 2003). Thus, TI-VAMP could mediate the selective delivery of L1-rich vesicles to the plasma membrane, through a specific association with the actin cytoskeleton recruited at initial L1 contacts. However, this cannot be directly tested in neurons because silencing TI-VAMP's expression also impairs neuriteogenesis (Alberts *et al.*, 2003).

Ligand-bound or Clustered L1 Molecules Connect to the Actin Flow

A close association of ligand-bound L1 molecules and the actin cytoskeleton was observed, because L1-coated microspheres rapidly coupled to the actin retrograde flow (Figure 9B). Beads slowed down as more L1 molecules accumulated, and they finally stalled when recruitment reached a steady state. In this process, the L1–L1 contact had changed compartments from the peripheral actin-rich lamellipodium to the microtubule rich central region of the growth cone. The bead velocity was the exact mirror image of L1–GFP receptor recruitment, suggesting that the connection to the actin flow could control the rate of L1–GFP receptor accumulation. This strong interaction may involve actin binding partners such as ERM or ankyrin. Indeed, L1 molecules bound to L1–Fc were shown to couple to the actin flow via ankyrin B in the neuronal perisomatic lamellae (but not in growth cones), promoting neurite initiation (Nishimura *et al.*, 2003). In contrast, a study using L1 molecules mutated in the cytoplasmic domain and expressed in L1 knockout neuronal cultures showed instead that the L1–ERM but not the L1–ankyrin interactions were essential for neurite outgrowth (Cheng *et al.*, 2005).

It was intriguing that individual L1–GFP molecules labeled with quantum dots moved randomly on the surface of growth cones, with no apparent retrograde component. One explanation can be that cell adhesion molecules require a certain degree of clustering to engage in various functions, e.g., trimers of L1 are more potent than monomers in terms of adhesiveness and promotion of neurite outgrowth (Hall *et al.*, 2000), whereas integrin trimerization is required for the anchoring to actin (Coussen *et al.*, 2002). Due to their small

size (i.e., roughly 25 nm in diameter), QDs are presumably attached to one or very few L1 molecules, apparently not enough to trigger their connection to the actin flow. Indeed, beads of intermediate size coated with anti-L1 or L1–Fc ligands show a complex behavior, with a fraction of them moving rearward, some diffusing, and others staying associated with static components of the cytoskeleton (Kamiguchi and Yoshihara, 2001; Gil *et al.*, 2003; Falk *et al.*, 2004). Ligand activation of L1 molecules may be necessary to further engage L1 into cytoskeletal binding (Nishimura *et al.*, 2003), and this was not achieved using single molecule detection with a nonperturbing anti-GFP antibody.

The immobilization of individual L1 molecules may also involve several interacting proteins. L1 can bind ankyrin, this interaction being promoted by the dephosphorylation of the tyrosine in a FIGQY motif situated in the L1 intracellular region (Garver *et al.*, 1997; Tuvia *et al.*, 1997) and regulated through the mitogen-activated protein kinase pathway (Whittard *et al.*, 2006). Growth cones are enriched in ankyrin B (Nishimura *et al.*, 2003) and poorly stained by an antibody against phosphorylated FIGQY, suggesting that L1 is mainly in a dephosphorylated form thus available for ankyrin binding (Boiko *et al.*, 2007). Indeed, ankyrin was shown to mediate the coupling of L1 with a static actin network in neuroblastoma cells (Gil *et al.*, 2003). Therefore, the increase in mobility observed here for the L1 Δ Cter mutant can be partly explained by a lack of interaction with ankyrin B. The relatively mild phenotype may be due to the formation of *cis*-dimers between L1 Δ Cter and endogenous L1, e.g., involving the third FNIII domain (Silletti *et al.*, 2000). However, using NrCAM molecules in which the FNIII domains were replaced by GFP, we also observed a very small increase in NrCAM lateral mobility upon truncation of the C-tail upstream of the ankyrin binding sequence (Thoumine *et al.*, 2005). Together, these findings indicate that ankyrin is a mild regulator of L1 stabilization in our experimental model. Interactions of L1 with ERM or the clathrin adaptor AP-2 might be more important.

Contribution of Endocytosis in the Fast Turnover of Mature L1 Adhesions

Although reaching equilibrium, L1–L1 adhesions stayed highly dynamic as revealed by FRAP experiments (Figure 9C). The turnover of L1 homophilic adhesions was twice as large as that measured previously for N-cadherin adhesions (Thoumine *et al.*, 2006), and it was 30-fold higher than the adhesions formed between TAG-1 and NrCAM (Falk *et al.*, 2004). Such fast renewal of L1–L1 bonds implicated an exchange with unbleached L1–GFP molecules that could come either by diffusion at the plasma membrane or from trafficking events. Exocytosis was not involved in this latter case, because no recovery of L1–GFP fluorescence was observed around stable L1–Fc bead contacts after thrombin treatment. Thus, exocytosis is specific of the initial phase of L1–L1 bond formation at the growth cone periphery, and no longer acts in more mature adhesions in the central region. In contrast, the central domain is a region of preferential endocytosis, as revealed by antibody feeding assay and in agreement with previous studies using DRG neurons (Kamiguchi and Lemmon, 2000; Kamiguchi and Yoshihara, 2001). Such internalization of L1 molecules may be due to a specific interaction of L1 with endocytotic clathrin-coated pits, e.g., through the AP-2 complex that can interact specifically with an YRSLE sequence located on the neuronal L1 cytoplasmic tail (Kamiguchi *et al.*, 1998b; Kamiguchi and Yoshihara, 2001). This suggested a role of endocytosis in the renewal of L1 adhesions at the base of growth cones.

Indeed, the truncated receptor L1–GFP Δ Cter showed a significantly reduced turnover rate in FRAP experiments at stable L1–Fc bead contacts. It was previously shown that L1 molecules deleted of the RSLE internalization sequence increase cell aggregation compared with wild-type counterparts, while keeping a similar surface expression (Long *et al.*, 2001). This surprising effect was proposed to be due to fast attachment/detachment kinetics of L1–L1 adhesions, making free wild-type receptors readily endocytosed. Here, we directly demonstrate that L1–L1 homophilic bonds are indeed very labile and that L1–GFP Δ Cter molecules that are less endocytosed have a smaller turnover rate, contributing to more stable L1 adhesions. An increase in L1–L1 affinity for the L1– Δ Cter mutant, similar to that reported recently for N-cadherin (Thoumine *et al.*, 2006), is unlikely, because the L1 cytoplasmic tail is dispensable for homophilic adhesion (Wong *et al.*, 1995). Immobilization and endocytosis of L1– Δ Cter molecules were not totally prevented, possibly because of a clathrin-independent endocytotic pathway, or the role of lateral association of mutated receptors with endogenous receptors in the plasma membrane, e.g., L1 itself, other IgCAMs, or integrins (Silletti *et al.*, 2000; Brummendorf and Lemmon, 2001; Cheng *et al.*, 2005). Indeed, the replacement of the FNIII domains by GFP in the homologue molecule NrCAM (Falk *et al.*, 2004), thus preventing *cis*-oligomerization (Silletti *et al.*, 2000), was accompanied by an important decrease in endocytosis rate. It is not clear what triggers the transition between L1 coupling to the actin flow and L1 endocytosis, but it may involve the coordinated phosphorylation and dephosphorylation events of critical tyrosine residues in the L1 cytoplasmic tail. Indeed, phosphorylation of Y1229 induces uncoupling of neurofascin and L1 from ankyrin (Garver *et al.*, 1997; Needham *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2003), whereas dephosphorylation of Y1176 after L1 ligation or cross-linking allows binding to AP-2 (Schaefer *et al.*, 2002). A switch from ezrin to AP-2 binding, which compete for the same site on the juxtamembrane domain of L1 (Cheng *et al.*, 2005), is also possible.

CONCLUSIONS

Our data reveal in fine detail the physical mechanisms governing the dynamics of L1 adhesions underlying growth cone motility. They highlight the coordination between the processes of *exo*/endocytosis of L1 molecules, the role of membrane diffusion, and the kinetics of L1–L1 bonds, which altogether result in a rapid turnover of L1 contacts. The L1 molecule is unique in this respect, because NrCAM or N-cadherin, which are less internalized, both make much more stable adhesions (Falk *et al.*, 2004; Thoumine *et al.*, 2006). This fast renewal of L1 molecules may be essential to processes of axon elongation and fasciculation requiring reactive adhesiveness at the growth cone.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Y. Goldberg for the transfection protocol; P. Gonzales for coverslip preparation, D. Bouchet, C. Breillat, and B. Tessier for neuronal cultures and DNA preparations; L. Cognet for QD tracking algorithms; M. Heine for the QD coupling protocol; D. Perrais and S. Lacroix-Desmazes for thrombin inhibitors; and J. Falk, M. Lambert, R. M. Mège, and C. Sarrailh for critical reading of the manuscript. We acknowledge financial support from Centre National de la Recherche Scientifique and Conseil Régional Aquitaine (to C.D., O.T., and D.C.) and from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Avenir Program), European Commission ("Signaling and Traffic" STREP 503229), Association Française contre les Myopathies, French Ministry of Research (ACI-BDP), and Fondation pour la Recherche Médicale, and Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (to T.G.). L.D. was supported by

a postdoctoral fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

REFERENCES

- Alberts, P. *et al.* (2003). Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion. *Mol. Biol. Cell* 14, 4207–4220.
- Alberts, P., Rudge, R., Irinopoulou, T., Danglot, L., Gauthier-Rouviere, C., and Galli, T. (2006). Cdc42 and actin control polarized expression of TI-VAMP vesicles to neuronal growth cones and their fusion with the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 17, 1194–1203.
- Boiko, T., Vakulenko, M., Ewers, H., Yap, C. C., Norden, C., and Winckler, B. (2007). Ankyrin-dependent and -independent mechanisms orchestrate axonal compartmentalization of L1 family members neurofascin and L1/neuron-glia cell adhesion molecule. *J. Neurosci.* 27, 590–603.
- Brewer, G. J. (1996). Thrombin causes cell spreading and redistribution of beta-amyloid immunoreactivity in cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 67, 119–130.
- Brummendorf, T., and Lemmon, V. (2001). Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 611–618.
- Cheng, L., Itoh, K., and Lemmon, V. (2005). L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *J. Neurosci.* 25, 395–403.
- Coussen, F., Choquet, D., Sheetz, M. P., and Erickson, H. P. (2002). Trimers of the fibronectin cell adhesion domain localize to actin filament bundles and undergo rearward translocation. *J. Cell Sci.* 115, 2581–2590.
- De Angelis, E., MacFarlane, J., Du, J. S., Yeo, G., Hicks, R., Rathjen, F. G., Kenwright, S., and Brummendorf, T. (1999). Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *EMBO J* 18, 4744–4753.
- De Angelis, E., Watkins, A., Schafer, M., Brummendorf, T., and Kenwright, S. (2002). Disease-associated mutations in L1 CAM interfere with ligand interactions and cell-surface expression. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1–12.
- Dent, E. W., and Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209–227.
- Dickson, T. C., Mintz, C. D., Benson, D. L., and Salton, S. R. (2002). Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J. Cell Biol.* 157, 1105–1112.
- Diefenbach, T. J., Latham, V. M., Yimlamai, D., Liu, C. A., Herman, I. M., and Jay, D. G. (2002). Myosin 1c and myosin IIB serve opposing roles in lamellipodial dynamics of the neuronal growth cone. *J. Cell Biol.* 158, 1207–1217.
- Donovan, F. M., Pike, C. J., Cotman, C. W., and Cunningham, D. D. (1997). Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J. Neurosci.* 17, 5316–5326.
- Falk, J., Thoumine, O., Dequidt, C., Choquet, D., and Faivre-Sarrailh, C. (2004). NrCAM coupling to the cytoskeleton depends on multiple protein domains and partitioning into lipid rafts. *Mol. Biol. Cell* 15, 4695–4709.
- Garver, T. D., Ren, Q., Tuvia, S., and Bennett, V. (1997). Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J. Cell Biol.* 137, 703–714.
- Gil, O. D., Sakurai, T., Bradley, A. E., Fink, M. Y., Cassella, M. R., Kuo, J. A., and Felsenfeld, D. P. (2003). Ankyrin binding mediates LICAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of LICAM on the cell surface. *J. Cell Biol.* 162, 719–730.
- Goslin, K., Asmussen, H., and Banker, G. (1991). Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: *Culturing Nerve Cells*, ed. G. Banker and K. Goslin, Cambridge, MA: The MIT Press, 339–370.
- Hall, H., Bozic, D., Fauser, C., and Engel, J. (2000). Trimerization of cell adhesion molecule L1 mimics clustered L1 expression on the cell surface: influence on L1-ligand interactions and on promotion of neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 75, 336–346.
- Horinouchi, K., Nakamura, Y., Yamanaka, H., Watabe, T., and Shiosaka, S. (2005). Distribution of L1cam mRNA in the adult mouse brain: in situ hybridization and Northern blot analyses. *J. Comp. Neurol.* 482, 386–404.
- Itoh, K., Cheng, L., Kamei, Y., Fushiki, S., Kamiguchi, H., Gutwein, P., Stoeck, A., Arnold, B., Altevogt, P., and Lemmon, V. (2004). Brain development in mice lacking L1–L1 homophilic adhesion. *J. Cell Biol.* 165, 145–154.

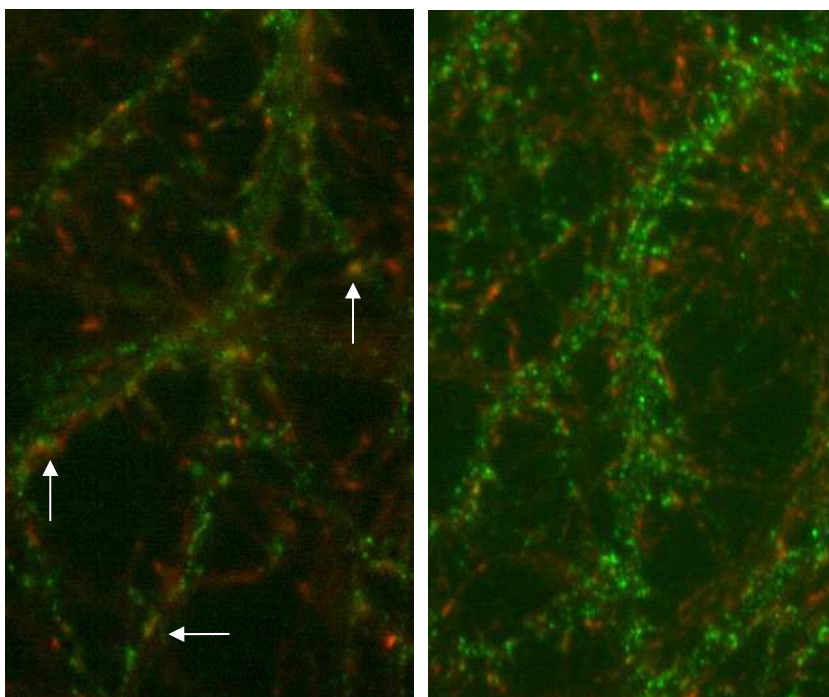
- Itoh, K., Shimono, K., and Lemmon, V. (2005). Dephosphorylation and internalization of cell adhesion molecule L1 induced by theta burst stimulation in rat hippocampus. *Mol. Cell Neurosci.* 29, 245–249.
- Kamiguchi, H., Hlavin, M. L., and Lemmon, V. (1998a). Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol. Cell Neurosci.* 12, 48–55.
- Kamiguchi, H., and Lemmon, V. (2000). Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *J. Neurosci.* 20, 3676–3686.
- Kamiguchi, H., Long, K. E., Pendergast, M., Schaefer, A. W., Rapoport, I., Kirchhausen, T., and Lemmon, V. (1998b). The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J. Neurosci.* 18, 5311–5321.
- Kamiguchi, H., and Yoshihara, F. (2001). The role of endocytic L1 trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones. *J. Neurosci.* 21, 9194–9203.
- Kim, S., and Leckband, D. E. (2006). Horseshoe-shaped conformation of human L1 ectodomains identified by direct force measurements. *Biopolymers*.
AQ:19
- Koroll, M., Rathjen, F. G., and Volkmer, H. (2001). The neural cell recognition molecule neurofascin interacts with syntenin-1 but not with syntenin-2, both of which reveal self-associating activity. *J. Biol. Chem.* 276, 10646–10654.
- Long, K. E., Asou, H., Snider, M. D., and Lemmon, V. (2001). The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 276, 1285–1290.
- Maness, P. F., and Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 10, 19–26.
- Miller, P. D., Chung, W. W., Lagenaur, C. F., and DeKosky, S. T. (1993). Regional distribution of neural cell adhesion molecule (N-CAM) and L1 in human and rodent hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 327, 341–349.
- Munakata, H., Nakamura, Y., Matsumoto-Miyai, K., Itoh, K., Yamasaki, H., and Shiosaka, S. (2003). Distribution and densitometry mapping of L1-CAM immunoreactivity in the adult mouse brain—light microscopic observation. *BMC Neurosci.* 4, 7.
- Needham, L. K., Thelen, K., and Maness, P. F. (2001). Cytoplasmic domain mutations of the L1 cell adhesion molecule reduce L1-ankyrin interactions. *J. Neurosci.* 21, 1490–1500.
- Nishimura, K., Yoshihara, F., Tojima, T., Ooashi, N., Yoon, W., Mikoshiba, K., Bennett, V., and Kamiguchi, H. (2003). L1-dependent neuriteogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *J. Cell Biol.* 163, 1077–1088.
- Pollerberg, G. E., Nolte, C., and Schachner, M. (1990). Accumulation of N-CAM 180 at contact sites between neuroblastoma cells and latex beads coated with extracellular matrix molecules. *Eur. J. Neurosci.* 2, 879–887.
- Racine, V., Hertzog, A., Jouanneau, J., Salamero, J., Kervrann, C., and Sibarita, J. (2006). Multiple target tracking of 3D fluorescent objects based on simulated annealing. In: *Biomedical Imaging: Nano to Macro, 2006. 3rd IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, 1020–1023.
AQ:20
- Sampo, B., Kaech, S., Kunz, S., and Banker, G. (2003). Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 37, 611–624.
- Sasakura, H., Inada, H., Kuhara, A., Fusaoka, E., Takemoto, D., Takeuchi, K., and Mori, I. (2005). Maintenance of neuronal positions in organized ganglia by SAX-7, a *Caenorhabditis elegans* homologue of L1. *EMBO J.* 24, 1477–1488.
- Schaefer, A. W., Kamei, Y., Kamiguchi, H., Wong, E. V., Rapoport, I., Kirchhausen, T., Beach, C. M., Landreth, G., Lemmon, S. K., and Lemmon, V. (2002). L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J. Cell Biol.* 157, 1223–1232.
- Schurmann, G., Haspel, J., Grumet, M., and Erickson, H. P. (2001). Cell adhesion molecule L1 in folded (horseshoe) and extended conformations. *Mol. Biol. Cell* 12, 1765–1773.
- Sheetz, M. P., Baumrind, N. L., Wayne, D. B., and Pearlman, A. L. (1990). Concentration of membrane antigens by forward transport and trapping in neuronal growth cones. *Cell* 61, 231–241.
- Silletti, S., Mei, F., Sheppard, D., and Montgomery, A. M. (2000). Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J. Cell Biol.* 149, 1485–1502.
- Suter, D. M., Errante, L. D., Belotserkovsky, V., and Forscher, P. (1998). The Ig superfamily cell adhesion molecule, apCAM, mediates growth cone steering by substrate-cytoskeletal coupling. *J. Cell Biol.* 141, 227–240.
- Tardin, C., Cognet, L., Bats, C., Lounis, B., and Choquet, D. (2003). Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J.* 22, 4656–4665.
- Thoumine, O., Lambert, M., Mege, R. M., and Choquet, D. (2006). Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Mol. Biol. Cell* 17, 862–875.
- Thoumine, O., Saint-Michel, E., Dequidt, C., Falk, J., Rudge, R., Galli, T., Faivre-Sarrailh, C., and Choquet, D. (2005). Weak effect of membrane diffusion on the rate of receptor accumulation at adhesive contacts. *Biophys. J.* 89, L40–42.
- Tojima, T., Akiyama, H., Itofusa, R., Li, Y., Katayama, H., Miyawaki, A., and Kamiguchi, H. (2007). Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat. Neurosci.* 10, 58–66.
- Tuvia, S., Garver, T. D., and Bennett, V. (1997). The phosphorylation state of the FIGQY tyrosine of neurofascin determines ankyrin-binding activity and patterns of cell segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12957–12962.
- Whittard, J. D., Sakurai, T., Cassella, M. R., Gazdoui, M., and Felsenfeld, D. P. (2006). MAP kinase pathway-dependent phosphorylation of the L1-CAM ankyrin binding site regulates neuronal growth. *Mol. Biol. Cell* 17, 2696–2706.
- Wisco, D., Anderson, E. D., Chang, M. C., Norden, C., Boiko, T., Folsch, H., and Winckler, B. (2003). Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* 162, 1317–1328.
- Wong, E. V., Cheng, G., Payne, H. R., and Lemmon, V. (1995). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule L1 is not required for homophilic adhesion. *Neurosci. Lett.* 200, 155–158.
- Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C. K., and Greenberg, M. E. (1996). Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 16, 5425–5436.
- Yang, Y., Akiyama, H., Fenton, J. W., 2nd, and Brewer, G. J. (1997). Thrombin receptor on rat primary hippocampal neurons: coupled calcium and cAMP responses. *Brain Res.* 761, 11–18.
- Zhao, X., Yip, P. M., and Siu, C. H. (1998). Identification of a homophilic binding site in immunoglobulin-like domain 2 of the cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* 71, 960–971.

Etude de l'interaction entre la N-cadhérine et GluR2

I/ RESULTATS

Comprendre les mécanismes de la formation des synapses est actuellement l'un des enjeux principaux en neurobiologie. Des études récentes ont permis de révéler des acteurs majeurs de la synaptogénèse : Piccolo/ Bassoon (Shapira et al., 2003), Narp (O'Brien et al., 1999), Wnt (Ahmad-Annur et al., 2006), neurexine et neuroligine (Nam and Chen, 2005), tout en laissant un grand nombre d'inconnues concernant les relations qui s'établissent entre les différents constituants synaptiques, et parmi eux, à la membrane, les protéines d'adhésion et les récepteurs aux neurotransmetteurs. L'utilisation de microsphères recouvertes de protéine d'adhésion a permis d'initier une expérience de criblage ayant pour but de déterminer si des constituants synaptiques étaient recrutés au site d'un contact adhésif donné. Des informations échangées avec l'équipe de Maria Passafaro (CNR, Milan) nous ont amenés à nous concentrer sur la liaison entre N-cadhérine et la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA au glutamate, puisque cette équipe avait pu révéler l'existence d'une interaction entre ces deux molécules par des expériences de biochimie. Ma participation au travail de caractérisation de la relation entre ces deux protéines, notamment sur le plan fonctionnel, a entraîné ma contribution au rang de deuxième auteur à cette étude, publiée dans la revue Neuron.

Localisation de la N-cadhérine endogène et transfectée à la synapse

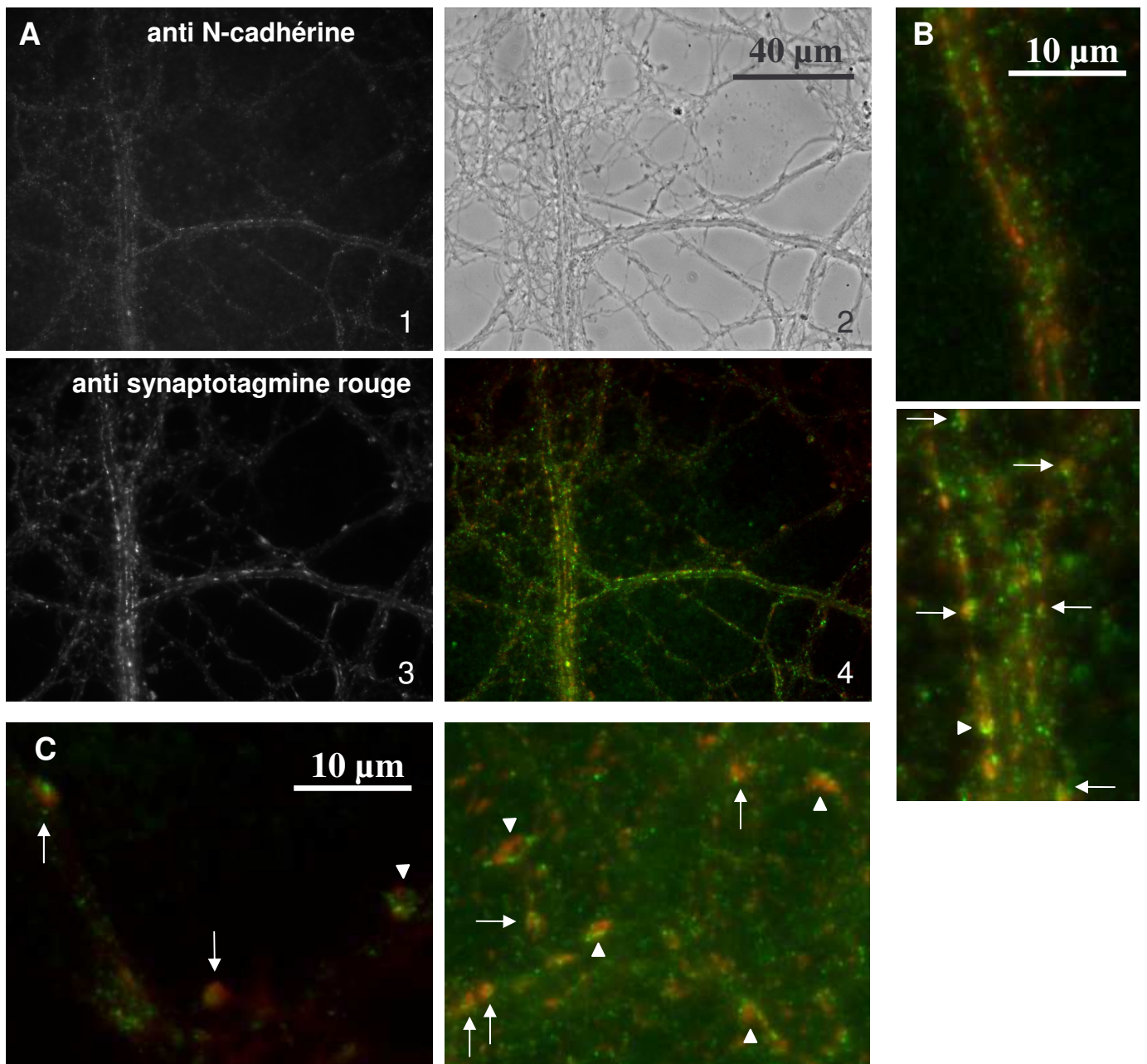


Colocalisation N-cadhérine-GFP/synaptotagmine

mages de neurones d'hippocampe en culture (15 DIV) après immunomarquage avec l'anticorps Gc4 monoclonal (1) et l'anticorps anti-synaptotagmine polyclonal (2). On observe une colocalisation des deux marquages (flèches) cependant moins bonne que pour la N-cadhérine endogène (fig.36).

Figure 38

Plusieurs auteurs ont observé la N-cadhérine à la synapse ((Uchida et al., 1996), (Bruses, 2000),



Colocalisation N-cadhérine/synaptotagmine endogènes

A Images de neurones d'hippocampe en culture (15 DIV) après immunomarquage avec l'anticorps anti-Ncadhérine monoclonal (1) et l'anticorps anti-synaptotagmine polyclonal (3). Images en transmission (2) et superposition des deux images de fluorescence (4). **B et C** Détails de l'image (4). **B** Deux zones montrant la localisation des deux protéines à la membrane des neurites. **C** Une zone où les neurites sont à faible densité (gauche) et une zone de plus forte densité (droite), où l'on observe une localisation proche des deux marquages (flèches). Le marquage N-cadhérine semble à certains endroits « entourer » le marquage synaptotagmine (pointes de flèches).

Figure 39

(Jontes et al., 2004)). Cependant cette observation reste ardue, notamment à cause de la difficulté à détecter spécifiquement la N-cadhérine par rapport aux autres cadhérines (qualité de l'anticorps). Nous avons effectué un co-marquage de la N-cadhérine endogène et de la synaptotagmine et nous avons observé leur colocalisation partielle, telle que le marquage N-cadhérine semble entourer le marquage synaptotagmine (fig. 39). D'autre part, nous avons cherché à savoir si la N-cadhérine transfectée pouvait également être observée aux synapses. On a également observé une colocalisation dans ce cas, même elle apparaît de

moins bonne qualité, probablement en raison de la surexpression intracellulaire de la protéine (fig. 38).

1 - ARTICLE II : “Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation”

Afin de caractériser l'association fonctionnelle entre les deux molécules, nous avons créé des contacts homophiles N-cadhérine entre des billes recouverte de N-cadhérine-Fc et des neurones ou des cellules gliales. Les billes se couplent spécifiquement à la N-cadhérine endogène (Thoumine et al., 2006), et également à la N-cadhérine-DsRed transfectée dans les neurones, qui s'accumule aux sites de contact et que l'on utilise ici comme un témoin du comportement de la N-cadhérine endogène. Afin de localiser l'interaction entre la N-cadhérine et GluR2, on utilise les constructions NTDR1 et NTDR2, protéines portant la séquence du segment extracellulaire de GluR1 et de GluR2 respectivement, exprimées à la membrane, mais qui ne possèdent pas de domaine cytoplasmique.

On a pu observer des recrutements d'amplitudes différentes pour les différentes constructions transfectées (fig.7, p. 470 de l'article) : N-cadhérine-Dsred s'accumule jusqu'à atteindre un signal de fluorescence deux fois plus important que celui du neurite sans contact, et nous sert de contrôle positif. Les cellules transfectées avec NR1-Venus et NR2-Venus ne montrent pas de recrutement spécifique. GFP-GluR2 et GluR2-YFP sont recrutés significativement plus au site de contact N-cadhérine, ainsi que NTDR2 qui ne peut effectuer d'interaction qu'avec des partenaires extracellulaires. C'est donc par une liaison extracytoplasmique que NTDR2 se lie à un composant du contact adhésif. NTDR1 est aussi recruté, mais dans une moindre mesure.

On a fait l'hypothèse que les enrichissements observés sont dus à une interaction directe entre la sous-unité GluR2 de récepteurs au glutamate et la N-cadhérine, interaction établie par ailleurs par nos collaborateurs. On a voulu savoir si les protéines recrutées aux contacts se lient à la N-cadhérine de la bille (interaction en travers du contact ou en *Trans*) où à la N-cadhérine du neurone (interaction du même côté ou en *Cis*). Pour cela, on a utilisé des billes recouvertes d'un anticorps anti-N-cadhérine (Gc4) spécifique de la séquence N-cadhérine-Dsred transfectée. L'accumulation de GluR2-YFP, de GFP-GluR2, de NTDR2, observée est moins importante qu'avec les billes N-cadhérine. La N-cadhérine-DsRed est au contraire mieux recrutée par les billes Gc4. Ces résultats suggèrent que GluR2 interagit en *Cis* avec la N-cadhérine, mais qu'il est vraisemblable que ces deux protéines puissent également interagir en *Trans*. Cette interaction en *Trans* a été par ailleurs démontré par nos collaborateurs en transfectant des cellules HEK avec la N-cadhérine-DsRed ou GluR2-GFP, et en observant l'agrégation des deux types de cellules.

Si les deux protéines se lient, on peut imaginer que la N-cadhérine pourrait en quelque sorte retenir

GluR2 aux synapses. Plus simplement, nous avons cherché à déterminer dans quelle mesure la N-cadhérine pouvait moduler la mobilité de GluR2 en utilisant deux approches expérimentales : l'expérience de FRAP sur et le suivi de quantum-dot couplé à GFP-GluR2. Nous avons d'abord observé que la fluorescence GFP-GluR2 accumulée au niveau de contacts N-cadhérine montrait, après photoblanchiment, une cinétique de retour plus lente que la fluorescence GFP-GluR2 hors des contacts, mais avec une amplitude de signal égale à la fin de l'expérience (fig.8, p. 471 de l'article). Cette expérience suggère que GluR2 est « ralenti » par sa liaison à la bille, mais que cette liaison est labile puisque les molécules de GFP-GluR2 photoblanchies liées peuvent finalement être échangées (cf modèle de réaction-diffusion invoqué pour les expériences de FRAP sur L1-GFP, fig. 33). On utilise ensuite SEP-GluR2, forme pH-dépendante de GFP-GluR2 permettant de n'observer que le GluR2 membranaire. On observe de la même façon un ralentissement de la diffusion de SEP-GluR2 si on effectue une expérience de FRAP, non pas au niveau d'un contact, mais après agrégation de la N-cadhérine par l'anticorps Gc4 (pré-couplé à un anticorps anti-souris pour induire la constitution de l'assemblage moléculaire) (fig.8, p. 471 de l'article). Dans les deux cas, l'immobilisation de la N-cadhérine ralentit la mobilité de GluR2 en *Cis*.

2 - EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES

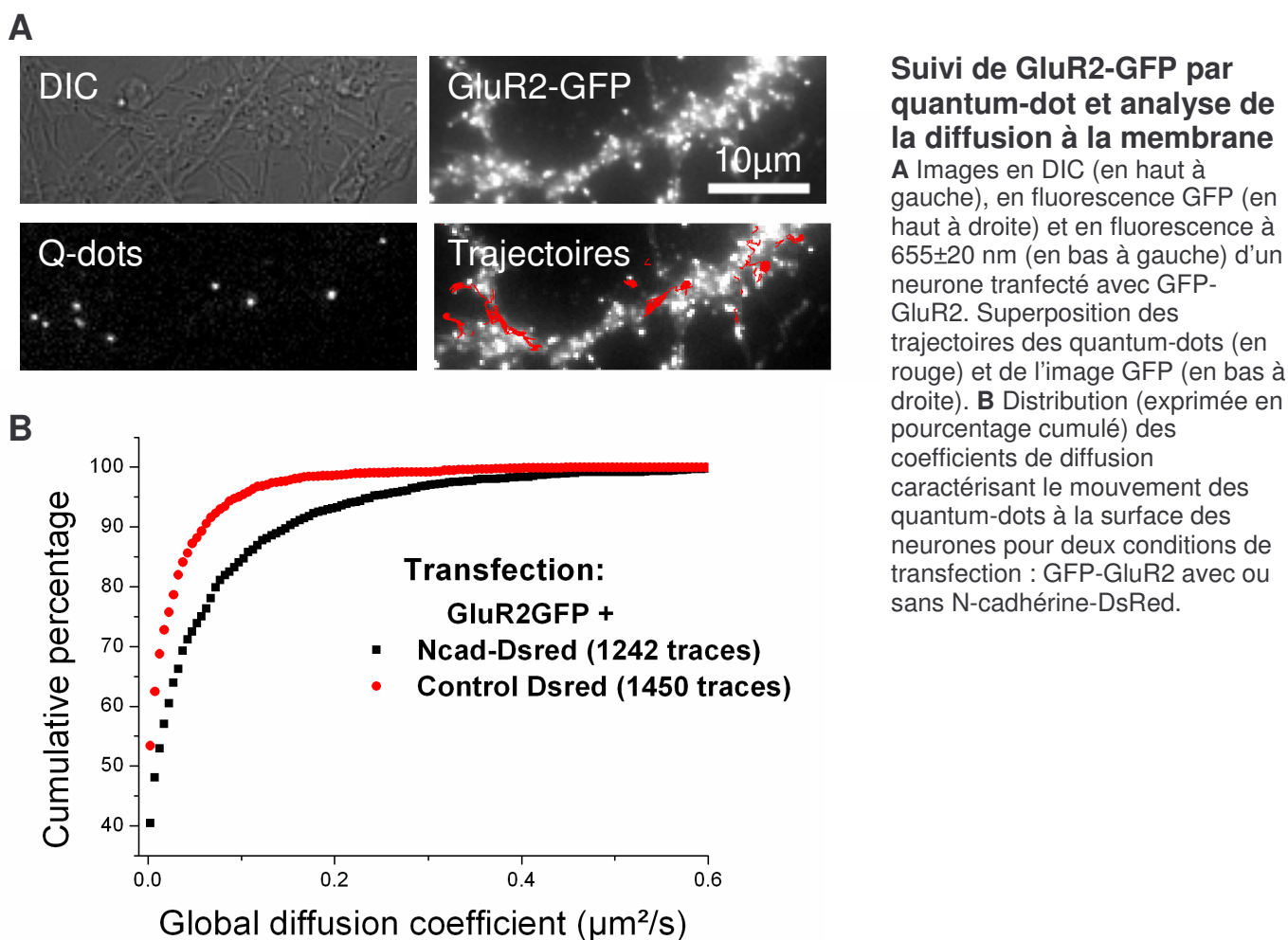


Figure 40

On observe aussi une différence de distribution des coefficients de diffusion mesurés par suivi de quantum-dot de GFP-GluR2 suivant qu'il est cotransfecté ou non avec la N-cadhérine-DsRed (fig. 40). Cependant, cette fois, la cotransfection avec la N-cadhérine semble augmenter la mobilité de GluR2 : les valeurs des coefficients de diffusion sont globalement supérieures. Il faut rappeler que dans ces expériences, le neurone transfecté étudié est en contact avec de nombreux autres, qui expriment de la N-cadhérine endogène. Pour interpréter ces résultats, on peut faire l'hypothèse que l'interaction en *Trans* entre les GFP-GluR2 du neurone étudié et la N-cadhérine de ses voisins joue un rôle important. Quand on surexprime la N-cadhérine en *Cis*, il est possible que les molécules de N-cadhérine des neurones voisins soit « moins libres » d'interagir avec GluR2, car on déplace l'équilibre de l'interaction homophile vers la forme lié N-cadhérine-N-cadhérine. GluR2 est donc moins « ralenti » par la N-cadhérine. On note qu'on obtient le même résultat quand on compare le retour de fluorescence SEP-GluR2 après photoblanchiment avec ou sans N-cadhérine-DsRed : la cinétique du retour de fluorescence est plus rapide dans le cas de la cotransfection avec N-cadhérine-DsRed.

L'ensemble de ces données indique qu'il existe une interaction fonctionnelle entre la N-cadhérine et GluR2.

II/ DISCUSSION

Le nombre de protéines d'adhésion qui ont un rôle supposé ou confirmé dans la formation de la synapse est très important, et augmente encore. Il est probable que ces protéines puissent agir de façon combinée, et que l'implication de chaque protéine d'adhésion soit différente selon le type de synapse. Il s'agit maintenant d'enrichir les données concernant ces implications spécifiques et les relations entre protéines d'adhésion et constituants particuliers de la synapse. Ainsi, ici, notre collaboration avec l'équipe de M. Passafaro a permis de révéler l'existence d'une interaction extracellulaire entre la N-cadhérine et GluR2. Cette interaction a lieu à la fois en *Cis* et en *Trans*, mais les expériences de mesure de mobilité de GluR2 selon l'expression de la N-cadhérine semblent indiquer que la liaison *Trans* est dominante.

De très nombreuses études récentes détaillent des relations existantes ou potentielles entre des protéines présentes à la synapse, de sorte que l'impression générale qui en résulte est que tout interagit plus ou moins directement avec tout. La majorité des protéines à la synapse possèdent des domaines PDZ ou interagissant avec des protéines qui en possèdent. Il est donc important de pouvoir spécifier le degré d'affinité de telle ou telle interaction, ainsi que son implication fonctionnelle. Dans ce cadre, les interactions extracellulaires directes entre protéines membranaires (EphB/NR1, SALM1/NR1, N-cadhérine/GluR2) se démarquent des autres interactions, et sont susceptibles de jouer un rôle important.

Nous avons montré que l'expression de la N-cadhérine pouvait moduler la vitesse de diffusion de GluR2 à la membrane, mais il reste à savoir si cette modulation fonctionnelle a lieu à la synapse et si elle peut jouer un rôle dans la modulation de l'efficacité synaptique. On pourrait par exemple tenter de corrélérer la valeur du coefficient de diffusion des molécules GluR2 à une synapse donnée à la localisation par rapport à la synapse et à la quantité de N-cadhérine présente, cependant de telles expériences seront sans doute difficiles à réaliser. Il s'agira aussi de voir en quoi cette spécificité d'interaction avec GluR2 par rapport à d'autres sous-unités du récepteur AMPA est importante et pourrait contribuer à la fonction spécifique de GluR2. On a vu en effet que la sous-unité GluR1 semble aussi recrutée, dans une moindre mesure, aux sites de contact avec les billes. Il faudra déterminer si ce recrutement est direct ou se fait par l'intermédiaire de GluR2, et si l'expression de N-cadhérine module la mobilité de GluR1.

Le travail mené par nos collaborateurs indique que cette interaction entre N-cadhérine et GluR2 joue un rôle important dans la formation et la morphogenèse des épines dendritiques, et qu'il peut moduler l'efficacité synaptique. Il avait en effet été montré que GluR2 activait la formation d'épines par son domaine N-terminal (Passafaro et al., 2003). Les expériences reportées dans l'article présenté en annexe (Annexe III) montrent que la N-cadhérine, dont on a évoqué en introduction la fonction morphogène, est un intermédiaire nécessaire de cette activation. Il semble donc que l'expression de ces deux molécules contrôle réciproquement leurs fonctions, et on peut donc considérer le couple N-cadhérine/GluR2 comme un système de régulation morphologique et fonctionnelle de la synapse.

Là encore, au-delà de l'étude des interactions entre la N-cadhérine et GluR2 dans des neurones d'hippocampe en culture, il reste à découvrir comment se combinent et se répartissent, géographiquement et chronologiquement, les différents systèmes d'adhésion, pour permettre le développement des synapses du système nerveux central.

Extracellular Interactions between GluR2 and N-Cadherin in Spine Regulation

Laura Saglietti,¹ Caroline Dequidt,² Kinga Kamieniarz,^{1,6} Marie-Claude Rousset,³ Pamela Valnegri,¹ Olivier Thoumine,² Francesca Beretta,¹ Laurent Fagni,³ Daniel Choquet,² Carlo Sala,⁴ Morgan Sheng,⁵ and Maria Passafaro^{1,*}

¹DTI Dulbecco Telethon Institute, CNR Institute of Neuroscience, Cellular and Molecular Pharmacology, Department of Pharmacology, University of Milan, Italy

²CNRS, UMR 5091, Institute Magendie de Neurosciences, Université Bordeaux, France

³Institut de Génomique Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche 5203, 34000 Montpellier, France

⁴CNR Institute of Neuroscience, Cellular and Molecular Pharmacology, Department of Pharmacology, University of Milan, Italy

⁵The Picower Institute for Learning and Memory, RIKEN-MIT Neuroscience Research Center, Howard Hughes Medical Institute, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA

⁶Present address: Department of Molecular Virology, Institute of Experimental Biology, Umultowska, Poznan, Poland.

*Correspondence: m.passafaro@in.cnr.it

DOI 10.1016/j.neuron.2007.04.012

SUMMARY

Via its extracellular N-terminal domain (NTD), the AMPA receptor subunit GluR2 promotes the formation and growth of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. Here we show that the first N-terminal 92 amino acids of the extracellular domain are necessary and sufficient for GluR2's spine-promoting activity. Moreover, overexpression of this extracellular domain increases the frequency of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs). Biochemically, the NTD of GluR2 can interact directly with the cell adhesion molecule N-cadherin, in *cis* or in *trans*. N-cadherin-coated beads recruit GluR2 on the surface of hippocampal neurons, and N-cadherin immobilization decreases GluR2 lateral diffusion on the neuronal surface. RNAi knockdown of N-cadherin prevents the enhancing effect of GluR2 on spine morphogenesis and mEPSC frequency. Our data indicate that in hippocampal neurons N-cadherin and GluR2 form a synaptic complex that stimulates presynaptic development and function as well as promoting dendritic spine formation.

INTRODUCTION

α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolepropionate (AMPA) receptors are ionotropic glutamate receptors that mediate the majority of excitatory synaptic transmission in the mammalian central nervous system (CNS) (Dingledine et al., 1999). Changes in the number of postsynaptic AMPA receptors contribute to long-lasting changes in synaptic strength, including long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) (Malinow and Malenka, 2002) and dendritic spine enlargement (Kopec et al., 2006). AMPA

receptors are tetrameric complexes composed of up to four distinct subunits, of which GluR1, GluR2, and GluR3 predominate in mature hippocampal neurons (Wenthold et al., 1996). Each GluR subunit contains an extracellular NTD (also known as amino terminal domain [ATD]; residues 60–398 in GluR2), a ligand-binding domain, four hydrophobic domains of which M1, M3, and M4 traverse the membrane, and an intracellular carboxy-terminal tail (Wollmuth and Sobolevsky, 2004).

The NTD shows sequence homology to the bacterial periplasmic amino acid-binding protein LIVBP (leucine, isoleucine, valine-binding protein) (Masuko et al., 1999; O'Hara et al., 1993; Paoletti et al., 2000) and to the extracellular (ligand-binding) domain of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) (Armstrong et al., 1998; Stern-Bach et al., 1994). One function of the NTD of AMPA receptors is to specify the initial assembly of GluR subunits into dimers (Ayalon and Stern-Bach, 2001). Recently, we found that overexpression of specifically the GluR2 subunit promotes spine growth in cultured neurons and that this activity requires the NTD of GluR2 (Passafaro et al., 2003). Moreover, RNAi knockdown of GluR2 inhibits spine morphogenesis.

Dendritic spines are small protrusions on dendritic shafts that constitute the postsynaptic contact sites for the majority of excitatory synapses in the mammalian central nervous system (Harris and Kater, 1994; Hering and Sheng, 2001). Spines are heterogeneous in shape and size, and their density and morphology are influenced by many factors, including age and hormonal status (Harris, 1999; Hering and Sheng, 2001; Nimchinsky et al., 2002). Although their function remains unclear, dendritic spines are considered to play critical roles in the regulation of synaptic transmission in normal and pathological conditions (Fiala et al., 2002; Nimchinsky et al., 2002).

Classic cadherins are single-pass transmembrane proteins with five ectodomain repeats (EC1–EC5 domains) that are separated by calcium-binding sites, and a short intracellular domain that is conserved between family members. The N-terminal domain mediates the homophilic

adhesion, while the c-terminal tail binds α - and β -catenins and anchors the cadherin complex to the actin cytoskeleton (Bamji, 2005; Boggon et al., 2002; Pertz et al., 1999). Some structural and functional data indicate that the most membrane-distal EC domain (EC1) is important for both adhesion and recognition (Boggon et al., 2002; Nose et al., 1990; Shapiro et al., 1995; Tamura et al., 1998), while other work suggests that all of the EC domains participate in the adhesive interface (Chappuis-Flament et al., 2001). However, it is generally agreed that multiple *trans* interactions between cadherin proteins on adjacent cells cooperate in generating strong intercellular adhesion (Boggon et al., 2002; Gumbiner, 2005; Yap et al., 1997). Lateral (*cis*) interactions between cadherins are regulated by proteins binding to juxtamembrane domain (Yap et al., 1997), while the principal link to actin occurs over an extended portion of the C-tail where β -catenin binds to cadherin and to α -catenin, which in turn binds directly to actin (Elste and Benson, 2006). Cadherins and their associated proteins have been observed in many neuronal populations in CNS (Salinas and Price, 2005). The expression and subcellular distribution of cadherins vary with the type and developmental stage of a synapse (Salinas and Price, 2005). The most prominent cadherin in neurons, N-cadherin, is known to be important for pre- and postsynaptic adhesion. N-cadherin plays a key role during synaptogenesis, neurite outgrowth, dendrite arborization, and axon guidance (Benson and Tanaka, 1998; Nakai and Kamiguchi, 2002; Yu and Malenka, 2003). During later stages of development, N-cadherin is concentrated at synapses (Beesley et al., 1995; Uchida et al., 1996), where it is involved in the regulation of synaptic adhesion, function, and plasticity (Bozdagi et al., 2000; Murase et al., 2002; Okamura et al., 2004; Tanaka et al., 2000; Togashi et al., 2002). N-cadherin and its interaction with catenins is essential for proper development of dendritic spines (Takeichi and Abe, 2005).

Here we investigate the molecular basis of GluR2's ability to promote spine growth and enlargement. Unexpectedly, we find that the NTD of GluR2 (but not GluR1) mediates a specific and direct interaction with N-cadherin, an extracellular interaction that can occur in *cis* or in *trans* membranes. Moreover, RNAi experiments show that N-cadherin is required for the effect of GluR2-NTD overexpression on spine growth. Our results suggest that N-cadherin and GluR2 form a synaptic complex that stimulates synaptic function and promotes dendritic spine growth and formation.

RESULTS

NTD of GluR2 Is Sufficient to Induce Spine Enlargement and Affect Synaptic Activity

To test the role of GluR2's NTD in spine growth, we constructed a series of chimeras in which the NTD of GluR2 was fused to the transmembrane domain of unrelated membrane proteins: pDisplay (containing a transmembrane region of PDGF receptor) or CD4 (a T-lymphocyte

surface protein) (Maddon et al., 1985), giving rise to NTDR2-pDisplay and NTDR2-CD4 (Figure 1A). Overexpression of NTDR2-CD4 or NTDR2-pDisplay chimeras in mature cultured hippocampal neurons (22 days in vitro [DIV22]; visualized by cotransfected enhanced green fluorescent protein [EGFP]) caused an increase in spine length and an enlargement of spine heads compared to neurons transfected with EGFP alone (Figures 1A and 1C and Table 1). In younger neurons (DIV11), NTDR2-pDisplay or NTDR2-CD4 overexpression induced an increase in the length and density of filopodia-like protrusions compared to control (Table 1). In cumulative frequency plots, neurons overexpressing NTDR2-pDisplay or NTDR2-CD4 showed a roughly parallel rightward shift in spine diameter and length (Figure 1C). The density of spines was also increased ~ 1.5 - and ~ 1.7 -fold by overexpression of NTDR2-pDisplay and NTDR2-CD4, respectively (Figure 1D and Table 1). By contrast, overexpression of NTDR1-pDisplay (NTD from GluR1 fused to pDisplay) reduced the length and width of spines (Figures 1A–1C and Table 1), while overexpression of NTDR1-CD4 had no effect on the width but reduced the length of dendritic spines (Figures 1A–1C and Table 1). Thus, the extracellular NTD of GluR2 is sufficient to enhance spine density and growth when fused to a heterologous transmembrane protein.

Furthermore, we examined the staining of endogenous pre- and postsynaptic markers. In neurons overexpressing GluR2-NTD, but not GluR1-NTD, there was a significant increase in the number of puncta for synaptophysin (1.5 ± 0.11 relative to control, $p < 0.01$), bassoon (1.3 ± 0.12 relative to control, $p < 0.05$), shank (1.6 ± 0.13 relative to control, $p < 0.01$), and N-cadherin (1.6 ± 0.19 relative to control, $p < 0.05$) (Figures 2A and 2B). We also found that spines of GluR2-NTD-overexpressing cells showed increased staining intensity for synaptophysin (2.5 ± 0.12 relative to control, $p < 0.01$), shank (1.8 ± 0.21 relative to control, $p < 0.01$), bassoon (2.1 ± 0.18 relative to control, $p < 0.05$), and N-cadherin (2.5 ± 0.24 relative to control, $p < 0.01$), consistent with the expansion of spine head and synapse (Figures 2A–2C).

Given the morphological and molecular changes induced by NTDR2-pDisplay overexpression, we explored functional effects by recording spontaneous miniature EPSCs (mEPSCs) in cultured hippocampal neurons. Frequency of AMPA receptor-mediated mEPSCs increased greatly in neurons transfected with NTDR2-pDisplay, but not NTDR1-pDisplay (Figures 3A and 3B). The amplitude of mEPSCs was not significantly affected either by NTDR2-pDisplay or by NTDR1-pDisplay. Since changes in mEPSC frequency generally reflect altered number of synapses or presynaptic release probability, we used FM1-43 dye uptake to evaluate the number of functional presynaptic terminals contacting transfected neurons. Indeed, GluR2-NTDR2 overexpression was associated with a marked increase in FM1-43 staining density associated with the transfected neurons (2.1 ± 0.01 relative to control neurons transfected with DsRed, $p < 0.01$), which correlated with the elevated mini frequency (Figures 3A and 3B).

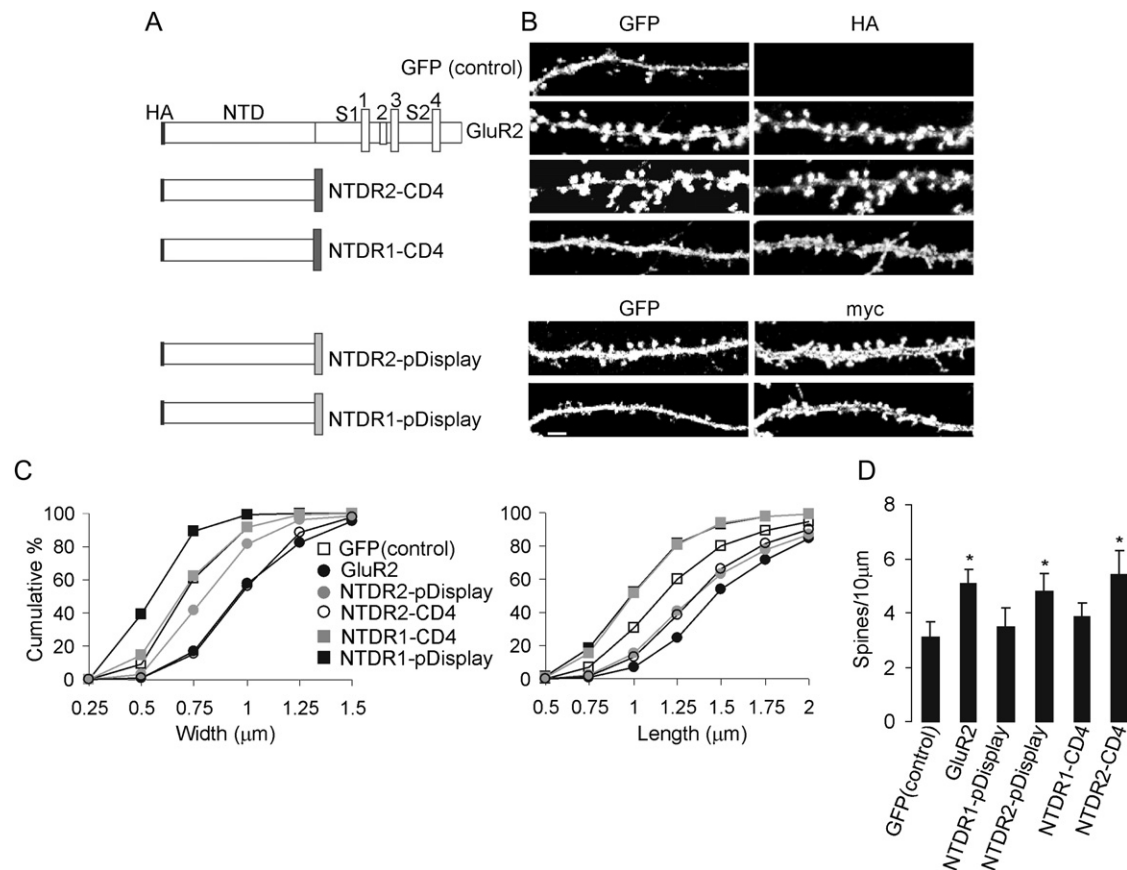


Figure 1. NTDR2 Is Sufficient to Induce Spine Modifications in Hippocampal Neurons

(A) Diagram of chimeric constructs between NTD GluRs and pDisplay or CD4.

(B) The hippocampal neurons were transfected with EGFP alone (control) or with EGFP and NTD chimeras, as indicated at left. Each pair of images shows the transfected chimeric construct stained by HA or Myc (right) and cotransfected EGFP fluorescence to outline dendrite/spine morphology (left). Scale bars, 2.5 µm (high magnification).

(C) Cumulative frequency plots of spine length (µm) and spine head width (µm) in neurons transfected as in (B) (>1000 spines and >18 neurons examined for each construct).

(D) Quantification of spine density (number of spines per 10 µm of dendrite length) in neurons transfected as in (B) (>16 neurons examined for each construct). Histograms show mean values ± SEM.

These findings indicate that overexpression of membrane-attached NTDR2, but not NTDR1, is sufficient to increase the number of functionally detectable AMPA receptor-containing synapses and to induce an enhancement in presynaptic function (or increased number of functional presynaptic contacts) onto the transfected cell. Together these results show that the NTD of GluR2 stimulates presynaptic development and function as well as dendritic spine formation. Since the NTD is an extracellular domain, it could achieve this effect by interaction with a surface protein of the postsynaptic or presynaptic membrane.

N-Terminal 92 Amino Acids of the Extracellular Domain Are Essential for GluR2's Spine-Promoting Activity

To narrow down the region within the NTD of GluR2 responsible for its spine-promoting effects, we made chimeric swaps between the NTDs of GluR1 and GluR2 using

as boundary two small regions conserved in both subunits (GVYAIFGFV, ending at residue 92 for GluR2 and at 87 for GluR1; and LFQDLE, ending at residue 199 for GluR2 and 190 for GluR1). The chimera GluR2(199)R1 (obtained by replacing the first 190 amino acids of GluR1 with the first 199 aa of GluR2) induced an increase in spine length and spine head width compared to neurons transfected with GFP alone (Figures 4A–4C and Table 1). GluR2(92)R1 (obtained by replacing the first 87 amino acids of GluR1 with the first 92 aa of GluR2) also increased spine dimensions (Figures 4A–4C). Spine density was also significantly enhanced by GluR2(92)R1 and GluR2(199)R1 (Figure 2D). Deletion of the first 92 aa (Δ 92GluR2) abolished the spine-promoting activity of GluR2-NTD (Figures 4B and 4C and Table 1).

The converse chimeras in which the NTD of GluR2 is partly replaced with the NTD of GluR1 [GluR1(87)R2 and GluR1(190)R2] had no effect on spine morphology

Table 1. Dendritic Spine Size and Density (Mean ± SEM) in Neurons Transfected with GluR Constructs

Age of Culture	Transfected/Treated with	Length of Spine (μm)	Width of Spine Head (μm)	Number of Spines/10 μm
DIV22	GFP (control)	1.26 (±0.14)	0.73 (±0.06)	3.09 (±0.56)
DIV22	GFP + HA-GluR2	1.67 (±0.21) ^c	1.04 (±0.11) ^c	5.10 (±0.48) ^c
DIV22	GFP + NTDR2-pDisplay	1.45 (±0.19) ^c	0.83 (±0.06) ^b	4.8 (±0.66) ^c
DIV22	GFP + NTDR1-pDisplay	1.03 (±0.09)	0.57 (±0.07)	3.5 (±0.71)
DIV22	GFP + NTDR2-CD4	1.43 (±0.10) ^c	0.98 (±0.10) ^c	5.4 (±0.90) ^c
DIV22	GFP + NTDR1-CD4	1.02 (±0.13)	0.68 (±0.11) ^a	3.85 (±0.51)
DIV22	GFP + GluR1(87)R2	1.08 (±0.05) ^c	0.66 (±0.01) ^a	3.27 (±0.6)
DIV22	GFP + GluR2(92)R1	1.41 (±0.09) ^b	0.99 (±0.10) ^c	4.7 (±0.9) ^b
DIV22	GFP + GluR1(190)R2	1.00 (±0.11) ^c	0.64 (±0.06) ^a	3.8 (±0.5)
DIV22	GFP + GluR2(199)R1	1.54 (±0.15) ^c	0.84 (±0.04) ^c	4.63 (±0.52) ^b
DIV22	GFP + Δ92GluR2	0.98 (±0.07) ^c	0.63 (±0.05) ^c	3.35 (±0.22)
DIV22	GFP + NTDR2-pD (int.)	1.33 (±0.19)	0.89 (±0.16)	2.9 (±0.18)
DIV22	GFP + GluR2(92)R1 (int.)	1.35 (±0.22)	0.90 (±0.19)	2.6 (±0.19)
DIV22	PLL3.7 (control)	1.20 (±0.12)	0.70 (±0.11)	3.5 (±0.12)
DIV22	N-cadhsiRNA	1.19 (±0.10)	0.69 (±0.07)	3.1 (±0.14)
DIV22	siRNA + GluR2(199)R1	1.23 (±0.15)	0.71 (±0.01)	3.3 (±0.34)
DIV22	scramble + GluR2(199)R1	1.50 (±0.19) ^c	0.87 (±0.10) ^c	4.68 (±0.22) ^b
DIV22	siRNA + NTDR2-pDisplay	1.30 (±0.15)	0.75 (±0.20)	3.1 (±0.16)
DIV22	Scramble + NTDR2-pDisplay	1.47 (±0.20) ^c	0.90 (±0.25) ^c	4.7 (±0.20) ^b
DIV11	GFP (control)	1.01 (±0.14)	0.61 (±0.15)	3.0 (±0.16)
DIV11	GFP + HA-GluR2	1.63 (±0.22) ^c	0.72 (±0.20)	5.0 (±0.09) ^c
DIV11	GFP + NTDR2-pDisplay	1.60 (±0.11) ^c	0.69 (±0.18)	4.6 (±0.22) ^c
DIV11	GFP + NTDR2-CD4	1.58 (±0.12) ^c	0.70 (±0.18)	4.9 (±0.20) ^c

^a p < 0.05, cf. control neurons.

^b p < 0.01, cf. control neurons.

^c p < 0.001, cf. control neurons (Student's t test).

and density (Figures 4A–4D). Indeed, GluR1(87)R2, GluR1(190)R2, and Δ92GluR2 seemed to have a dominant-negative effect on spine size and spine density.

Frequency, but not amplitude, of mEPSCs was significantly increased in cultured hippocampal neurons expressing GluR2(199)R1 or GluR2(92)R1 constructs (Figure 4E). These results demonstrate that the N-terminal 92 amino acid region of the NTD is sufficient to promote spine morphogenesis and synaptic function.

GluR2 has been shown to induce spine-like protrusions in GABAergic interneurons that usually lack spines (Pascasafaro et al., 2003). The NTDR2-CD4 and NTDR2-pDisplay constructs also induced spine-like protrusions in GABAergic neurons, as did GluR2(92)R1 (see Figure S1 in the Supplemental Data available online).

GluR2 and N-Cadherin Are Associated in Neurons

We hypothesized that the NTD of GluR2 is the specific site for an extracellular protein-protein interaction. To seek

such interacting partners of endogenous GluR2-NTD, surface proteins of neuron cultures were first crosslinked with DTSSP (a nonpermeant crosslinking reagent) and then examined in two-dimensional (2D) diagonal gel electrophoresis (Chan et al., 1998). The first (horizontal) dimension of electrophoresis was performed under nonreducing conditions, and the second (vertical) dimension of the gel was performed under reducing conditions (see Figure S2A). Proteins that are not crosslinked will have the same mobility in both dimensions and will end up on a diagonal line in the gel. Proteins crosslinked by DTSSP will be reduced into their monomeric components in the second dimension and will therefore appear below the diagonal line (Figure S2A). By Western blot analysis of neurons treated with DTSSP, we found that one band below the diagonal line (~100 kDa) was recognized by anti-GluR2 antibody (Figure S2B). To identify specific proteins associated with GluR2, extracts of DTSSP crosslinked neurons were immunopurified with GluR2 C-terminal antibodies

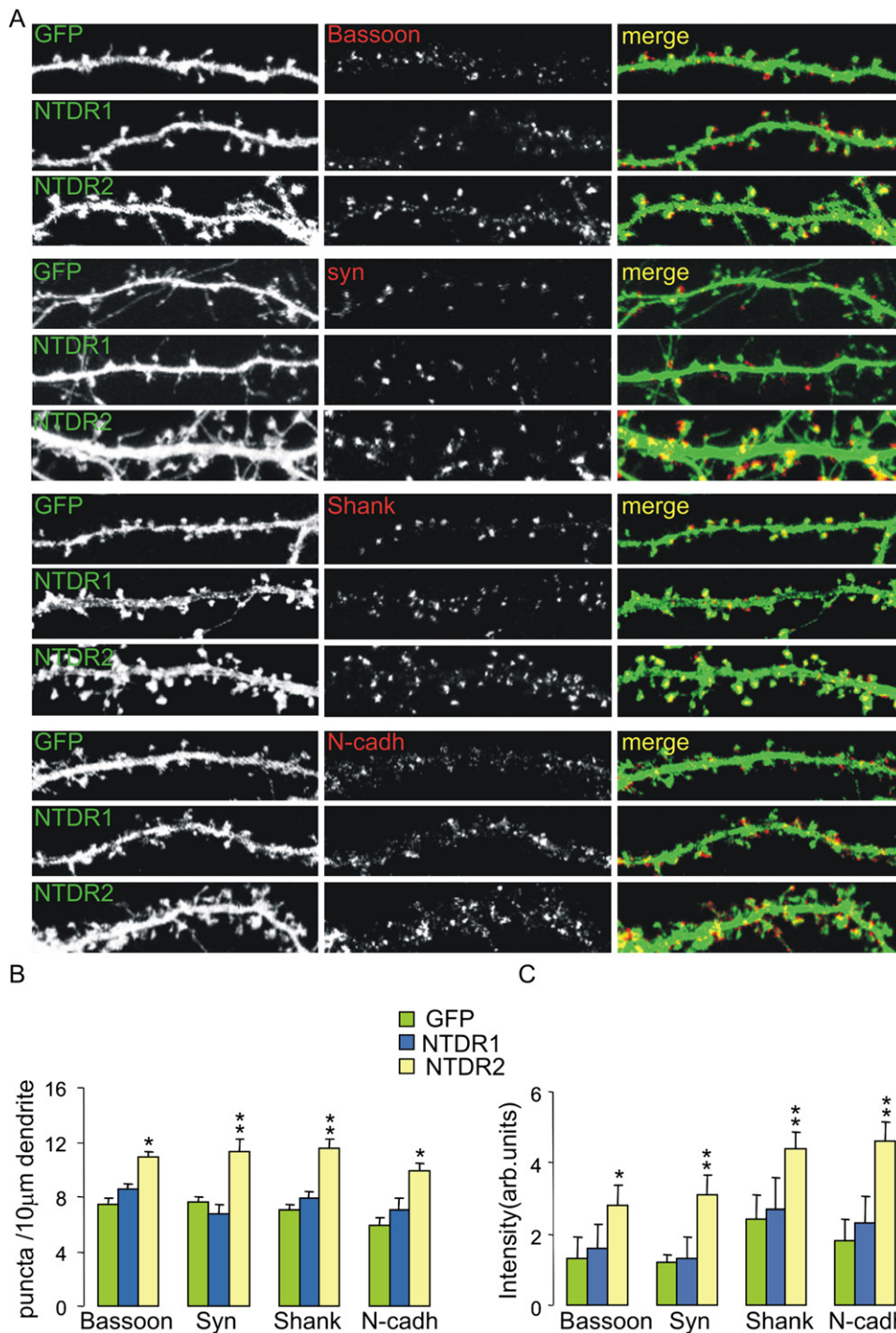


Figure 2. GluR2-NTDR2 Promotes Increased Number of Synapses and Accumulation of Endogenous Synaptic Proteins

(A) Hippocampal neurons at DIV14 were transfected with NTDR2-pDisplay or NTDR1-pDisplay (*myc*-tagged at the N terminus) or with EGFP control and were stained at DIV22. Each row of images shows double labeling for NTDR2 or NTDR1 or GFP (green, left panel) and shank, synaptophysin, bassoon, or N-cadherin (red, middle panel); merge is shown in color in right panel. Individual channels are shown in grayscale.

(B) Quantitation of puncta density of shank, synaptophysin, bassoon, or N-cadherin induced by overexpression of NTDR2-pDisplay (>7 neurons analyzed for each protein; 40 to 70 synapses scored per neuron).

(C) Quantitation of synaptic staining intensity of bassoon, synaptophysin, shank, and N-cadherin induced by overexpression of NTDR2-pDisplay (>7 neurons analyzed for each protein; 40 to 70 synapses scored per neuron). Histograms show mean values \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

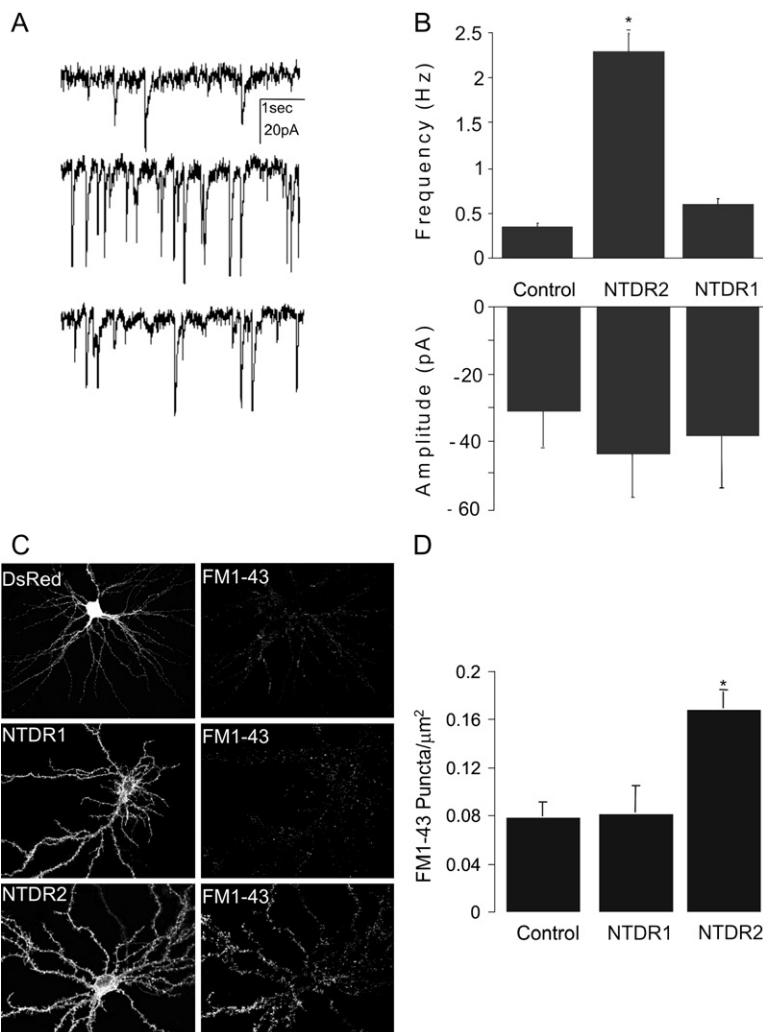


Figure 3. Functional Synaptic Effects of GluR2-NTDR2 Overexpression

NTDR2-pDisplay, but not NTDR1-pDisplay, transgene increased synaptic activity.

(A and B) mEPSCs recorded in control (upper), NTDR2- (middle), and NTDR1-transfected (bottom) neurons; histograms show frequency and amplitude (means \pm SEM, $n = 10$) of mEPSCs recorded from control neurons and neurons transfected with NTDR1 or NTDR2-pDisplay at DIV18. * indicates significantly different from control with $p < 0.001$.

(C) FM1-43 staining of functional presynaptic terminals on transfected neurons at DIV18.

(D) Quantitation of puncta density of FM1-43 staining on transfected cells at DIV18. Histograms show mean \pm SEM; control with neurons transfected with DsRed. * $p < 0.001$.

and the isolated proteins resolved by diagonal electrophoresis. Silver staining showed a prominent series of bands and spots below the diagonal (Figure 5A, bracket). Mass spectrometry of these spots identified AMPA receptor subunits GluR1, GluR2 at ~ 100 kDa, stargazin (γ -2) around 50 kDa, and TARP family protein γ -8 in the 50 kDa spot, and N-cadherin in the spot at ~ 130 kDa (see Table S1). Additional proteins like tubulin, glyceraldehyde dehydrogenase, and HSP90—probable contaminants—were also detected by mass spectrometry (Table S1). Immunoblotting confirmed the presence of GluR2 (Figure 5A) and N-cadherin below the diagonal in the GluR2 immunoprecipitates from surface crosslinked cultures (Figure 5A). These data suggest that AMPA receptor complexes and N-cadherin interact closely on the surface of neurons.

To confirm the association of N-cadherin with GluR2, we performed conventional coimmunoprecipitation studies. From DTTSP surface crosslinked cultures, the GluR2 antibodies were able to coprecipitate N-cadherin as well as stargazin (Figure 5B). We also found GluR1 and

β -catenin, but not NR1 and neuroligin-1, in the GluR2 precipitates (Figure 5B). In noncrosslinked samples, coimmunoprecipitation of N-cadherin with GluR2 was greatly diminished (Figure 5B), whereas stargazin and β -catenin remained robustly associated with GluR2, as expected (Figure 5B) (Dunah et al., 2005). These results suggest that GluR2 and N-cadherin interact closely on the neuronal surface and show that their association requires extracellular disulfide bonding to remain intact in a coimmunoprecipitation assay.

NTD of GluR2 Directly Binds N-Cadherin in Heterologous Cells

To corroborate the interaction between GluR2 and N-cadherin, we tested for their biochemical association when overexpressed in HEK cells. N-cadherin was cotransfected with wild-type GluR2 (Myc-GluR2) or various mutant constructs, or with a GluR2 construct lacking the entire C-terminal tail (GluR2 Δ 50C), or with NTDR2-pDisplay. As control, we cotransfected N-cadherin with GluR2 lacking the NTD (GluR2 Δ NTD) or GluR1 lacking the last

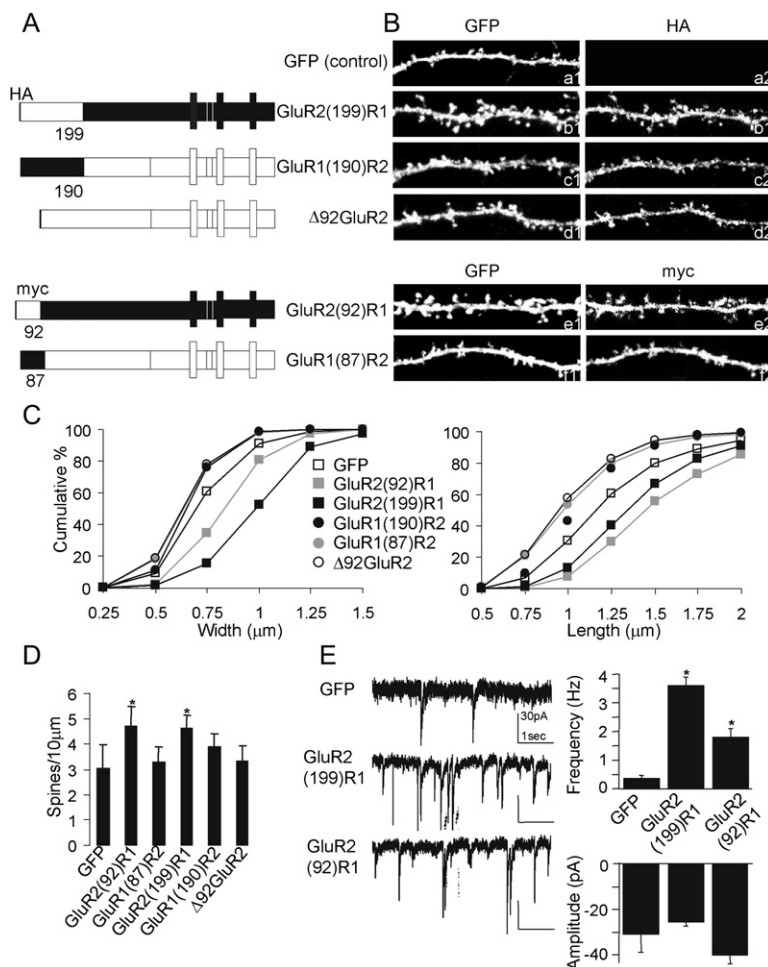


Figure 4. Spine-Inducing Determinants of the Extracellular Domain of GluR2

(A) Diagram of chimeric constructs between GluR1 and GluR2 (all HA or *myc*-tagged at the N terminus).

(B) The hippocampal neurons were transfected with EGFP alone (control) or EGFP plus various HA-GluR constructs, as indicated at left. Each pair of images (a1/a2, b1/b2, etc.) shows the transfected GluR construct stained by HA antibodies (right), and EGFP fluorescence to outline dendrite/spine morphology (left).

(C) Cumulative frequency plots of spine length (μm) and spine head width (μm) in neurons transfected as in (B) (>1000 spines and >18 neurons examined for each construct).

(D) Quantitation of spine density (number of spines per 10 μm dendrite length; mean values \pm SEM) in neurons transfected as in (B) (>16 neurons, >180 dendrites examined for each construct). * Histograms show mean values \pm SEM *, $p < 0.01$.

(E) Representative traces and average frequency and amplitude histograms (mean \pm SEM) of mEPSCs recorded in control neurons (GFP, $n = 26$) and neurons cotransfected with the indicated plasmids [GluR2(199)R1, $n = 18$; GluR2(92)R1, $n = 8$] and GFP. Values with an asterisk are significantly different from control ($p < 0.001$).

4 residues (GluR1 Δ 4C). We used GluR1 Δ 4C and not GluR1 lacking the entire C-terminal tail, because the latter construct (GluR1 Δ C) when overexpressed in HEK cells was poorly expressed on the cell surface and remained mainly intracellular. N-cadherin coimmunoprecipitated with wild-type GluR2, GluR2 Δ 50C, and GluR2(92)R1, but not with GluR1 Δ 4C, GluR1(87)R2, GluR2 Δ NTD, or Δ 92GluR2 (Figure 5C). N-cadherin also coimmunoprecipitated with NTDR2-pDisplay (Figure 5C). These data demonstrate that GluR2 and N-cadherin interact in heterologous cells via the NTD of GluR2, without need for the cytoplasmic tail of GluR2.

Next, we tested whether extracellular soluble immunoglobulin Fc fusion proteins of GluR2-NTD (Fc-NTDR2) or GluR1-NTD (Fc-NTDR1) applied extracellularly could bind specifically to the surface of HEK cells overexpressing N-cadherin. Cell-surface binding of Fc-NTD was detected by anti-Fc antibody conjugated to horseradish peroxidase. Specific binding was calculated by subtracting the binding of Fc-NTD to untransfected HEK cells ("background" binding) from the binding of Fc-NTD to cells transfected with N-cadherin (Figure 5D). Fc-NTDR2 showed robust specific binding to cells expressing N-cadherin; in com-

parison, Fc-NTDR1 binding to N-cadherin-transfected cells was barely above background (Figure 5D). Furthermore, the first 92 or the first 160 residues of NTDR2 fused to GST, but not GST alone, were able to pull down soluble immunoglobulin Fc fusion proteins of N-cadherin (Figure 5E). Together, these results indicate an extracellular interaction between the NTD of GluR2 and N-cadherin, which is likely to be direct.

We used a cell aggregation assay to test whether N-cadherin and GluR2 expressed on the surface of different cells can interact in *trans*. HEK cells were first separately transfected with N-cadherin-GFP, GluR2-DsRed, NTDR2-DsRed-pDisplay, or DsRed alone. On the following day, the cells were dissociated by trypsin, and an equal number of cells were mixed and incubated under gentle agitation for 90 min in the following combination: N-cadherin-GFP cells plus GluR2-DsRed cells, N-cadherin-GFP plus DsRed, or N-cadherin-GFP plus NTDR2-DsRed-pDisplay. We observed that N-cadherin-expressing cells formed aggregates with themselves (presumably through homophilic interaction) (Figure 6A) but also with cells expressing GluR2-DsRed or NTDR2-DsRed-pDisplay (Figure 6A). To quantify the aggregation, the number of individual

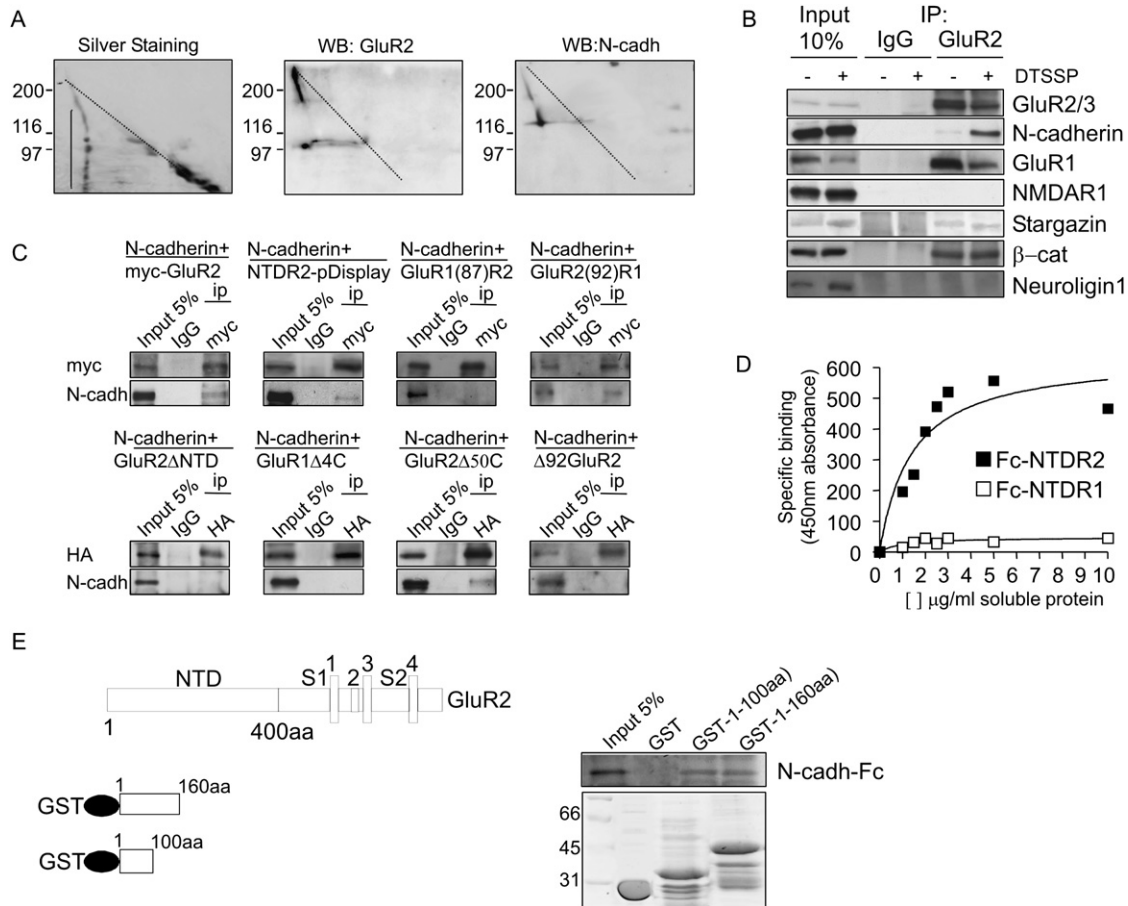


Figure 5. GluR2 and N-Cadherin Are Associated in Neurons, and the NTD of GluR2 Directly Binds N-Cadherin

(A) Silver staining of 2D diagonal gel (see Figure S1 for explanation) of proteins from neurons crosslinked with DTSSP and immunopurified with GluR2 antibodies. The spots and bands below the diagonal indicated the proteins coimmunopurified with GluR2. Immunoblotting shows GluR2 and N-cadherin below the diagonal in the immunopurified preparation.

(B) Hippocampal neuron cultures crosslinked with DTSSP (+) or not crosslinked (-) with DTSSP were immunoprecipitated with GluR2 antibodies and then immunoblotted under reducing conditions to look for coimmunoprecipitation of the indicated proteins.

(C) N-cadherin coimmunoprecipitates with Myc-tagged GluR2, GluR2 Δ 50C, NTDR2-pDisplay, and GluR2(92)R1, but not with GluR1 Δ 4C, GluR1(87)R2, GluR2 Δ NTD, or Δ 92GluR2, from HEK cells cotransfected as indicated.

(D) Direct binding of soluble Fc-NTDR2 or Fc-NTDR1 to HEK cells transfected with N-cadherin.

(E) Western blot analysis of soluble purified Fc-N-cadherin that was pulled down by the first 92 or the first 160 residues of NTDR2 fused to GST is shown. At bottom is shown the Coomassie stain of the GST proteins.

(i.e., not-aggregated) transfected cells in 50 μ l was counted immediately after the cells were mixed (N_0) and after 90 min of incubation (N_t). The N_0/N_t ratio is directly related to the number of cells forming aggregates during the 90 min. The N_0/N_t ratio value was high for cells transfected with N-cadherin in all mixture conditions. The N_0/N_t ratio for cells transfected with GluR2-DsRed or NTDR2-DsRed-pDisplay was low when the cells were mixed with untransfected cells, but increased when they were incubated with cells expressing N-cadherin (Figure 6B). Cells transfected with DsRed did not aggregate when mixed with N-cadherin-expressing cells. These findings show that, in heterologous cells, GluR2 (presumably via the NTD) can interact *in trans* with N-cadherin.

N-Cadherin-Coated Beads Recruit GluR2 in Hippocampal Neurons

To investigate the extracellular association of GluR2 and N-cadherin on the surface of neurons, we measured the recruitment of AMPA receptors by N-cadherin-coated beads (Thoumine et al., 2006). Coated beads were applied for 30 min to hippocampal neurons transfected with fluorescently tagged GluR subunits. As positive control, we showed that DsRed-tagged N-cadherin expressed in neurons was recruited to N-cadherin-bearing beads (Figure 7A). The negative controls NR1-Venus and NR2A-Venus showed very slight enrichment under the beads (fluorescence ratio was near 1) (Figures 7B and 7C and Table S2). GluR2 tagged with YFP at its C terminus and

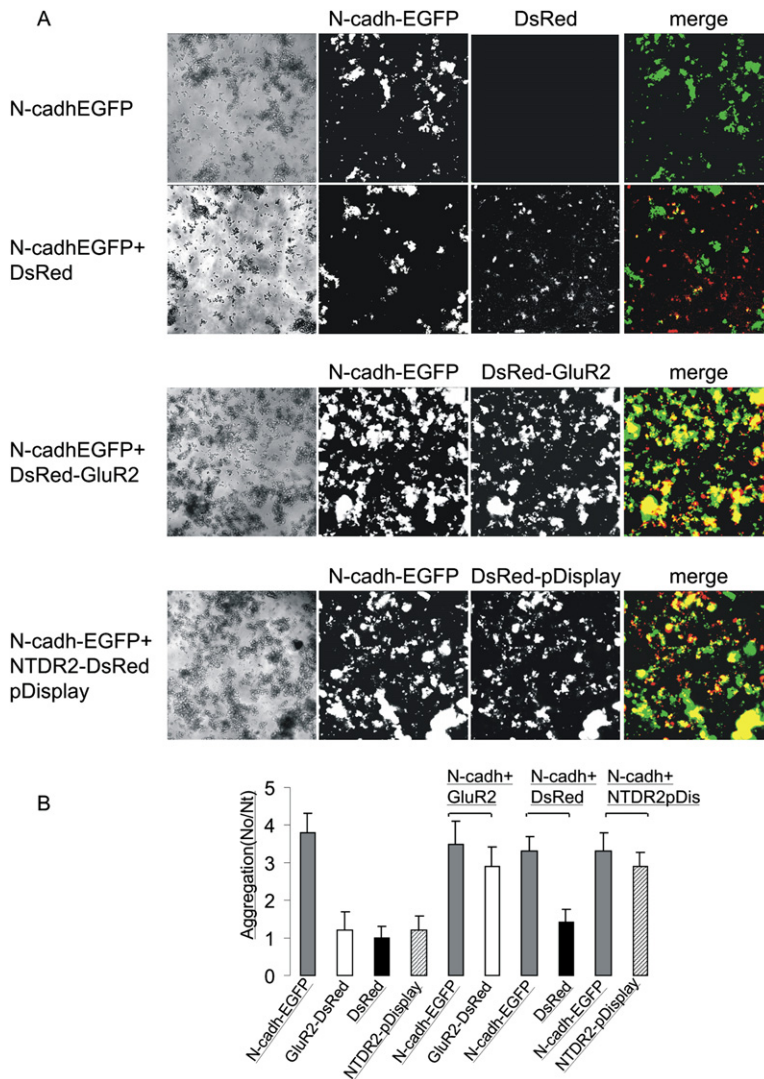


Figure 6. GluR2 NTD and N-Cadherin Can Interact in *trans* in HEK Cells

(A) Equal numbers of HEK cells expressing N-cadherin-EGFP or GluR2-DsRed or DsRed or NTDR2-DsRed-pDisplay were mixed and incubated under gentle agitation for 90 min in the following combinations: N-cadherin-EGFP alone, N-cadherin-EGFP plus DsRed, N-cadherin-EGFP plus GluR2-DsRed cells, or N-cadherin-EGFP plus NTDR2-DsRed-pDisplay, as indicated. N-cadherin-EGFP-expressing cells form aggregates with themselves. GluR2-DsRed cells or NTDR2-DsRed-pDisplay cells form aggregates when mixed with N-cadherin-EGFP-expressing cells.

(B) The histograms show HEK cell aggregation plotted as the number of non-aggregated HEK cells at the time of mixing (N_0) divided by the number of non-aggregate cells after 90 min (N_t). The N_0/N_t ratio is directly related to the number of cells forming aggregates during the 90 min. Histogram shows the mean values \pm SEM of seven determinations.

GluR2 tagged with GFP at its N terminus, as well as *myc*-NTDR2-pDisplay (visualized with anti-*myc* staining), accumulated at the N-cadherin-bead contact sites, albeit less strongly than DsRed-N-cadherin. NTDR1-pDisplay and *myc*GluR1(87)R2 were also recruited to N-cadherin beads, but to a lesser extent than NTDR2-pDisplay (Figures 7B and 7C and Table S2). No recruitment of GluR2 was observed by beads coated with the extracellular domain of cadherin 11. In cells cotransfected with N-cadherin-DsRed and GluR2-YFP, there was a strong positive correlation between the amount of recruitment of both proteins under N-cadherin-coated beads (Figure 7D).

We also applied beads coated with an antibody directed against the extracellular region of N-cadherin (Gc4). The Gc4-coated beads recruited GluR2-YFP, GluR2-GFP, and NTDR2-pDisplay (Figures 7B and 7C and Table S2). Again, the recruitment of NR1 and NR2, NTDR1-pDisplay and *myc*GluR1(87)R2 was significantly weaker than that of GluR2 or NTDR2.

The ability of Gc4 beads to recruit GluR2 (presumably secondarily to N-cadherin) suggests that N-cadherin and GluR2 can interact directly or indirectly in *cis* (i.e., in the same postsynaptic membrane). By extrapolation, it is possible that N-cadherin beads also recruit GluR2 secondarily to recruitment of N-cadherin. If that is the case, there should be a direct correlation between the amount of N-cadherin-DsRed accumulated and that of GFP- or YFP-tagged GluR2. We note, however, that relative to N-cadherin-coated beads, Gc4 antibody beads were more effective in recruiting N-cadherin to sites of contact than in recruiting GluR2 (see Figure 7C, green bars). This further suggests that N-cadherin-coated beads can recruit GluR2 by interacting with neuronal surface GluR2 in *trans*.

N-Cadherin Modifies GluR2 Surface Diffusion

To further analyze the functional interaction of N-cadherin and GluR2, we assessed how GluR2 surface diffusion was affected by crosslinking or overexpression of N-cadherin.

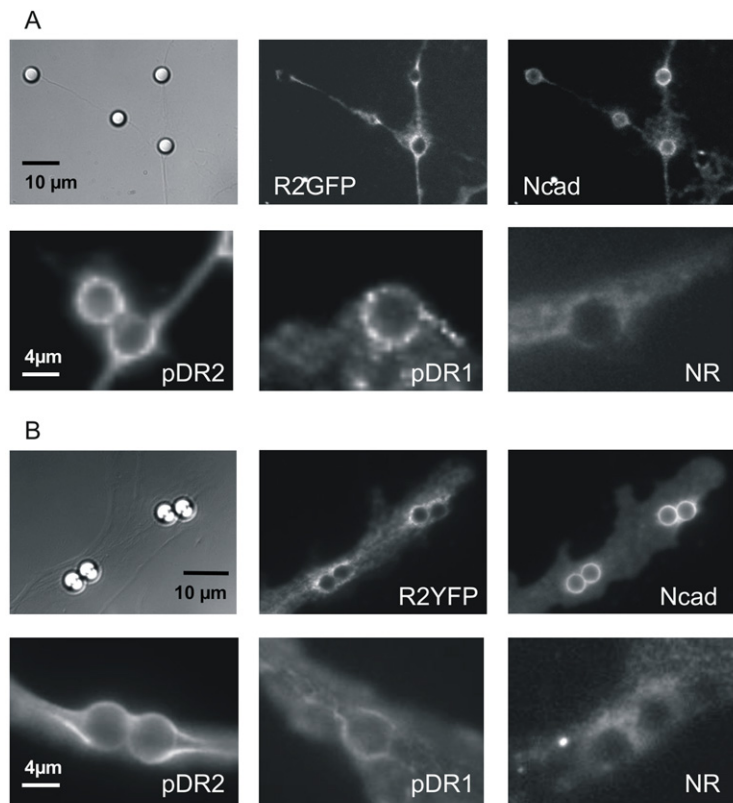


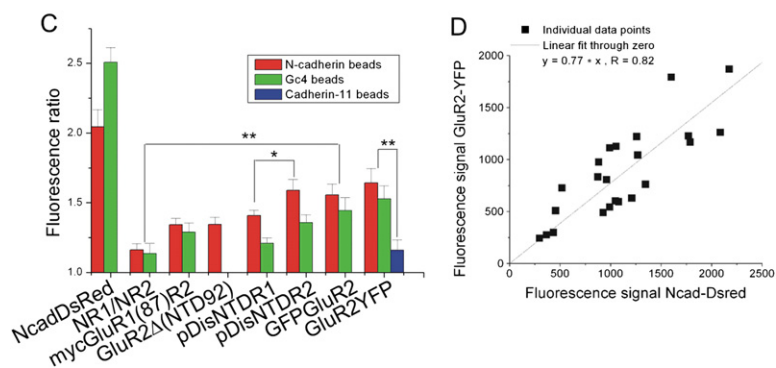
Figure 7. Micrographs Showing the Recruitment of Transfected Receptors by N-Cadherin-Coated Beads

(A) (Top) Images in transmission, GluR2-EGFP fluorescence, and N-cadherin-DsRed fluorescence (N-cadh-DsRed). (Bottom) NTDR2-pDisplay, anti-*myc* staining; NTDR1-pDisplay, anti-*myc* staining; cotransfected NR1-Venus and NR2-Venus.

(B) Micrographs showing the recruitment of transfected receptors by Gc4-coated beads. (Top) Images in transmission, GluR2-YFP fluorescence, and N-cadherin-DsRed fluorescence (N-cadh-DsRed). (Bottom) NTDR2-pDisplay, anti-*myc* staining; NTDR1-pDisplay, anti-*myc* staining; NR: cotransfected NR1-Venus and NR2-Venus.

(C) Fluorescence ratio of cells transfected with each plasmid. Bar graph showing the mean of each distribution \pm standard error, plotted for N-cadherin-coated beads and Gc4-coated beads. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Cadherin-11-coated beads were used as controls on GluR2-YFP-transfected neurons.

(D) Plot of the fluorescence intensity of GluR2-YFP over N-cadherin-DsRed recruited under 23 individual N-cadherin-coated beads. Both proteins displayed a proportional recruitment as shown by the linear fit.



We first monitored the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of GluR2-GFP enriched at N-cadherin bead contact sites (Figures 8A and 8B). The kinetics of fluorescence recovery was slower at N-cadherin bead regions than in control dendritic regions, suggesting that GluR2 is retained at contact sites through a *trans* interaction with N-cadherin. By analyzing these data using a diffusion trapping model already described for N-cadherin homophilic interactions (Thoumine et al., 2006), we estimated that the lifetime of the N-cadherin-GluR2 *trans* binding is on the order of 25 min, confirming the rather labile interaction demonstrated in biochemical experiments (Figure 8B).

We then performed FRAP experiments on spontaneous GluR2 aggregates on neurons cotransfected with GluR2 and N-cadherin while crosslinking N-cadherins with the

Gc4 anti-N-cadherin antibody (Figure 8C). For these experiments we used Super Ecliptic pHluorin (SEP)-GluR2 and N-cadherin-DsRed or L1-GFP and N-cadherin-DsRed. Because of the pH sensitivity of SEP (pHluorin), only GluR2-SEP at the neuronal surface can be detected, whereas GluR2-SEP present in more acidic intracellular compartments is not visible. This allowed us to probe the diffusion of GluR2 at the plasma membrane only. The photobleaching spot was large enough so that both dendritic spines and the dendritic shaft were probed in these measurements. L1-GFP is a transmembrane protein that does not interact with N-cadherin and thus serves as a control to show that the overall membrane environment is not affected by N-cadherin crosslinking. The kinetics of surface GluR2 fluorescence recovery (measured by SEP-GluR2)

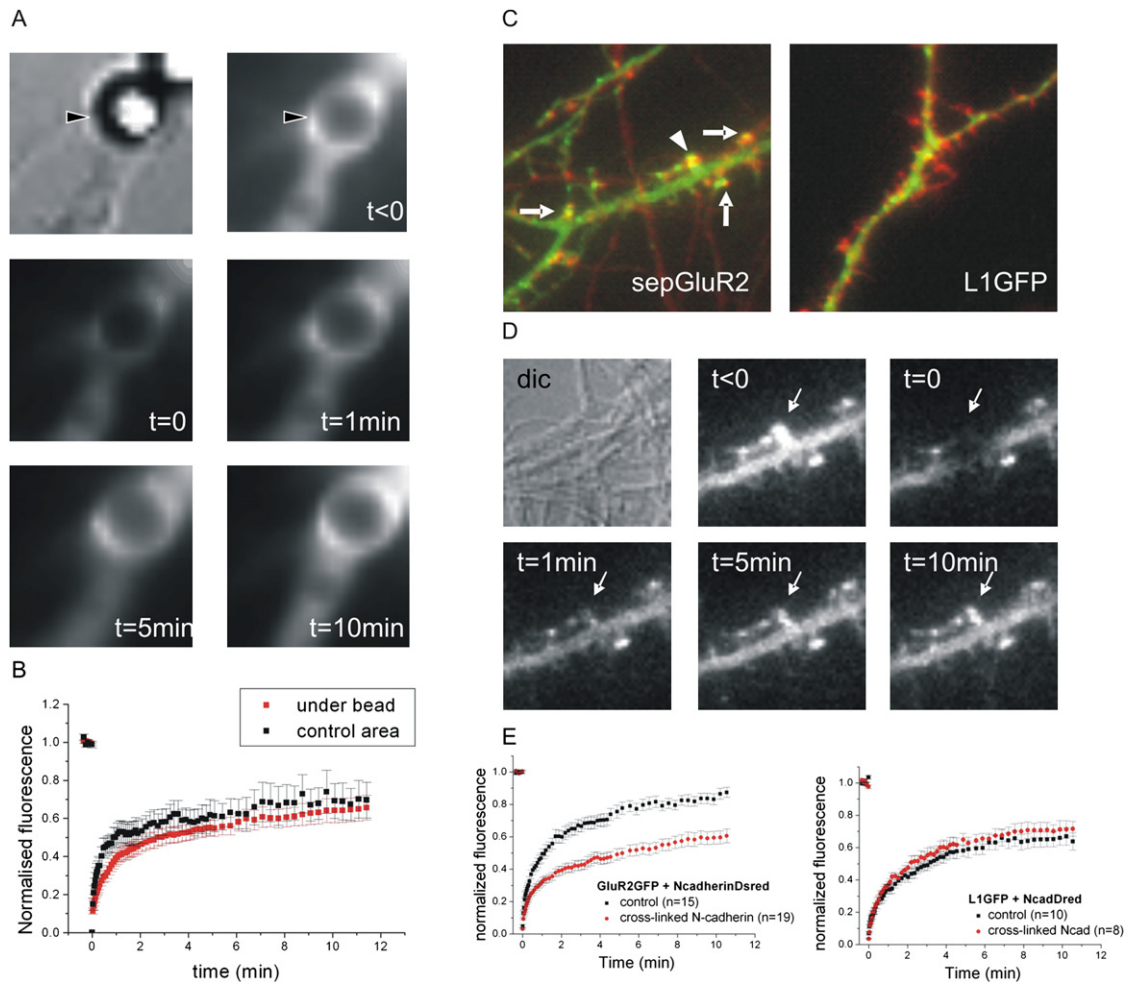


Figure 8. Fluorescence Recovery after Photobleaching of GluR2 under N-Cadherin-Coated Beads and with N-Cadherin Cross-linking

(A) Micrographs illustrating the photobleaching experiment on GluR2-YFP fluorescence enriched at contact site of N-cadherin-coated bead. On the transmission image, a bead that triggers a recruitment of GluR2-YFP is shown (head). Images before the laser bleaching, just after the bleaching, and at 1, 5, and 10 min after the bleaching are shown. Images are $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$.

(B) Plot of the recovery of fluorescence after photobleaching on N-cadherin-coated bead contact sites ($n = 20$) compared to control areas ($n = 7$) normalized to the prebleach fluorescence. Data are expressed as mean \pm SEM. The kinetics of the fluorescence recovery is different for the two curves.

(C) Micrographs showing the merged fluorescence signals of Super Ecliptic pFluorin (SEP)-GluR2 and N-cadherin-Dsred (left) or L1-GFP and N-cadherin-Dsred (right) (image size is $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$). Sites of colocalization of sepGluR2 and N-cadherin are shown by arrows. The arrowhead shows the region that is photobleached.

(D) Micrographs ($12.5\ \mu\text{m} \times 12.5\ \mu\text{m}$) illustrating the photobleaching experiment on a SEP-GluR2 fluorescence aggregate. Images before the laser pulse, just after the bleaching, and at 1, 5, and 10 min after the bleaching are shown.

(E) The fluorescence recovery in the presence or absence of anti-N-cadherin preaggregated antibodies was monitored. We could see no difference between the fluorescence recovery of L1-GFP with or without Gc4 incubation, whereas SEP-GluR2 fluorescence recovery is markedly delayed when incubated with Gc4 immobilizing antibody.

was markedly slowed when N-cadherins were crosslinked (Figures 8C–8E). The effect of N-cadherin crosslinking was specific for GluR2 as it did not affect the mobility of L1-GFP. These data suggest a *cis* interaction between N-cadherin and GluR2 with substantial longer lifetime than the *trans* interaction.

Together, these experiments indicate that immobilizing N-cadherins with either beads or crosslinking antibodies

reduces GluR2 surface diffusion, thus providing further evidence for a functional interaction between GluR2 and N-cadherin on the neuronal surface.

Inhibition of Synapse Morphology and Function by Knockdown of N-Cadherin

Finally, we inhibited expression of N-cadherin proteins in hippocampal neurons by plasmid-based expression of

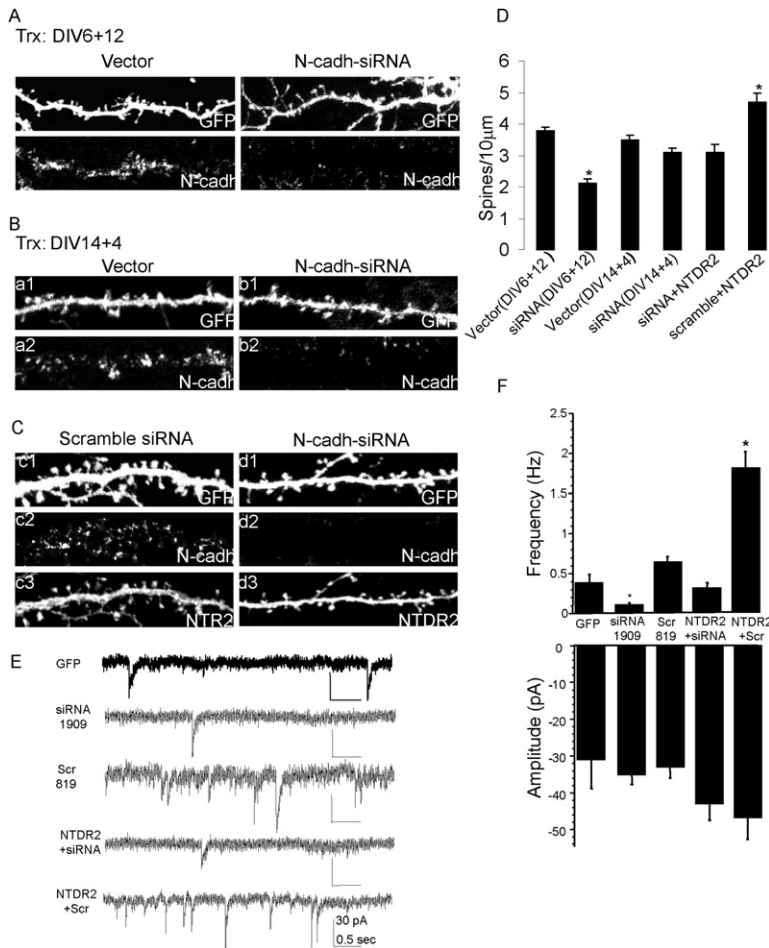


Figure 9. siRNA Knockdown of N-Cadherin Prevents the Effect of GluR2NTD on Spine Morphology and Synaptic Function

(A) Cultured hippocampal neurons transfected (Trx) on DIV6 with PII3.7-EGFP vector or N-cadh-siRNA and labeled on DIV18 for N-cadherin and EGFP, as indicated in each pair of images.

(B) Hippocampal neurons were transfected on DIV14 with PII3.7-EGFP or N-cadh-siRNA and labeled on DIV18 for N-cadherin and EGFP, as indicated in each pair of panels.

(C) Hippocampal neurons were transfected (Trx) on DIV14 with N-cadh-siRNA plus NTDR2-pDisplay or siRNA scramble plus NTDR2-pDisplay and labeled on DIV18.

(D) Quantification of spine density on hippocampal neurons transfected on DIV6 and labeled at DIV18 and neurons transfected on DIV14 and labeled on DIV18 (number of spines per 10 µm; 12 neurons for each treatment). * $p < 0.01$.

(E and F) Samples traces (E) and average frequency and amplitude histograms (mean \pm SEM; [F]) of mEPSCs recorded from control neurons (GFP, $n = 26$) and neurons cotransfected with the indicated plasmids (siRNA1909, $n = 10$; scramble819, $n = 8$; NTDR2 + siRNA1909, $n = 10$; NTDR2 + scramble819, $n = 8$) and GFP. In (F), values with an asterisk are significantly different from control ($p < 0.001$).

small interfering RNA (siRNA; N-cadherin immunostaining intensity was decreased to $<10\%$ of vector-transfected controls). DIV6 neurons transfected with N-cadherin siRNA (siRNA1909) for 12 days (DIV6 + 12) showed a reduced number of spines (Figures 9A and 9D). Neurons transfected with N-cadherin-siRNA at DIV14 for 4 days showed no significant change in spine morphology or density (Figures 9B and 9C and Table 1). It is important to note, however, cotransfection of N-cadherin-siRNA (DIV14 + 4), but not of scrambled N-cadherin-siRNA (siRNA 819), prevented the promoting effect of NTDR2-pDisplay or of GluR2(199)R1 on spine morphology and number (Figures 9B and 9C and Table 1). Neurons cotransfected with NTDR2-pDisplay or GluR2(199)R1 and a scrambled N-cadherin-siRNA sequence showed increased length, width, and density of spines (Figures 9C and 9D and Table 1).

We also tested the effects of N-cadherin-siRNA (siRNA 1909) or scrambled N-cadherin-siRNA (Scr 819), alone or in combination with the NTDR2-pDisplay (NTDR2), on mEPSCs (Figures 9E and 9F). N-cadherin-siRNA, but not scrambled N-cadherin-siRNA, by itself decreased the frequency of mEPSCs. This suggests that the N-cadherin

siRNA decreased the number of excitatory release sites, as expected from knockdown of endogenous N-cadherin expression. Coexpression with N-cadherin-siRNA completely inhibited the facilitatory effect of NTDR2-pDisplay on mEPSCs (compare NTDR2 + siRNA in Figures 9E and 9F to NTDR2 in Figure 3B). Indeed, coexpression of NTDR2-pDisplay with N-cadherin-siRNA restored the frequency of mEPSC to the control level (Figure 9F). This effect was probably due to a residual expression of N-cadherin, resulting from incomplete knockdown by N-cadherin-siRNA. The scrambled N-cadherin-siRNA (Scr 819) had no effect on mEPSCs, and it did not prevent the increase in mEPSC frequency induced by NTDR2-pDisplay (Figure 9F). These data indicate that normal expression of N-cadherin is essential for GluR2 NTD to exert its effect on spine morphogenesis and on synaptic function.

DISCUSSION

In this study we demonstrate a specific biochemical function and cell-biological activity of the NTD of GluR2. The NTD is sufficient to promote spine morphogenesis when

placed extracellularly on a heterologous membrane protein. In spines enlarged by NTDR2 there was increased accumulation of synaptophysin, bassoon, shank, and N-cadherin. Together with the enhanced minis and FM1-43 staining, these data suggest that NTDR2 induces an increase in the number, size, and function of synapses.

We observed an increase in the frequency, but not amplitude, of mEPSCs following expression of the NTDR2 in cultured hippocampal neurons. A similar change in frequency has been previously described in neurons transfected with postsynaptic proteins PSD-95 (El-Husseini et al., 2000), shank1 (Sala et al., 2001), and shank3 (Roussignol et al., 2005). This effect was tentatively attributed by these and other authors to an unidentified retrograde signal. However, more recently, an effect on frequency rather than amplitude of mEPSCs has been observed upon knockdown of PSD-95 (Elias et al., 2006), which is well established as a postsynaptic scaffold protein that recruits AMPA receptors and enhances AMPA receptor-mediated EPSCs. We believe that GluR2-NTD provides another example of a postsynaptic manipulation that alters AMPA-mediated synaptic transmission and that has a selective effect on mini frequency, perhaps as a consequence of an increased number of functional synapses. If a retrograde signal is to be invoked, our study suggests N-cadherin as a good candidate, a homophilic adhesion molecule that we found binds directly to the NTD of GluR2.

Previous studies have suggested a connection between AMPA receptors and N-cadherin (Dunah et al., 2005; Jones et al., 2002; Nuriya and Huganir, 2006). In particular, Nuriya et al. and Dunah et al. demonstrated, in brain and in heterologous cells, a biochemical association of N-cadherin and AMPA receptors by coimmunoprecipitation. The important advance in our study is the demonstration of a direct interaction between GluR2 and N-cadherin that occurs extracellularly via the NTD domain. Our results are at odds with Nuriya et al. (Nuriya and Huganir, 2006), who reported that N-cadherin can be coimmunoprecipitated with all AMPA receptor subunits in heterologous cells. We believe the discrepancies can be explained if the association of GluRs and N-cadherin shown in Nuriya's work is indirect, perhaps mediated by other proteins and resulting from more gentle solubilization detergents (Nuriya and Huganir, 2006).

Using an unbiased approach (surface crosslinking followed by immunoprecipitation and mass spectrometric identification of GluR2-interacting proteins), we showed that N-cadherin is a major extracellular binding partner of GluR2 in neurons. Given that N-cadherin is a well-established player in synapse development and spine morphogenesis (Benson and Tanaka, 1998; Fannon and Colman, 1996; Takeichi and Abe, 2005; Tanaka et al., 2000; Togashi et al., 2002), our findings likely explain why overexpression of GluR2 induces bigger and more abundant spines depending on its NTD, why knockdown of GluR2 impairs spine morphogenesis, and why the soluble Fc-NTDR2, but not Fc-NTDR1, reduced spine density when added to culture medium (Passafaro et al., 2003).

Further clarification of the functional significance of GluR2-N-cadherin interaction, however, will require additional confirmation *in vivo*. Ideally, this would entail generation of a knockin mutation of the GluR2-NTD that prevents its interaction with cadherin, while preserving subunit assembly of AMPA receptors.

We propose that GluR2 and N-cadherin interact via extracellular domains at excitatory synapses and that this NTD-dependent complex promotes the growth and maintenance of spines. The interaction appears less stable than that of GluR2 with GluR1 or stargazin, insofar as it requires extracellular crosslinking to maintain integrity during coimmunoprecipitation in neurons. Thus the association between NTD and N-cadherin might occur at low affinity or transiently, which is perhaps not surprising, given their extracellular nature. N-cadherin is also associated with LAR receptor tyrosine phosphatase and cytoplasmic catenins, and LAR can promote the synaptic recruitment of AMPA receptors, N-cadherin, and β -catenin, all of which would promote the growth of dendritic spines (Dunah et al., 2005). Moreover cadherins can also modulate the activity and localization of signal molecules such as cortactin, Arp2/3, formin-1, and the Rho family of GTPases, which also impact spine formation and stability (Takeichi and Abe, 2005).

The synaptic trafficking of AMPA receptors, including GluR2, is highly regulated and important for determining synaptic strength (Malinow and Malenka, 2002). We propose that accumulation of GluR2-containing AMPA receptors at the synapse promotes recruitment of N-cadherin and associated molecules, thereby stabilizing and enlarging the synapse. In this way, GluR2 can be considered as having a "structural" role. GluR2 and N-cadherin, by virtue of their reciprocal interaction, could mutually support each other's accumulation at synaptic sites. This process could be analogous to how shank and homer, two PSD scaffold proteins, cooperate to induce the maturation and enlargement of dendritic spines in primary cultures of hippocampal neurons (Sala et al., 2001).

N-cadherin is present on both sides of the synapse, whereas AMPA receptors are primarily postsynaptic in location. Whether GluR2 binds to N-cadherin primarily in *cis* or in *trans* remains open, but our cell aggregation experiments, Fc-fusion protein binding assays, and bead aggregation data all indicate that the GluR2-N-cadherin interaction can occur in *trans* as well as in *cis*. In any case, since N-cadherin itself binds homophilically across the synaptic cleft, GluR2 can presumably associate with a *trans*-synaptic cadherin protein complex. In this way, a subunit of a glutamate receptor channel whose abundance correlates with synaptic strength can interact with an adhesion complex involved in regulation of synapse morphology. Thus, the GluR2-N-cadherin interaction provides an attractive mechanism that would contribute to the coordinate regulation of synapse function and morphology.

The size of the AMPA receptor complex measured by EM suggests that it can extend ~20 nm extracellularly from the postsynaptic membrane (Nakagawa et al., 2005),

leaving the NTD well positioned to bind to proteins in or spanning the synaptic cleft. How might GluR2-NTD and N-cadherin interact in terms of three-dimensional structure? We modeled the cadherin-binding surface of GluR2-NTD, and the mode of interaction between the cadherin extracellular domain and GluR2-NTD, based on the known 3D structures of cadherin and of proteins homologous to GluR2-NTD. In our GluR2-NTD model (obtained by homology modeling with the mGluR1 extracellular ligand-binding region and generated with the use of Modeler and evaluated by Verify3D), the first 92 amino acids of the NTD that bind to N-cadherin are on the surface of the NTD and therefore accessible for protein interactions (Figure S3). We also used the protein-docking algorithm Bimolecular complex Generation with Global Evaluation and Ranking (BiGGER) integrated in the molecular modeling software Chemera 3.0 (Palma et al., 2000) to predict the mode of extracellular binding between N-cadherin (using the crystallographic structure of C-cadherin ectodomain [Boggon et al., 2002]) and GluR2 (using GluR2-NTD structure obtained by homology modeling). The predicted interaction sites lay on the internal side of EC3 and EC2 of the five tandem cadherin ectodomains (EC1-EC5) (Figure S4). In addition, the predicted interaction sites were separate from the cadherin-cadherin *trans* and *cis* interaction interfaces (which are mediated by EC1) (Boggon et al., 2002). Thus, the modeled site of interaction with GluR2-NTD occurs at an “available” place on the extracellular region of cadherin that does not have any known protein interactions.

In conclusion, we provide evidence of a direct interaction between a subunit of the ionotropic glutamate receptor AMPA and a synaptic adhesion molecule. These findings have interesting implications for coordinate regulation of structure and function of synapses.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

DNA Constructs

HA and Myc epitope tags were inserted three amino acids C-terminal of the signal peptide of GluR subunits. NTDR2-pDisplay and NTDR1-pDisplay chimeras were made by fusing amino acids 1–400 of GluR2 or GluR1 to the pDisplay vector or the transmembrane domain of CD4. The deletion constructs were made by PCR amplification with appropriate oligos. The plasmids used in the bead-binding experiments were pcDNA *myc* GluR2-YFP (tagged at –22, near the C terminus), pcDNA *myc* GluR2-EGFP (N-terminal tag), NTDR1, NTDR2, co-transfected pRCMVaa NR1-Venus and NR2A-Venus (N-terminal tag) (a gift from Jacques Neyton, Ecole Normale Supérieure, Paris), pEGFP N1 N-cadherin-EGFP (C-terminal tag), and pcDNA3 N-cadherin-dsRed (a gift from Mireille Lambert, INSERM U440-UPMC, Paris). The hFc-N-cadherin chimera was used on the beads, as previously described (Lambert et al., 2000).

For plasmid-based RNA inhibition of N-cadherin, the oligonucleotides annealed and inserted into Hpal/Xho1 of the PII 3.7 vector (Rubinson et al., 2003) were 5'-atcgatatatgaacagaa-3' for N-cadherin-siRNA and 5'-gccgatgaaggaaaccatga-3' for scramble siRNA. The specificity and efficacy of this construct in interfering with N-cadherin expression was first tested in heterologously expressed N-cadherin in HEK cells.

Cell Cultures and Transfection

Primary hippocampal neurons were prepared from embryonic days 18–19 rat brains (Brewer et al., 1993) and placed on coverslips coated with poly-D-lysine (30 μ g/ml) and laminin (2 μ g/ml) at a density of 75,000/well for immunocytochemistry, and at 300,000/well for biochemistry experiments. After 13–14 days in vitro, the cultures were transfected using the calcium phosphate method. For the bead-binding experiments, the neurons were transfected with Effectene transfection reagent (QIAGEN) after 4 days in vitro.

Immunostaining and Antibodies

The transfected neurons were fixed for 8 min in 4% paraformaldehyde plus 4% sucrose and immunostained as described (Passafaro et al., 2003). The antibodies/probes were rabbit anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1 μ g/ml), -GluR2/3 (Chemicon, International S.C.), -GluR1C-term (Chemicon International), -N-Cadherin (BD Biosciences PharMingen), -NLG1 (SYSY, Gottingen, Germany), β -catenin (gift from Grazia Pietrini, IN-CNR, Milan), and monoclonal: anti-NMDAR1 (BD Biosciences PharMingen) and anti-GAD (GAD -6; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA); anti-GST monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); Alexa 568 and Alexa 488 secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, Oregon).

In Vivo Crosslinking of Hippocampal Neurons and Coimmunoprecipitation Studies

Hippocampal neurons plated on coverslips coated with poly-D-lysine (30 μ g/ml) and laminin (2 μ g/ml) at a density of 300,000/well were washed once with D-PBS and crosslinked with 2 mM dithiobis (sulfosuccinimidylpropionate) (DTSSP) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) in D-PBS. After 30 min incubation at room temperature, the reaction was quenched in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, for 15 min. The crosslinked neurons were then washed with D-PBS and incubated for 1 hr at 4°C with a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% saponin (BST Buffer), complete EDTA (Roche). Two-dimensional diagonal gel electrophoresis was performed as described (Chan et al., 1998). Coimmunoprecipitation experiments from neurons were performed as described (Dunah et al., 2005). The HEK immunoprecipitation experiments were performed as previously described (Hsueh and Sheng, 1999).

In Vitro Binding Assay and GST Pull-Down

HEK cells transfected or not with N-cadherin were incubated for 2 hr with different concentrations of Fc-NTDR2 or Fc-NTDR1 at RT and then washed, fixed, and incubated for 30 min with Fc antibody conjugated to horseradish peroxidase. The Fc-NTD fusion proteins were prepared as previously described (Passafaro et al., 2003). For pull-down assay, the extracellular regions of GluR2 (aa 1–100) and (aa 1–160) were subcloned into pGEX vector (Clontech).

Fc-N-Cadh-Coated Bead Preparation, Incubation, and Immunocytochemistry

Ten microliter of 4 μ m latex microspheres (sulfated, 8% solids, Ideal Latex Corp) were incubated overnight at room temperature with 10 μ g goat anti-human Fc antibodies (Jackson Immunoresearch), rinsed in borate buffer (0.2 M, pH 8.5) containing 0.3% globulin-free BSA (Sigma), then incubated with 2 μ g chimera hFc-N-cadherin for 3 hr at room temperature, rinsed again, and used within 1 day if kept on ice. We also used beads coated with anti-N-cadherin antibodies (clone Gc4, Sigma), coupled via goat anti-mouse Fc antibodies (Jackson Immunoresearch).

Beads coated with anti-N-cadherin antibodies (clone Gc4, Sigma), coupled via goat anti-mouse Fc antibodies (Jackson Immunoresearch), were mixed with medium + 1% BSA (to avoid unspecific binding) and incubated on neurons for 30–60 min at 37°C (2.7E6 beads in 1 ml). The beads were mixed with medium + 1% BSA (to avoid nonspecific binding) and incubated on neurons for 30 min to 1 hr at 37°C

(beads in 1 ml). We then rinsed the cells three times with warm medium and fixed with PFA 4% sucrose.

Bead Recruitment Analysis

To quantify the recruitment of receptors under the beads, average fluorescence intensity was measured in a ring under the bead (F bead) and on control neurites or lamellipodia (Fctl), both corrected for the background, and the results were used to compute a fluorescence ratio $R = F_{\text{bead}}/F_{\text{ctl}}$. The data obtained from the indicated number (n) of beads were expressed as mean \pm SEM and compared by Student's t test.

Fluorescence Recovery after Photobleaching

The set-up and methods to analyze fluorescence recovery were described previously (Thoumine et al., 2006). Briefly, a single spot Argon laser beam coupled to a fluorescence microscope is used to photobleach selected areas of neurons expressing GFP-tagged receptors and monitor fluorescence recovery. FRAP experiments were performed on GluR2-GFP accumulated at N-cadherin bead contacts, or on GluR2-SEP clusters induced by antibody ligation of cotransfected N-cadherin. Hippocampal rat neurons were transfected at DIV7 and processed 1 week later. Gc4 anti-N-cadherin (1:50) preclustered with a goat anti-mouse Ig secondary antibody (1:100) (Molecular Probes) was added to neurons for 10 min prior to the experiment, in order to immobilize transfected N-cadherin. SEP-GluR2 was a gift from J. Henley (Bristol, UK). L1-GFP was a gift from T. Galli (Paris, France).

Cell Aggregation Assay

HEK cells transfected with the different constructs were trypsinized, counted, and mixed, and the cell mixtures were incubated at 37°C for 90 min under gentle agitation and then plated. The extent of cell/cell aggregation was measured as described (Nguyen and Sudhof, 1997). Random fields were chosen using at 10 \times objective.

FM1-43 Staining

FM1-43 staining was performed by incubating neurons for 1 min in 6 μ M FM1-43 (Molecular Probes) in high potassium buffer followed by two washes in Tyrode solution in the presence of 1 μ M tetrodotoxin (TTX) as described (Hering et al., 2003).

Image Analysis

Labeled transfected neurons were chosen randomly for quantification from six coverslips from six independent experiments for each construct. Fluorescence images and morphometric measurements were made as described (Passafaro et al., 2003).

Electrophysiology

The neurons were continuously perfused with the following external medium (mM): NaCl (140), CaCl₂ (2), KCl (3), HEPES (10), D-glucose (10), tetrodotoxin (0.0003), bicucullin (0.01), pH 7.4 and osmolarity 330 mOsm. Neurons cotransfected with GFP and NTDR1 or NTDR2 were selected on the basis of their fluorescence and recorded at RT using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. The recording pipettes had a resistance of 3–5 MOhms when filled with the following medium (mM) KCl (140), HEPES (10), D-glucose (10), pH 7.2 and osmolarity 300 mOsm. Miniature EPSCs (mEPSCs) were recorded at –65 mV membrane potential through an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments; Union City, CA), filtered at 1 kHz and then digitized at 3 kHz using Axotape (Axon Instruments). Currents were analyzed using the pClamp 9 software (Axon Instruments). All the detected events were re-examined and accepted or rejected on the basis of visual examination. Once more than 100 events had been collected from a neuron, the average frequency and amplitude of these events were measured on the total duration of the sample. Data obtained from the indicated number (n) of cells were expressed as the mean \pm SEM and analyzed using the Student's t test.

Supplemental Data

The Supplemental Data for this article can be found online at <http://www.neuron.org/cgi/content/full/54/3/461/DC1/>.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to Valentina Bonetti for mass spectrometry analysis, Teru Nakagawa for pDisplay constructs, Mireille Lambert for the production of the hFc-N-cadherin chimera, and Romana Tomasoni for technical assistance and comments. The work was supported by Telethon-Italy (M.P.), the Giovanni Armenise-Harvard Foundation Career Development Program (C.S.), AIRC, European Community (LSHM-CT-2004-511995, SYNSCAFF). M.S. is an Investigator of Howard Hughes Medical Institute. The authors declare that they have no competing financial interests.

Received: June 1, 2006

Revised: February 13, 2007

Accepted: April 16, 2007

Published: May 2, 2007

REFERENCES

- Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G.-Q., and Gouaux, E. (1998). Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395, 913–917.
- Ayalon, G., and Stern-Bach, Y. (2001). Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31, 103–113.
- Bamji, S.X. (2005). Cadherins: actin with the cytoskeleton to form synapses. *Neuron* 47, 175–178.
- Beesley, P.W., Mummery, R., and Tibaldi, J. (1995). N-cadherin is a major glycoprotein component of isolated rat forebrain postsynaptic densities. *J. Neurochem.* 64, 2288–2294.
- Benson, D.L., and Tanaka, H. (1998). N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18, 6892–6904.
- Boggon, T.J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B.M., and Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296, 1308–1313.
- Bozdagi, O., Shan, W., Tanaka, H., Benson, D.L., and Huntley, G.W. (2000). Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron* 28, 245–259.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., and Price, P.J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35, 567–576.
- Chan, Y.M., Bonnemant, C.G., Lidov, H.G., and Kunkel, L.M. (1998). Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J. Cell Biol.* 143, 2033–2044.
- Chappuis-Flament, S., Wong, E., Hicks, L.D., Kay, C.M., and Gumbiner, B.M. (2001). Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J. Cell Biol.* 154, 231–243.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7–61.
- Dunah, A.W., Hueske, E., Wyszynski, M., Hoogenraad, C.C., Jaworski, J., Pak, D.T., Simonetta, A., Liu, G., and Sheng, M. (2005). LAR receptor protein tyrosine phosphatases in the development and maintenance of excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* 8, 458–467.
- El-Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290, 1364–1368.
- Elias, G.M., Funke, L., Stein, V., Grant, S.G., Brecht, D.S., and Nicoll, R.A. (2006). Synapse-specific and developmentally regulated

- targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins. *Neuron* 52, 307–320.
- Elste, A.M., and Benson, D.L. (2006). Structural basis for developmentally regulated changes in cadherin function at synapses. *J. Comp. Neurol.* 495, 324–335.
- Fannon, A.M., and Colman, D.R. (1996). A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron* 17, 423–434.
- Fiala, J.C., Allwardt, B., and Harris, K.M. (2002). Dendritic spines do not split during hippocampal LTP or maturation. *Nat. Neurosci.* 5, 297–298.
- Gumbiner, B.M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 622–634.
- Harris, K. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 343–348.
- Harris, K., and Kater, S. (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 341–371.
- Hering, H., and Sheng, M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 880–888.
- 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.
- Hsueh, Y.-P., and Sheng, M. (1999). Requirement of N-terminal cysteines of PSD-95 for PSD-95 multimerization and ternary complex formation, but not for binding to potassium channel Kv1.4. *J. Biol. Chem.* 274, 532–536.
- Jones, S.B., Lanford, G.W., Chen, Y.H., Moribito, M., Kim, K., and Lu, Q. (2002). Glutamate-induced delta-catenin redistribution and dissociation from postsynaptic receptor complexes. *Neuroscience* 115, 1009–1021.
- Kopeck, C.D., Li, B., Wei, W., Boehm, J., and Malinow, R. (2006). Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J. Neurosci.* 26, 2000–2009.
- Lambert, M., Padilla, F., and Mege, R.M. (2000). Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both outside-in and inside-out signals. *J. Cell Sci.* 113, 2207–2219.
- Maddon, P.J., Littman, D.R., Godfrey, M., Maddon, D.E., Chess, L., and Axel, R. (1985). The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* 42, 93–104.
- Malinow, R., and Malenka, R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126.
- Masuko, T., Kashiwagi, K., Kuno, T., Nguyen, N.D., Pahk, A.J., Fukuchi, J., Igarashi, K., and Williams, K. (1999). A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol. Pharmacol.* 55, 957–969.
- Murase, S., Mosser, E., and Schuman, E.M. (2002). Depolarization drives beta-catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron* 35, 91–105.
- Nakagawa, T., Cheng, Y., Ramm, E., Sheng, M., and Walz, T. (2005). Structure and different conformational states of native AMPA receptor complexes. *Nature* 433, 545–549.
- Nakai, Y., and Kamiguchi, H. (2002). Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate-dependent manner. *J. Cell Biol.* 159, 1097–1108.
- Nguyen, T., and Sudhof, T.C. (1997). Binding properties of neuroligin 1 and neuroligin 1beta reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *J. Biol. Chem.* 272, 26032–26039.
- Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., and Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 313–353.
- Nose, A., Tsuji, K., and Takeichi, M. (1990). Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61, 147–155.
- Nuriya, M., and Huganir, R.L. (2006). Regulation of AMPA receptor trafficking by N-cadherin. *J. Neurochem.* 97, 652–661.
- O'Hara, P.J., Sheppard, P.O., Thogersen, H., Venezia, D., Haldeman, B.A., McGrane, V., Houamed, K.M., Thomsen, C., Gilbert, T.L., and Mulvihill, E.R. (1993). The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11, 41–52.
- Okamura, K., Tanaka, H., Yagita, Y., Saeki, Y., Taguchi, A., Hiraoka, Y., Zeng, L.H., Colman, D.R., and Miki, N. (2004). Cadherin activity is required for activity-induced spine remodeling. *J. Cell Biol.* 167, 961–972.
- Palma, P.N., Krippahl, L., Wampler, J.E., and Moura, J.J. (2000). BIG-GER: a new (soft) docking algorithm for predicting protein interactions. *Proteins* 39, 372–384.
- Paoletti, P., Perin-Dureau, F., Fayyazuddin, A., Le Goff, A., Callebaut, I., and Neyton, J. (2000). Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* 28, 911–925.
- Passafaro, M., Nakagawa, T., Sala, C., and Sheng, M. (2003). Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature* 424, 677–681.
- Pertz, O., Bozic, D., Koch, A.W., Fauser, C., Brancaccio, A., and Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J.* 18, 1738–1747.
- 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.
- Rubinson, D.A., Dillon, C.P., Kwiatkowski, A.V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D.L., Ihrig, M.M., McManus, M.T., Gertler, F.B., et al. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.* 33, 401–406.
- Sala, C., Piech, 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.
- Salinas, P.C., and Price, S.R. (2005). Cadherins and catenins in synapse development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 73–80.
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grubel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R., and Hendrickson, W.A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374, 327–337.
- Stern-Bach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P.O., O'Hara, P.J., and Heinemann, S.F. (1994). Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 13, 1345–1357.
- Takeichi, M., and Abe, K. (2005). Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends Cell Biol.* 15, 216–221.
- Tamura, K., Shan, W.S., Hendrickson, W.A., Colman, D.R., and Shapiro, L. (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* 20, 1153–1163.
- Tanaka, H., Shan, W., Phillips, G.R., Arndt, K., Bozdagi, O., Shapiro, L., Huntley, G.W., Benson, D.L., and Colman, D.R. (2000). Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron* 25, 93–107.
- Thoumine, O., Lambert, M., Mege, R.M., and Choquet, D. (2006). Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Mol. Biol. Cell* 17, 862–875.

Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., and Takeichi, M. (2002). Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 35, 77–89.

Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., and Takeichi, M. (1996). The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol.* 135, 767–779.

Wenthold, R.J., Petralia, R.S., Blahos, J.I., and Niedzielski, A.S. (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J. Neurosci.* 16, 1982–1989.

Wollmuth, L.P., and Sobolevsky, A.I. (2004). Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci.* 27, 321–328.

Yap, A.S., Brieher, W.M., Pruschy, M., and Gumbiner, B.M. (1997). Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr. Biol.* 7, 308–315.

Yu, X., and Malenka, R.C. (2003). Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat. Neurosci.* 6, 1169–1177.

Neuron, Volume 54

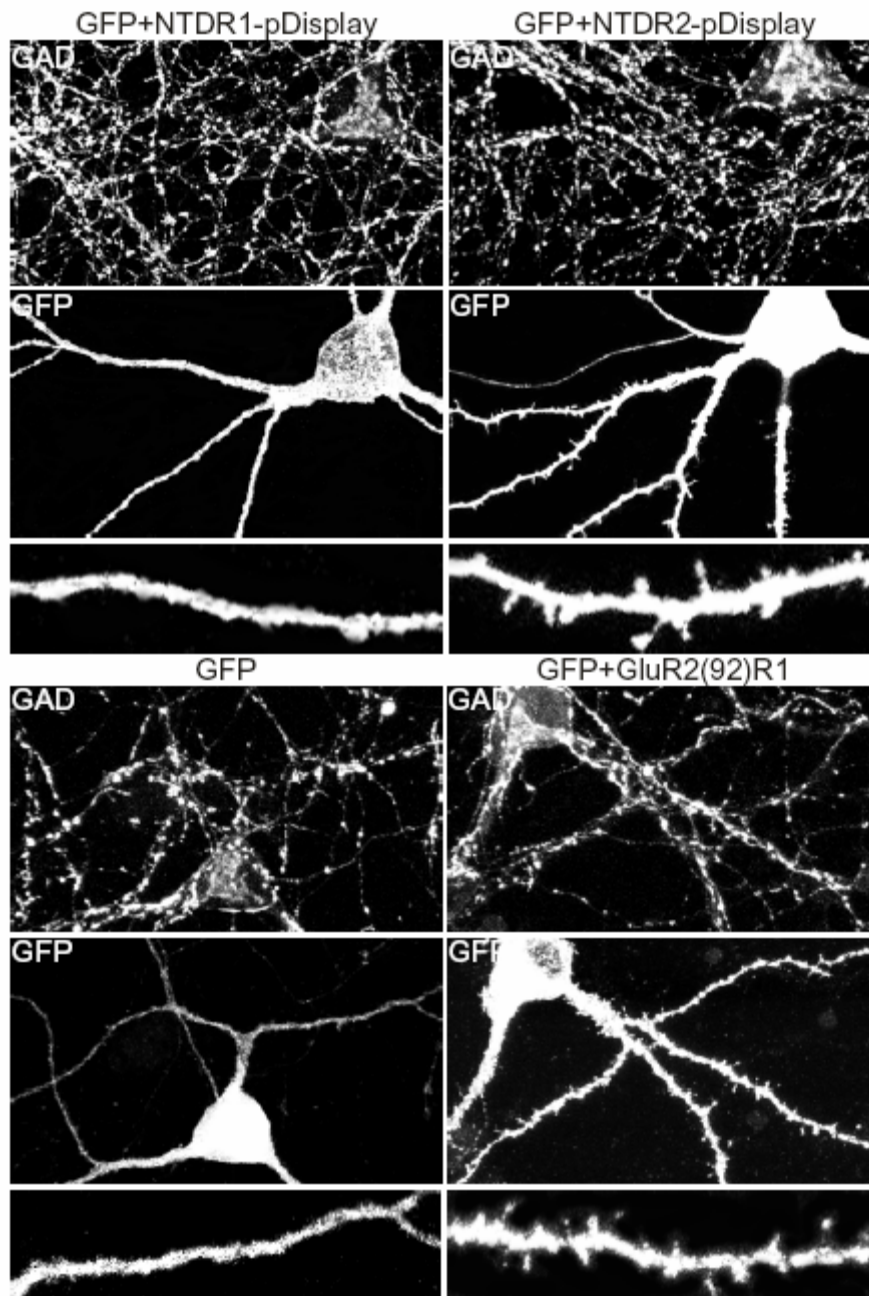
Supplemental Data

Extracellular Interactions between GluR2

and N-Cadherin in Spine Regulation

Laura Saglietti, Caroline Dequidt, Kinga Kamieniarz, Marie-Claude Rousset,
Pamela Valnegri, Olivier Thoumine, Francesca Beretta, Laurent Fagni, Daniel Choquet,
Carlo Sala, Morgan Sheng, and Maria Passafaro

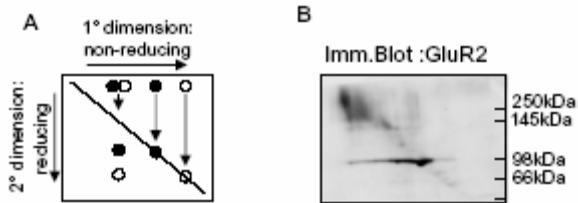
Supplementary Figures



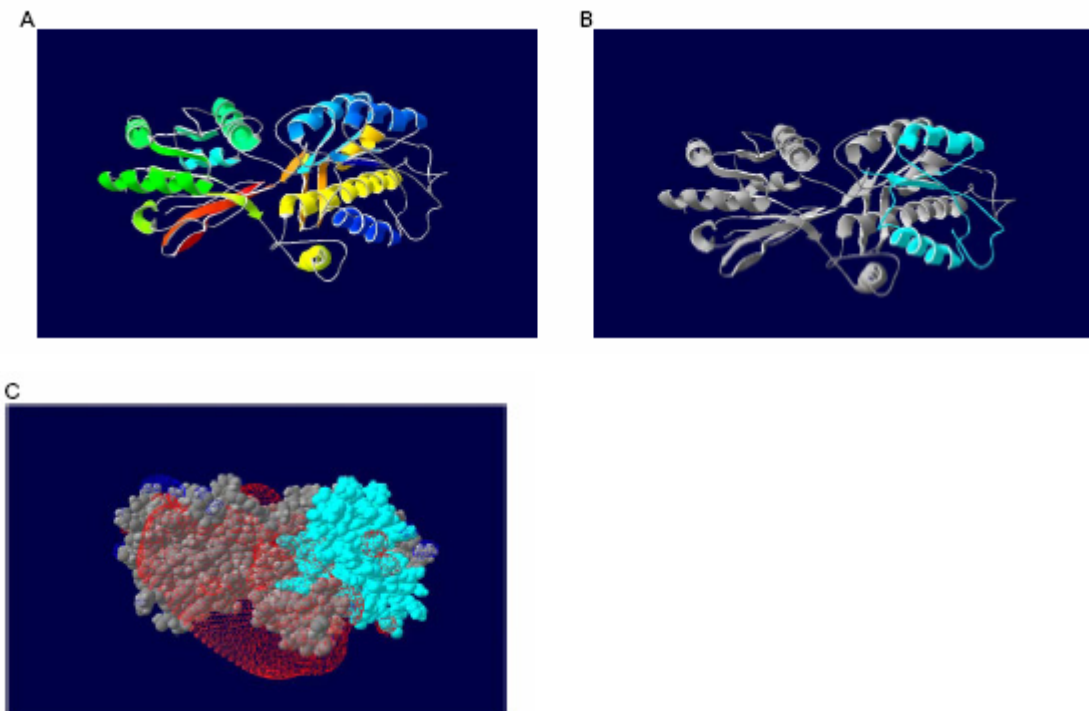
Supplemental Figure 1. A region of 92 residues in GluR2 NTD induces dendritic spines in GABAergic interneurons.

Interneurons (defined by typical dendritic morphology and GAD66 immunoreactivity in cell soma) have no dendritic spines when transfected with EGFP alone or with EGFP

plus NTDR1-pDisplay (left), but show protrusions with a clear head and neck (mushroom-like spines) when transfected with NTDR2-pDisplay or with GluR2(92)R1. The paired panels (right) show images of EGFP and GAD6 staining in the same neuron, as indicated in each panel; the bottom panels show higher magnification of dendrite (EGFP image).



Supplemental Figure 2. (A) Diagram of the principle underlying 2-D diagonal gels. Single circles: uncross-linked proteins, two circles joined by a line: cross-linked product. **(B)** In western blot analysis of cross-linked neurons showed that one band of about 100kDa below the diagonal line was recognized by anti GluR2 antibodies.



Supplemental Figure 3.

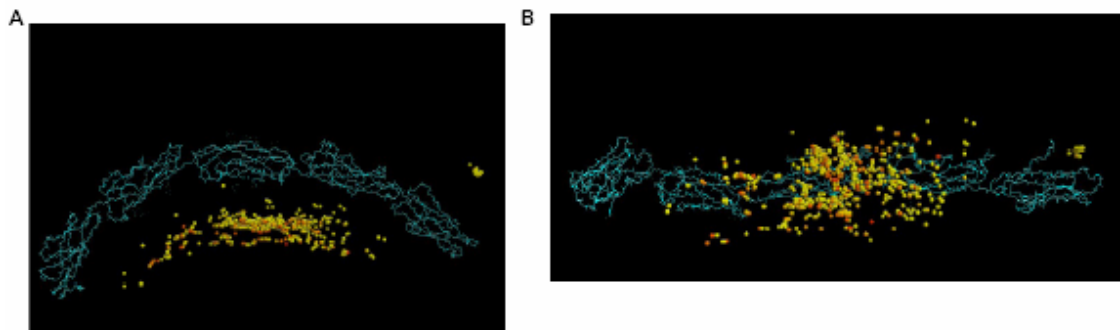
(A) GluR2-NTD structure model colored by secondary structure succession: N terminal amino acids in dark blue – (light blue – green – yellow – orange) – C-terminal amino acids in red

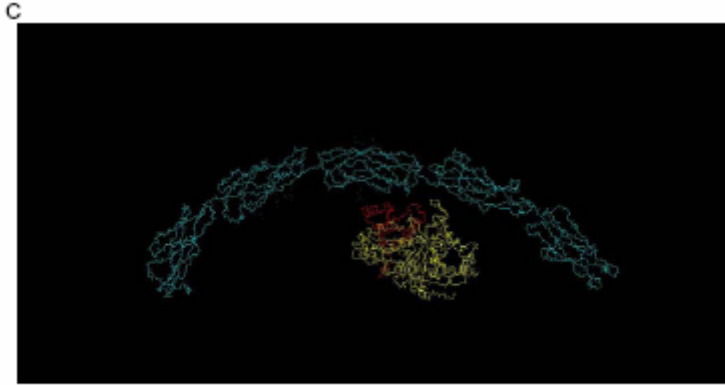
(B-C) N-cadherin interaction region (residues 92) (light blue) in the model of GluR2-NTD

(B) ribbon diagram;

(C) model with Van der Waals forces and electrostatic potential- red negative potential, dark blue positive potential.

The structural model was generated with Modeller ((Sali and Blundell, 1993), <http://salilab.org/modeller/>) and evaluated by Verify3D (Eisenberg et al., 1997). The amino acid sequence of GluR2 NTD was submitted for analysis to Genesilico ((Kurowski and Bujnicki, 2003), <http://genesilico.pl/meta>) and Bioinfobank ((Ginalski et al., 2003), <http://bioinfo.pl/meta>) Metaservers. The structure of the metabotropic glutamate receptor subtype 1 extracellular ligand binding region (PDB ID 1EWK) was chosen as primary template for modeling as it had the best score in PBD-Blast as well as top scores in several threading methods. The alignment obtained from mGenThreader (McGuffin and Jones, 2003) was imported into Swiss-PdbViewer ((Guex and Peitsch, 1997), <http://www.expasy.org/spdbv/>) and manually optimized, taking into consideration secondary structure predictions from the metaservers. As additional templates the structures of atrial natriuretic peptide clearance receptor (PDB ID 1JDP) and atrial natriuretic peptide receptor A (PDB ID 1DP4) were used.





Supplemental Figure 4.

Prediction of GluR2-NTD - N-Cad-Ecto interaction with the use of BiGGER (Bimolecular complex Generation with Global Evaluation and Ranking) integrated in the molecular modeling software Chemera 3.0. Briefly, we performed soft docking runs with both structures used as targets, obtaining similar results. The docking of GluR2-NTD was constrained to the residues 14-92 found important for interaction with N-cadherin, setting the required field in subsequent runs to 7-20 amino acids and maintaining the default value of distance of 7 angstrom. In all cases we obtained a similar cluster of GluR2-NTD positions at the internal side of the curved C-cadherin structure. The C-cadherin ectodomain has five tandem domains named EC1-EC5, and the GluR2NTD cluster was centered at the internal side of EC3 and EC2.

In blue: C-cadherin ectodomain structure, yellow-orange dots: representation of geometrical center of GluR2-NTD

(A) view of the C-cadherin ectodomain with 500 predicted positions of GluR2-NTD; cadherin domains from the left to the right: EC5, EC4, EC3, EC2, EC1

(B) view 90 degrees away from A

(C) one of the possible interaction modes; GluR2-NTD in yellow, GluR2 residues 14-92 in red.

Supplemental Table 1. Results of mass spectrometry of bands from 2D diagonal gel of Figure 5A.

Molecular weight of isolated bands	Identified protein
~50	Tubulin beta-5 chain
~50	Tubulin alpha-1 chain
~62	Dihydropyrimidinase-related protein
~85	Aconitate hydratase mitochondrial precursor
~92	Elongation factor (EF-2)
~50	Rab GDP dissociation inhibitor beta (Rab GDI beta)
~130	N-cadherin
~50	TARP γ -2
~84	HSP 90-beta
~35	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
~50	TARP γ -8

Conclusion générale

Il existe un point commun important entre les deux études présentées dans cette thèse : il réside dans les techniques utilisées. Nous avons en particulier réalisé des contacts adhésifs artificiels, dont l'intérêt pour la précision de la stimulation adhésive a été évoqué, et utilisé des techniques d'imagerie et d'expérimentation de cellules vivantes en microscopie de fluorescence. Ces techniques issues de la biophysique apportent une dimension dynamique et quantitative à l'étude des systèmes adhésifs neuronaux. Combinées à des mesures à l'échelle moléculaire et à des études en physiologie, et enrichies des nouvelles méthodes en développement (FCS, TIRF/FSM), l'approche proposée pourrait contribuer à démêler l'écheveau des systèmes adhésifs intervenant dans le développement du système nerveux.

Notre étude a ainsi permis de mieux comprendre que la spécificité de la molécule L1 par rapport à d'autres membres de sa famille réside en partie dans l'important recyclage qu'elle subit au cône de croissance, et dans le rôle de ce trafic intracellulaire dans la dynamique des contacts. En ce qui concerne la N-cadhérine, j'ai précisé en introduction que des études précédant celle-ci ont apporté des données complexes et parfois contradictoires sur le rôle précis de cette protéine dans le développement de la synapse. On ne peut pas dire si l'interaction observée entre N-cadhérine et GluR2 joue un rôle synaptogène ou simplement dans la plasticité synaptique, dans l'hippocampe seulement ou dans tout le SNC.

Plus généralement, beaucoup de travail reste à faire pour préciser localement et temporellement l'implication des différents systèmes adhésifs dans le développement neuronal. Cette tâche est d'autant plus ardue qu'aussi vrai qu'à un gène ne correspond pas une fonction, à une molécule d'adhésion ne correspond pas un rôle précis mais une multiplicité de fonctions, modulées en partie par l'environnement local de la molécule. Cette thèse est divisée en deux parties, l'une étudiant L1 dans le contexte du développement précoce des neurones, et l'autre étudiant la N-cadhérine dans le contexte du développement synaptique. Cependant, comme mentionné dans l'introduction, la N-cadhérine intervient très tôt dans la différenciation neuronale, et L1 semble engagé dans la maturation synaptique GABAergique. Au delà de la simple illustration du "principe d'économie" de la biologie, cette multiplicité des rôles des protéines étudiées nous amène, une fois encore, à rester humble devant le vivant.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe K, Chisaka O, Van Roy F, Takeichi M (2004) Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nat Neurosci* 7:357-363.
- Aberle H, Schwartz H, Kemler R (1996) Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 61:514-523.
- Ahmad-Annuar A, Ciani L, Simeonidis I, Herreros J, Fredj NB, Rosso SB, Hall A, Brickley S, Salinas PC (2006) Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J Cell Biol* 174:127-139.
- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3:445-451.
- Ahnert-Hilger G, Kutay U, Chahoud I, Rapoport T, Wiedenmann B (1996) Synaptobrevin is essential for secretion but not for the development of synaptic processes. *Eur J Cell Biol* 70:1-11.
- Akins MR, Biederer T (2006) Cell-cell interactions in synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 17:17.
- Alberts P, Galli T (2003) The cell outgrowth secretory endosome (COSE): a specialized compartment involved in neuronal morphogenesis. *Biol Cell* 95:419-424.
- Alberts P, Rudge R, Irinopoulou T, Danglot L, Gauthier-Rouviere C, Galli T (2006) Cdc42 and actin control polarized expression of TI-VAMP vesicles to neuronal growth cones and their fusion with the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 17:1194-1203.
- Alberts P, Rudge R, Hinners I, Muzerelle A, Martinez-Arca S, Irinopoulou T, Marthiens V, Tooze S, Rathjen F, Gaspar P, Galli T (2003) Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion. *Mol Biol Cell* 14:4207-4220. Epub 2003 Jun 4227.
- Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ (2004) Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell* 119:257-272.
- Anton ES, Kreidberg JA, Rakic P (1999) Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* 22:277-289.
- Archer FR, Doherty P, Collins D, Bolsover SR (1999) CAMs and FGF cause a local submembrane calcium signal promoting axon outgrowth without a rise in bulk calcium concentration. *Eur J Neurosci* 11:3565-3573.
- Bailey CH, Chen M, Keller F, Kandel ER (1992) Serotonin-mediated endocytosis of apCAM: an early step of learning-related synaptic growth in *Aplysia*. *Science* 256:645-649.
- Bamji SX, Shimazu K, Kimes N, Huelsken J, Birchmeier W, Lu B, Reichardt LF (2003) Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. *Neuron* 40:719-731.
- Banker G, Goslin K (1988) Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336:185-186.
- Barami K, Kirschenbaum B, Lemmon V, Goldman SA (1994) N-cadherin and Ng-CAM/8D9 are involved serially in the migration of newly generated neurons into the adult songbird brain. *Neuron* 13:567-582.
- Bartoe JL, McKenna WL, Quan TK, Stafford BK, Moore JA, Xia J, Takamiya K, Haganir RL, Hinck L (2006) Protein interacting with C-kinase 1/protein kinase Calpha-mediated endocytosis converts netrin-1-mediated repulsion to attraction. *J Neurosci* 26:3192-3205.
- Bartsch U, Kirchhoff F, Schachner M (1989) Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM, and MAG in the developing and adult optic nerve of mice. *J Comp Neurol* 284:451-462.
- Beaudoin GM, 3rd (2006) Con-nectin axons and dendrites. *J Cell Biol* 174:7-9.
- Bekirov IH, Needleman LA, Zhang W, Benson DL (2002) Identification and localization of multiple classic cadherins in developing rat limbic system. *Neuroscience* 115:213-227.
- Benson DL, Cohen PA (1996) Activity-independent segregation of excitatory and inhibitory synaptic terminals in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 16:6424-6432.
- Benson DL, Tanaka H (1998) N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:6892-6904.
- Benson DL, Colman DR, Huntley GW (2001) Molecules, maps and synapse specificity. *Nat Rev Neurosci*

- Beumer K, Matthies HJ, Bradshaw A, Broadie K (2002) Integrins regulate DLG/FAS2 via a CaM kinase II-dependent pathway to mediate synapse elaboration and stabilization during postembryonic development. *Development* 129:3381-3391.
- Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Sudhof TC (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297:1525-1531.
- Birks RI, Mackey MC, Weldon PR (1972) Organelle formation from pinocytotic elements in neurites of cultured sympathetic ganglia. *J Neurocytol* 1:311-340.
- Bixby JL, Zhang R (1990) Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol* 110:1253-1260.
- Bliss T, Errington M, Fransen E, Godfraind JM, Kauer JA, Kooy RF, Maness PF, Furley AJ (2000) Long-term potentiation in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol* 10:1607-1610.
- Bockers TM, Segger-Junius M, Iglauer P, Bockmann J, Gundelfinger ED, Kreutz MR, Richter D, Kindler S, Kreienkamp HJ (2004) Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol Cell Neurosci* 26:182-190.
- Boiko T, Vakulenko M, Ewers H, Yap CC, Norden C, Winckler B (2007) Ankyrin-dependent and -independent mechanisms orchestrate axonal compartmentalization of I1 family members neurofascin and I1/neuron-glia cell adhesion molecule. *J Neurosci* 27:590-603.
- Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* 417:649-653.
- Bose CM, Qiu D, Bergamaschi A, Gravante B, Bossi M, Villa A, Rupp F, Malgaroli A (2000) Agrin controls synaptic differentiation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:9086-9095.
- Bozdagi O, Shan W, Tanaka H, Benson DL, Huntley GW (2000) Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron* 28:245-259.
- Bozdagi O, Valcin M, Poskanzer K, Tanaka H, Benson DL (2004) Temporally distinct demands for classic cadherins in synapse formation and maturation. *Mol Cell Neurosci* 27:509-521.
- Braun V, Fraissier V, Raposo G, Hurbain I, Sibarita JB, Chavrier P, Galli T, Niedergang F (2004) TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages. *Embo J* 23:4166-4176.
- Bray D (1979) Mechanical tension produced by nerve cells in tissue culture. *J Cell Sci* 37:391-410.
- Bray D (1984) Axonal growth in response to experimentally applied mechanical tension. *Dev Biol* 102:379-389.
- Bray D, Chapman K (1985) Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. *J Neurosci* 5:3204-3213.
- Bray D, Hollenbeck PJ (1988) Growth cone motility and guidance. *Annu Rev Cell Biol* 4:43-61.
- Bredt DS, Nicoll RA (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40:361-379.
- Bresler T, Ramati Y, Zamorano PL, Zhai R, Garner CC, Ziv NE (2001) The dynamics of SAP90/PSD-95 recruitment to new synaptic junctions. *Mol Cell Neurosci* 18:149-167.
- Bresler T, Shapira M, Boeckers T, Dresbach T, Futter M, Garner CC, Rosenblum K, Gundelfinger ED, Ziv NE (2004) Postsynaptic density assembly is fundamentally different from presynaptic active zone assembly. *J Neurosci* 24:1507-1520.
- Brown J, Bridgman PC (2003) Role of myosin II in axon outgrowth. *J Histochem Cytochem* 51:421-428.
- Brummendorf T, Rathjen FG (1994) Cell adhesion molecules. 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 1:951-1058.
- Brummendorf T, Rathjen FG (1995) Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 2:963-1108.
- Brummendorf T, Kenwick S, Rathjen FG (1998) Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol* 8:87-97.
- Brunet I, Weinl C, Piper M, Trembleau A, Volovitch M, Harris W, Prochiantz A, Holt C (2005) The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438:94-98.
- Bruses JL (2000) Cadherin-mediated adhesion at the interneuronal synapse. *Curr Opin Cell Biol* 12:593-597.
- Bruses JL, Chauvet N, Rubio ME, Rutishauser U (2002) Polysialic acid and the formation of oculomotor

- synapses on chick ciliary neurons. *J Comp Neurol* 446:244-256.
- Buck CA, Shea E, Duggan K, Horwitz AF (1986) Integrin (the CSAT antigen): functionality requires oligomeric integrity. *J Cell Biol* 103:2421-2428.
- Buckley CD, Rainger GE, Bradfield PF, Nash GB, Simmons DL (1998) Cell adhesion: more than just glue (review). *Mol Membr Biol* 15:167-176.
- Bunge MB (1977) Initial endocytosis of peroxidase or ferritin by growth cones of cultured nerve cells. *J Neurocytol* 6:407-439.
- Burden-Gulley SM, Lemmon V (1996) L1, N-cadherin, and laminin induce distinct distribution patterns of cytoskeletal elements in growth cones. *Cell Motil Cytoskeleton* 35:1-23.
- Burden-Gulley SM, Payne HR, Lemmon V (1995) Growth cones are actively influenced by substrate-bound adhesion molecules. *J Neurosci* 15:4370-4381.
- Burry RW (1980) Formation of apparent presynaptic elements in response to poly-basic compounds. *Brain Res* 184:85-98.
- Cambon K, Hansen SM, Venero C, Herrero AI, Skibo G, Berezin V, Bock E, Sandi C (2004) A synthetic neural cell adhesion molecule mimetic peptide promotes synaptogenesis, enhances presynaptic function, and facilitates memory consolidation. *J Neurosci* 24:4197-4204.
- Campbell DS, Holt CE (2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32:1013-1026.
- Cantalops I, Cline HT (2000) Synapse formation: if it looks like a duck and quacks like a duck. *Curr Biol* 10:R620-623.
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27:237-249.
- Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB (1994) Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 372:190-193.
- Chang MC, Wisco D, Ewers H, Norden C, Winckler B (2006) Inhibition of sphingolipid synthesis affects kinetics but not fidelity of L1/NgCAM transport along direct but not transcytotic axonal pathways. *Mol Cell Neurosci* 31:525-538.
- Chavis P, Westbrook G (2001) Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411:317-321.
- Chen BE, Kondo M, Garnier A, Watson FL, Puettmann-Holgado R, Lamar DR, Schmucker D (2006) The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell* 125:607-620.
- Cheng L, Lemmon V (2004) Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect neurite outgrowth and branching on an L1 substrate. *Mol Cell Neurosci* 27:522-530.
- Cheng L, Itoh K, Lemmon V (2005) L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *J Neurosci* 25:395-403.
- Cheng TP, Reese TS (1987) Recycling of plasmalemma in chick tectal growth cones. *J Neurosci* 7:1752-1759.
- Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307:1324-1328.
- Chih B, Gollan L, Scheiffele P (2006) Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron* 51:171-178.
- Chilton JK (2006) Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 292:13-24.
- Ciani L, Patel A, Allen ND, French-Constant C (2003) Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol* 23:3575-3582.
- Coco S, Raposo G, Martinez S, Fontaine JJ, Takamori S, Zahraoui A, Jahn R, Matteoli M, Louvard D, Galli T (1999) Subcellular localization of tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein (VAMP)/VAMP7 in neuronal cells: evidence for a novel membrane compartment. *J Neurosci* 19:9803-9812.
- Cooper MW, Smith SJ (1992) A real-time analysis of growth cone-target cell interactions during the

- formation of stable contacts between hippocampal neurons in culture. *J Neurobiol* 23:814-828.
- Coussen F, Normand E, Marchal C, Costet P, Choquet D, Lambert M, Mege RM, Mulle C (2002) Recruitment of the kainate receptor subunit glutamate receptor 6 by cadherin/catenin complexes. *J Neurosci* 22:6426-6436.
- Craig AM, Banker G (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17:267-310.
- Craig AM, Wyborski RJ, Banker G (1995) Preferential addition of newly synthesized membrane protein at axonal growth cones. *Nature* 375:592-594.
- Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A (1997) NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 8:323-335.
- Crossin KL, Krushel LA (2000) Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 218:260-279.
- Dailey ME, Bridgman PC (1991) Structure and organization of membrane organelles along distal microtubule segments in growth cones. *J Neurosci Res* 30:242-258.
- Dailey ME, Bridgman PC (1993) Vacuole dynamics in growth cones: correlated EM and video observations. *J Neurosci* 13:3375-3393.
- Dalva MB, McClelland AC, Kayser MS (2007) Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci* 8:206-220.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103:945-956.
- Davis GW, Schuster CM, Goodman CS (1996) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron* 17:669-679.
- Davis GW, Schuster CM, Goodman CS (1997) Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: target-derived Fasciclin II regulates the pattern of synapse formation. *Neuron* 19:561-573.
- De Angelis E, MacFarlane J, Du JS, Yeo G, Hicks R, Rathjen FG, Kenwrick S, Brummendorf T (1999) Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *Embo J* 18:4744-4753.
- de la Rosa EJ, Kayyem JF, Roman JM, Stierhof YD, Dreyer WJ, Schwarz U (1990) Topologically restricted appearance in the developing chick retinotectal system of Bravo, a neural surface protein: experimental modulation by environmental cues. *J Cell Biol* 111:3087-3096.
- Dean C, Scholl FG, Choih J, DeMaria S, Berger J, Isacoff E, Scheiffele P (2003) Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 6:708-716.
- Dell'Acqua ML, Smith KE, Gorski JA, Horne EA, Gibson ES, Gomez LL (2006) Regulation of neuronal PKA signaling through AKAP targeting dynamics. *Eur J Cell Biol* 85:627-633.
- Demyanenko GP, Maness PF (2003) The L1 cell adhesion molecule is essential for topographic mapping of retinal axons. *J Neurosci* 23:530-538.
- Deng F, Price MG, Davis CF, Mori M, Burgess DL (2006) Stargazin and other transmembrane AMPA receptor regulating proteins interact with synaptic scaffolding protein MAGI-2 in brain. *J Neurosci* 26:7875-7884.
- Dennerll TJ, Lamoureux P, Buxbaum RE, Heidemann SR (1989) The cytomechanics of axonal elongation and retraction. *J Cell Biol* 109:3073-3083.
- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.
- Dickson BJ (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298:1959-1964.
- Dickson TC, Mintz CD, Benson DL, Salton SR (2002) Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J Cell Biol* 157:1105-1112. Epub 2002 Jun 1117.
- Diefenbach TJ, Guthrie PB, Stier H, Billups B, Kater SB (1999) Membrane recycling in the neuronal growth cone revealed by FM1-43 labeling. *J Neurosci* 19:9436-9444.
- Dityatev A, Dityateva G, Sytnyk V, Delling M, Toni N, Nikonenko I, Muller D, Schachner M (2004) Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *J Neurosci* 24:9372-9382.
- Doherty P, Walsh FS (1991) The contrasting roles of N-CAM and N-cadherin as neurite outgrowth-promoting molecules. *J Cell Sci Suppl* 15:13-21.
- Doherty P, Williams G, Williams EJ (2000) CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of

- calcium and the MAPK cascade. *Mol Cell Neurosci* 16:283-295.
- Dong H, O'Brien RJ, Fung ET, Lanahan AA, Worley PF, Huganir RL (1997) GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature* 386:279-284.
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI (2005) Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123:903-915.
- du Roure O, Buguin A, Feracci H, Silberzan P (2006) Homophilic interactions between cadherin fragments at the single molecule level: an AFM study. *Langmuir* 22:4680-4684.
- Dunaevsky A, Mason CA (2003) Spine motility: a means towards an end? *Trends Neurosci* 26:155-160.
- Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R (1999) Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13438-13443.
- Dunah AW, Hueske E, Wyszynski M, Hoogenraad CC, Jaworski J, Pak DT, Simonetta A, Liu G, Sheng M (2005) LAR receptor protein tyrosine phosphatases in the development and maintenance of excitatory synapses. *Nat Neurosci* 8:458-467. Epub 2005 Mar 2006.
- Egelman DM, Montague PR (1999) Calcium dynamics in the extracellular space of mammalian neural tissue. *Biophys J* 76:1856-1867.
- Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399:66-70.
- Esumi S, Kakazu N, Taguchi Y, Hirayama T, Sasaki A, Hirabayashi T, Koide T, Kitsukawa T, Hamada S, Yagi T (2005) Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the protocadherin-alpha gene cluster in single neurons. *Nat Genet* 37:171-176.
- Fabre S, Reymond N, Cocchi F, Menotti L, Dubreuil P, Campadelli-Fiume G, Lopez M (2002) Prominent role of the Ig-like V domain in trans-interactions of nectins. Nectin3 and nectin 4 bind to the predicted C-C'-C''-D beta-strands of the nectin1 V domain. *J Biol Chem* 277:27006-27013.
- Falk J, Thoumine O, Dequidt C, Choquet D, Faivre-Sarrailh C (2004) NrCAM coupling to the cytoskeleton depends on multiple protein domains and partitioning into lipid rafts. *Mol Biol Cell* 15:4695-4709.
- Fannon AM, Colman DR (1996) A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron* 17:423-434.
- Fass JN, Odde DJ (2003) Tensile force-dependent neurite elicitation via anti-beta1 integrin antibody-coated magnetic beads. *Biophys J* 85:623-636.
- Fawcett J, Harris AL (1992) Cell adhesion molecules and cancer. *Curr Opin Oncol* 4:142-148.
- Feldman DE, Knudsen EI (1998) Experience-dependent plasticity and the maturation of glutamatergic synapses. *Neuron* 20:1067-1071.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18:8900-8911.
- Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, Matus A (2000) Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:887-894.
- Flanagan JG, Vanderhaeghen P (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21:309-345.
- Fletcher TL, De Camilli P, Banker G (1994) Synaptogenesis in hippocampal cultures: evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neuronal development. *J Neurosci* 14:6695-6706.
- Fox MA, Umemori H (2006) Seeking long-term relationship: axon and target communicate to organize synaptic differentiation. *J Neurochem* 97:1215-1231.
- Frank M, Ebert M, Shan W, Phillips GR, Arndt K, Colman DR, Kemler R (2005) Differential expression of individual gamma-protocadherins during mouse brain development. *Mol Cell Neurosci* 29:603-616.
- Fransen E, Van Camp G, Vits L, Willems PJ (1997) L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Hum Mol Genet* 6:1625-1632.
- Fransen E, D'Hooge R, Van Camp G, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Koekkoek SK, De Zeeuw CI, De Deyn PP, Van der Linden A, Lemmon V, Kooy RF, Willems PJ (1998) L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum Mol Genet* 7:999-1009.
- Freigang J, Proba K, Leder L, Diederichs K, Sonderegger P, Welte W (2000) The crystal structure of the ligand binding module of axonin-1/TAG-1 suggests a zipper mechanism for neural cell adhesion. *Cell* 101:425-433.

- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* 27:57-69.
- Futerman AH, Banker GA (1996) The economics of neurite outgrowth--the addition of new membrane to growing axons. *Trends Neurosci* 19:144-149.
- Galli T, Zahraoui A, Vaidyanathan VV, Raposo G, Tian JM, Karin M, Niemann H, Louvard D (1998) A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 9:1437-1448.
- Gallo G (2006) RhoA-kinase coordinates F-actin organization and myosin II activity during semaphorin-3A-induced axon retraction. *J Cell Sci* 119:3413-3423.
- Gallo G, Letourneau PC (2004) Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol* 58:92-102.
- Gallusser A, Kirchhausen T (1993) The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *Embo J* 12:5237-5244.
- Gao FB, Kohwi M, Brenman JE, Jan LY, Jan YN (2000) Control of dendritic field formation in *Drosophila*: the roles of flamingo and competition between homologous neurons. *Neuron* 28:91-101.
- Garner CC, Nash J, Hagan RL (2000) PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol* 10:274-280.
- Garner CC, Zhai RG, Gundelfinger ED, Ziv NE (2002) Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 25:243-251.
- Garver TD, Ren Q, Tuvia S, Bennett V (1997) Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol* 137:703-714.
- Gatlin JC, Estrada-Bernal A, Sanford SD, Pfenninger KH (2006) Myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate phosphorylation regulates growth cone adhesion and pathfinding. *Mol Biol Cell* 17:5115-5130.
- Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:793-805.
- Gerrow K, El-Husseini A (2006) Cell adhesion molecules at the synapse. *Front Biosci* 11:2400-2419.
- Gil OD, Needleman L, Huntley GW (2002) Developmental patterns of cadherin expression and localization in relation to compartmentalized thalamocortical terminations in rat barrel cortex. *J Comp Neurol* 453:372-388.
- Gil OD, Sakurai T, Bradley AE, Fink MY, Cassella MR, Kuo JA, Felsenfeld DP (2003) Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *J Cell Biol* 162:719-730.
- Godenschwege TA, Kristiansen LV, Uthaman SB, Hortsch M, Murphey RK (2006) A conserved role for *Drosophila* Neuroglian and human L1-CAM in central-synapse formation. *Curr Biol* 16:12-23.
- Gomez TM, Zheng JQ (2006) The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nat Rev Neurosci* 7:115-125.
- Gomez TM, Robles E, Poo M, Spitzer NC (2001) Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science* 291:1983-1987.
- Goodwin M, Yap AS (2004) Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. *J Mol Histol* 35:839-844.
- Gorski JA, Gomez LL, Scott JD, Dell'Acqua ML (2005) Association of an A-kinase-anchoring protein signaling scaffold with cadherin adhesion molecules in neurons and epithelial cells. *Mol Biol Cell* 16:3574-3590.
- Gotz M, Wizenmann A, Reinhardt S, Lumsden A, Price J (1996) Selective adhesion of cells from different telencephalic regions. *Neuron* 16:551-564.
- Goulding M (2004) How early is firing required for wiring? *Neuron* 43:601-603.
- Grabham PW, Reznik B, Goldberg DJ (2003) Microtubule and Rac 1-dependent F-actin in growth cones. *J Cell Sci* 116:3739-3748.
- Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM (2004) Neurexins Induce Differentiation of GABA and Glutamate Postsynaptic Specializations via Neuroligins. *Cell* 119:1013-1026.
- Grafstein B (2006) Roger Sperry: pioneer of neuronal specificity. *J Neurophysiol* 96:2827-2829.
- Graus-Porta D, Blaess S, Senften M, Littlewood-Evans A, Damsky C, Huang Z, Orban P, Klein R, Schittny

- JC, Muller U (2001) Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* 31:367-379.
- Gray EG, Whittaker VP (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat* 96:79-88.
- Groc L, Gustafsson B, Hanse E (2006) AMPA signalling in nascent glutamatergic synapses: there and not there! *Trends Neurosci* 29:132-139.
- Grumet M, Friedlander DR, Sakurai T (1996) Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect Dev Neurobiol* 3:319-330.
- Guan KL, Rao Y (2003) Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 4:941-956.
- Guthrie S, Lumsden A (1992) Motor neuron pathfinding following rhombomere reversals in the chick embryo hindbrain. *Development* 114:663-673.
- Hall H, Bozic D, Fauser C, Engel J (2000) Trimerization of cell adhesion molecule L1 mimics clustered L1 expression on the cell surface: influence on L1-ligand interactions and on promotion of neurite outgrowth. *J Neurochem* 75:336-346.
- Hall ZW, Sanes JR (1993) Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* 72 Suppl:99-121.
- Haney CA, Sahenk Z, Li C, Lemmon VP, Roder J, Trapp BD (1999) Heterophilic binding of L1 on unmyelinated sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J Cell Biol* 146:1173-1184.
- Hanson MG, Landmesser LT (2004) Normal patterns of spontaneous activity are required for correct motor axon guidance and the expression of specific guidance molecules. *Neuron* 43:687-701.
- Harel R, Futerman AH (1993) Inhibition of sphingolipid synthesis affects axonal outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 268:14476-14481.
- Harris WA (1986) Homing behaviour of axons in the embryonic vertebrate brain. *Nature* 320:266-269.
- Harrison OJ, Corps EM, Berge T, Kilshaw PJ (2005) The mechanism of cell adhesion by classical cadherins: the role of domain 1. *J Cell Sci* 118:711-721.
- Haspel J, Friedlander DR, Ivgly-May N, Chickramane S, Roonprapunt C, Chen S, Schachner M, Grumet M (2000) Critical and optimal Ig domains for promotion of neurite outgrowth by L1/Ng-CAM. *J Neurobiol* 42:287-302.
- Hatta K, Takeichi M (1986) Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* 320:447-449.
- Hatta K, Takagi S, Fujisawa H, Takeichi M (1987) Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* 120:215-227.
- Hayashi T, Carthew RW (2004) Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina. *Nature* 431:647-652.
- Haydon PG, Drapeau P (1995) From contact to connection: early events during synaptogenesis. *Trends Neurosci* 18:196-201.
- Heidemann SR, Lamoureux P, Buxbaum RE (1990) Growth cone behavior and production of traction force. *J Cell Biol* 111:1949-1957.
- Hemar A, Olivo JC, Williamson E, Saffrich R, Dotti CG (1997) Dendroaxonal transcytosis of transferrin in cultured hippocampal and sympathetic neurons. *J Neurosci* 17:9026-9034.
- Henderson JT, Georgiou J, Jia Z, Robertson J, Elowe S, Roder JC, Pawson T (2001) The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron* 32:1041-1056.
- Henkemeyer M, Itkis OS, Ngo M, Hickmott PW, Ethell IM (2003) Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol* 163:1313-1326.
- Higgins D, Burack M, Lein P, Banker G (1997) Mechanisms of neuronal polarity. *Curr Opin Neurobiol* 7:599-604.
- Hirano S, Wang X, Suzuki ST (2002) Restricted expression of protocadherin 2A in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 98:119-123.
- Hirano S, Suzuki ST, Redies C (2003) The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front Biosci* 8:d306-355.
- Hirano S, Kimoto N, Shimoyama Y, Hirohashi S, Takeichi M (1992) Identification of a neural alpha-catenin

- as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell* 70:293-301.
- Hirling H, Steiner P, Chaperon C, Marsault R, Regazzi R, Catsicas S (2000) Syntaxin 13 is a developmentally regulated SNARE involved in neurite outgrowth and endosomal trafficking. *Eur J Neurosci* 12:1913-1923.
- Hirokawa N, Takemura R (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6:201-214.
- Hollenbeck PJ, Bray D (1987) Rapidly transported organelles containing membrane and cytoskeletal components: their relation to axonal growth. *J Cell Biol* 105:2827-2835.
- Honjo Y, Nakagawa S, Takeichi M (2000) Blockade of cadherin-6B activity perturbs the distribution of PSD-95 family proteins in retinal neurones. *Genes Cells* 5:309-318.
- Horinouchi K, Nakamura Y, Yamanaka H, Watabe T, Shiosaka S (2005) Distribution of L1cam mRNA in the adult mouse brain: In situ hybridization and Northern blot analyses. *J Comp Neurol* 482:386-404.
- Hortsch M (1996) The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17:587-593.
- Hortsch M (2000) Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci* 15:1-10.
- Hortsch M, Wang YM, Marikar Y, Bieber AJ (1995) The cytoplasmic domain of the Drosophila cell adhesion molecule neuroglian is not essential for its homophilic adhesive properties in S2 cells. *J Biol Chem* 270:18809-18817.
- Hoshino T, Sakisaka T, Baba T, Yamada T, Kimura T, Takai Y (2005) Regulation of E-cadherin endocytosis by nectin through afadin, Rap1, and p120ctn. *J Biol Chem* 280:24095-24103.
- Hoshino T, Shimizu K, Honda T, Kawakatsu T, Fukuyama T, Nakamura T, Matsuda M, Takai Y (2004) A novel role of nectins in inhibition of the E-cadherin-induced activation of Rac and formation of cell-cell adherens junctions. *Mol Biol Cell* 15:1077-1088.
- Hu K, Ji L, Applegate KT, Danuser G, Waterman-Storer CM (2007) Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science* 315:111-115.
- Huang ZJ (2006) Subcellular organization of GABAergic synapses: role of ankyrins and L1 cell adhesion molecules. *Nat Neurosci* 9:163-166.
- Hughes A (1953) The growth of embryonic neurites : a study on cultures of chick neural tissues. *J Anat* 87:150-163.
- Huntley GW, Benson DL (1999) Neural (N)-cadherin at developing thalamocortical synapses provides an adhesion mechanism for the formation of somatopically organized connections. *J Comp Neurol* 407:453-471.
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3:661-669.
- Ichtkchenko K, Hata Y, Nguyen T, Ullrich B, Missler M, Moomaw C, Sudhof TC (1995) Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81:435-443.
- Iida J, Hirabayashi S, Sato Y, Hata Y (2004) Synaptic scaffolding molecule is involved in the synaptic clustering of neuroligin. *Mol Cell Neurosci* 27:497-508.
- Inoue A, Sanes JR (1997) Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science* 276:1428-1431.
- Itoh K, Shimono K, Lemmon V (2005) Dephosphorylation and internalization of cell adhesion molecule L1 induced by theta burst stimulation in rat hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 29:245-249.
- Itoh K, Cheng L, Kamei Y, Fushiki S, Kamiguchi H, Gutwein P, Stoeck A, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V (2004) Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *J Cell Biol* 165:145-154. Epub 2004 Apr 2005.
- Jessen U, Novitskaya V, Pedersen N, Serup P, Berezin V, Bock E (2001) The transcription factors CREB and c-Fos play key roles in NCAM-mediated neuritogenesis in PC12-E2 cells. *J Neurochem* 79:1149-1160.
- Johnson KG, McKinnell IW, Stoker AW, Holt CE (2001) Receptor protein tyrosine phosphatases regulate retinal ganglion cell axon outgrowth in the developing *Xenopus* visual system. *J Neurobiol* 49:99-117.
- Jones SB, Lanford GW, Chen YH, Morabito M, Kim K, Lu Q (2002) Glutamate-induced delta-catenin redistribution and dissociation from postsynaptic receptor complexes. *Neuroscience* 115:1009-1021.

- Jontes JD, Emond MR, Smith SJ (2004) In vivo trafficking and targeting of N-cadherin to nascent presynaptic terminals. *J Neurosci* 24:9027-9034.
- Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Garner CC, Tsien RY, Ellisman MH, Malenka RC (2004) Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci* 7:244-253.
- Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M (1990) The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol* 110:193-208.
- Kalus I, Schnegelsberg B, Seidah NG, Kleene R, Schachner M (2003) The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 278:10381-10388.
- Kamiguchi H (2003) The mechanism of axon growth: what we have learned from the cell adhesion molecule L1. *Mol Neurobiol* 28:219-228.
- Kamiguchi H, Lemmon V (1997) Neural cell adhesion molecule L1: signaling pathways and growth cone motility. *J Neurosci Res* 49:1-8.
- Kamiguchi H, Lemmon V (1998) A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. *J Neurosci* 18:3749-3756.
- Kamiguchi H, Lemmon V (2000) Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *J Neurosci* 20:3676-3686.
- Kamiguchi H, Yoshihara F (2001) The role of endocytic L1 trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones. *J Neurosci* 21:9194-9203.
- Kamiguchi H, Long KE, Pendergast M, Schaefer AW, Rapoport I, Kirchhausen T, Lemmon V (1998) The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci* 18:5311-5321.
- Kayser MS, McClelland AC, Hughes EG, Dalva MB (2006) Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. *J Neurosci* 26:12152-12164.
- Kim S, Burette A, Chung HS, Kwon SK, Woo J, Lee HW, Kim K, Kim H, Weinberg RJ, Kim E (2006) NGL family PSD-95-interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation. *Nat Neurosci* 9:1294-1301.
- Kiryushko D, Berezin V, Bock E (2004) Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1014:140-154.
- Kleene R, Yang H, Kutsche M, Schachner M (2001) The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J Biol Chem* 276:21656-21663.
- Klingelhofer J, Troyanovsky RB, Laur OY, Troyanovsky S (2000) Amino-terminal domain of classic cadherins determines the specificity of the adhesive interactions. *J Cell Sci* 113 (Pt 16):2829-2836.
- Ko J, Kim S, Chung HS, Kim K, Han K, Kim H, Jun H, Kaang BK, Kim E (2006) SALM synaptic cell adhesion-like molecules regulate the differentiation of excitatory synapses. *Neuron* 50:233-245.
- Kohmura N, Senzaki K, Hamada S, Kai N, Yasuda R, Watanabe M, Ishii H, Yasuda M, Mishina M, Yagi T (1998) Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron* 20:1137-1151.
- Kolanus W, Seed B (1997) Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr Opin Cell Biol* 9:725-731.
- Kondo S, Sato-Yoshitake R, Noda Y, Aizawa H, Nakata T, Matsuura Y, Hirokawa N (1994) KIF3A is a new microtubule-based anterograde motor in the nerve axon. *J Cell Biol* 125:1095-1107.
- Koticha D, Babiarez J, Kane-Goldsmith N, Jacob J, Raju K, Grumet M (2005) Cell adhesion and neurite outgrowth are promoted by neurofascin NF155 and inhibited by NF186. *Mol Cell Neurosci* 30:137-148.
- Krnjevic K, Morris ME, Reiffenstein RJ (1982) Stimulation-evoked changes in extracellular K⁺ and Ca²⁺ in pyramidal layers of the rat's hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 60:1643-1657.
- Kullander K, Klein R (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:475-486.
- Kypta RM, Su H, Reichardt LF (1996) Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. *J Cell Biol* 134:1519-1529.
- Lafont F, Verkade P, Galli T, Wimmer C, Louvard D, Simons K (1999) Raft association of SNAP receptors

- acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3734-3738.
- Lagenaur C, Lemmon V (1987) An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7753-7757.
- Lambert M, Choquet D, Mege RM (2002) Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 157:469-479.
- Lamoureux P, Ruthel G, Buxbaum RE, Heidemann SR (2002) Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons. *J Cell Biol* 159:499-508.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
- Laurino L, Wang XX, de la Houssaye BA, Sosa L, Dupraz S, Caceres A, Pfenninger KH, Quiroga S (2005) PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J Cell Sci* 118:3653-3662.
- Lawson MA, Maxfield FR (1995) Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377:75-79.
- Lee CH, Herman T, Clandinin TR, Lee R, Zipursky SL (2001) N-cadherin regulates target specificity in the *Drosophila* visual system. *Neuron* 30:437-450.
- Lee RC, Clandinin TR, Lee CH, Chen PL, Meinertzhagen IA, Zipursky SL (2003) The protocadherin Flamingo is required for axon target selection in the *Drosophila* visual system. *Nat Neurosci* 6:557-563.
- Lee SH, Sheng M (2000) Development of neuron-neuron synapses. *Curr Opin Neurobiol* 10:125-131.
- Lemmon V, Farr KL, Lagenaur C (1989) L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2:1597-1603.
- Lemmon V, Burden SM, Payne HR, Elmslie GJ, Hlavin ML (1992) Neurite growth on different substrates: permissive versus instructive influences and the role of adhesive strength. *J Neurosci* 12:818-826.
- Li Z, Sheng M (2003) Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:833-841.
- Liao D, Zhang X, O'Brien R, Ehlers MD, Hagan RL (1999) Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 2:37-43.
- Lilienbaum A, Reszka AA, Horwitz AF, Holt CE (1995) Chimeric integrins expressed in retinal ganglion cells impair process outgrowth in vivo. *Mol Cell Neurosci* 6:139-152.
- Lin CH, Forscher P (1993) Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions. *J Cell Biol* 121:1369-1383.
- Lin CH, Forscher P (1995) Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron* 14:763-771.
- Lin CH, Espreafico EM, Mooseker MS, Forscher P (1996) Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron* 16:769-782.
- Lindner J, Rathjen FG, Schachner M (1983) L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305:427-430.
- Lippman J, Dunaevsky A (2005) Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *J Neurobiol* 64:47-57.
- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126:111-126.
- Lise MF, El-Husseini A (2006) The neuroligin and neuroligin families: from structure to function at the synapse. *Cell Mol Life Sci* 63:1833-1849.
- Lohmann C, Finski A, Bonhoeffer T (2005) Local calcium transients regulate the spontaneous motility of dendritic filopodia. *Nat Neurosci* 8:305-312.
- Long KE, Asou H, Snider MD, Lemmon V (2001) The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J Biol Chem* 276:1285-1290.
- Luo Y, Ferreira-Cornwell M, Baldwin H, Kostetskii I, Lenox J, Lieberman M, Radice G (2001) Rescuing the N-cadherin knockout by cardiac-specific expression of N- or E-cadherin. *Development* 128:459-469.
- Luthi A, Mohajeri H, Schachner M, Laurent JP (1996) Reduction of hippocampal long-term potentiation in transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *J Neurosci*

- Luthi A, Laurent JP, Figurov A, Muller D, Schachner M (1994) Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 372:777-779.
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283:1923-1927.
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-126.
- Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, Robakis NK (2003) A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* 114:635-645.
- Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P, Reiss K (2005) L1 Is Sequentially Processed by Two Differently Activated Metalloproteases and Presenilin/ $\{\gamma\}$ -Secretase and Regulates Neural Cell Adhesion, Cell Migration, and Neurite Outgrowth. *Mol Cell Biol* 25:9040-9053.
- Martenson C, Stone K, Reedy M, Sheetz M (1993) Fast axonal transport is required for growth cone advance. *Nature* 366:66-69.
- Martin KC, Kandel ER (1996) Cell adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connections. *Neuron* 17:567-570.
- Martinez A, Soriano E (2005) Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev* 49:211-226.
- Martinez-Arca S, Alberts P, Zahraoui A, Louvard D, Galli T (2000) Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J Cell Biol* 149:889-900.
- Martinez-Arca S, Coco S, Mainguy G, Schenk U, Alberts P, Bouille P, Mezzina M, Prochiantz A, Matteoli M, Louvard D, Galli T (2001) A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. *J Neurosci* 21:3830-3838.
- Martinez-Arca S, Rudge R, Vacca M, Raposo G, Camonis J, Proux-Gillardeaux V, Daviet L, Formstecher E, Hamburger A, Filippini F, D'Esposito M, Galli T (2003) A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9011-9016.
- Masai I, Lele Z, Yamaguchi M, Komori A, Nakata A, Nishiwaki Y, Wada H, Tanaka H, Nojima Y, Hammerschmidt M, Wilson SW, Okamoto H (2003) N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development* 130:2479-2494.
- Matsumoto-Miyai K, Ninomiya A, Yamasaki H, Tamura H, Nakamura Y, Shiosaka S (2003) NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23:7727-7736.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4:1086-1092.
- Matter K, Mellman I (1994) Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 6:545-554.
- Matus A (2000) Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290:754-758.
- Mayford M, Barzilai A, Keller F, Schacher S, Kandel ER (1992) Modulation of an NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in *Aplysia*. *Science* 256:638-644.
- McGuire JC, Greene LA, Furano AV (1978) NGF stimulates incorporation of fucose or glucosamine into an external glycoprotein in cultured rat PC12 pheochromocytoma cells. *Cell* 15:357-365.
- Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S, Postina R, Fahrenholz F, Fogel M, Lemmon V, Altevogt P (2001) Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 155:661-673.
- Medeiros NA, Burnette DT, Forscher P (2006) Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat Cell Biol* 8:215-226.
- Meiri KF, Saffell JL, Walsh FS, Doherty P (1998) Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion

- molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones. *J Neurosci* 18:10429-10437.
- Mellman I (1996) Membranes and sorting. *Curr Opin Cell Biol* 8:497-498.
- Mi ZP, Jiang P, Weng WL, Lindberg FP, Narayanan V, Lagenaur CF (2000) Expression of a synapse-associated membrane protein, P84/SHPS-1, and its ligand, IAP/CD47, in mouse retina. *J Comp Neurol* 416:335-344.
- Miskevich F, Zhu Y, Ranscht B, Sanes JR (1998) Expression of multiple cadherins and catenins in the chick optic tectum. *Mol Cell Neurosci* 12:240-255.
- Misko TP, Radeke MJ, Shooter EM (1987) Nerve growth factor in neuronal development and maintenance. *J Exp Biol* 132:177-190.
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, Sudhof TC (2003) Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423:939-948.
- Mitchison TJ, Cramer LP (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84:371-379.
- Miyata S, Matsumoto N, Taguchi K, Akagi A, Iino T, Funatsu N, Maekawa S (2003) Biochemical and ultrastructural analyses of IgLON cell adhesion molecules, Kilon and OBCAM in the rat brain. *Neuroscience* 117:645-658.
- Mizoguchi A, Nakanishi H, Kimura K, Matsubara K, Ozaki-Kuroda K, Katata T, Honda T, Kiyohara Y, Heo K, Higashi M, Tsutsumi T, Sonoda S, Ide C, Takai Y (2002) Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses. *J Cell Biol* 156:555-565.
- Moeller ML, Shi Y, Reichardt LF, Ethell IM (2006) EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation. *J Biol Chem* 281:1587-1598.
- Mozhayeva MG, Sara Y, Liu X, Kavalali ET (2002) Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J Neurosci* 22:654-665.
- Mueller BK (1999) Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* 22:351-388.
- Murai KK, Misner D, Ranscht B (2002) Contactin supports synaptic plasticity associated with hippocampal long-term depression but not potentiation. *Curr Biol* 12:181-190.
- Murase S, Mosser E, Schuman EM (2002) Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron* 35:91-105.
- Murthy M, Garza D, Scheller RH, Schwarz TL (2003) Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists. *Neuron* 37:433-447.
- Nacher J, Blasco-Ibanez JM, McEwen BS (2002) Non-granule PSA-NCAM immunoreactive neurons in the rat hippocampus. *Brain Res* 930:1-11.
- Nakai J (1956) Dissociated dorsal root ganglia in tissue culture. *Am J Anat* 99:81-129.
- Nakai Y, Kamiguchi H (2002) Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate-dependent manner. *J Cell Biol* 159:1097-1108. Epub 2002 Dec 1023.
- Nakamura Y, Tamura H, Horinouchi K, Shiosaka S (2006) Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *J Cell Sci* 119:1341-1349. Epub 2006 Mar 1314.
- Nakata A, Kamiguchi H (2007) Serine phosphorylation by casein kinase II controls endocytic L1 trafficking and axon growth. *J Neurosci Res*.
- Nakayama M, Nakajima D, Yoshimura R, Endo Y, Ohara O (2002) MEGF1/fat2 proteins containing extraordinarily large extracellular domains are localized to thin parallel fibers of cerebellar granule cells. *Mol Cell Neurosci* 20:563-578.
- Nam CI, Chen L (2005) Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6137-6142. Epub 2005 Apr 6118.
- Nayeem N, Silletti S, Yang X, Lemmon VP, Reisfeld RA, Stallcup WB, Montgomery AM (1999) A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J Cell Sci* 112 (Pt 24):4739-4749.
- Neves G, Zucker J, Daly M, Chess A (2004) Stochastic yet biased expression of multiple Dscam splice variants by individual cells. *Nat Genet* 36:240-246. Epub 2004 Feb 2001.
- Nishimura K, Yoshihara F, Tojima T, Ooashi N, Yoon W, Mikoshiba K, Bennett V, Kamiguchi H (2003) L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde

- actin flow. *J Cell Biol* 163:1077-1088.
- Noda Y, Sato-Yoshitake R, Kondo S, Nangaku M, Hirokawa N (1995) KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J Cell Biol* 129:157-167.
- Nuriya M, Haganir RL (2006) Regulation of AMPA receptor trafficking by N-cadherin. *J Neurochem* 97:652-661. Epub 2006 Mar 2003.
- O'Brien RJ, Xu D, Petralia RS, Steward O, Haganir RL, Worley P (1999) Synaptic clustering of AMPA receptors by the extracellular immediate-early gene product Narp. *Neuron* 23:309-323.
- Okabe S, Kim HD, Miwa A, Kuriu T, Okado H (1999) Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nat Neurosci* 2:804-811.
- Okabe S, Urushido T, Konno D, Okado H, Sobue K (2001) Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. *J Neurosci* 21:9561-9571.
- Okamura K, Tanaka H, Yagita Y, Saeki Y, Taguchi A, Hiraoka Y, Zeng LH, Colman DR, Miki N (2004) Cadherin activity is required for activity-induced spine remodeling. *J Cell Biol* 167:961-972.
- Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Tong KI, Yau P, Takeichi M, Ikura M (1995) Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 267:386-389.
- Overly CC, Hollenbeck PJ (1996) Dynamic organization of endocytic pathways in axons of cultured sympathetic neurons. *J Neurosci* 16:6056-6064.
- Ozawa M (1998) Identification of the region of alpha-catenin that plays an essential role in cadherin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 273:29524-29529.
- Palecek SP, Schmidt CE, Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts. *J Cell Sci* 109 (Pt 5):941-952.
- Panicker AK, Buhusi M, Erickson A, Maness PF (2006) Endocytosis of beta1 integrins is an early event in migration promoted by the cell adhesion molecule L1. *Exp Cell Res* 312:299-307.
- Papa M, Segal M (1996) Morphological plasticity in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 71:1005-1011.
- Paradis S, Harrar DB, Lin Y, Koon AC, Hauser JL, Griffith EC, Zhu L, Brass LF, Chen C, Greenberg ME (2007) An RNAi-based approach identifies molecules required for glutamatergic and GABAergic synapse development. *Neuron* 53:217-232.
- Park C, Falls W, Finger JH, Longo-Guess CM, Ackerman SL (2002) Deletion in *Catna2*, encoding alpha N-catenin, causes cerebellar and hippocampal lamination defects and impaired startle modulation. *Nat Genet* 31:279-284.
- Passafaro M, Piech V, Sheng M (2001) Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4:917-926.
- Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, Sheng M (2003) Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature* 424:677-681.
- Payne HR, Burden SM, Lemmon V (1992) Modulation of growth cone morphology by substrate-bound adhesion molecules. *Cell Motil Cytoskeleton* 21:65-73.
- Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Haganir RL (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37:263-274.
- Perego C, Vanoni C, Massari S, Longhi R, Pietrini G (2000) Mammalian LIN-7 PDZ proteins associate with beta-catenin at the cell-cell junctions of epithelia and neurons. *Embo J* 19:3978-3989.
- Perret E, Leung A, Feracci H, Evans E (2004) Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16472-16477.
- Perrin FE, Rathjen FG, Stoeckli ET (2001) Distinct subpopulations of sensory afferents require F11 or axonin-1 for growth to their target layers within the spinal cord of the chick. *Neuron* 30:707-723.
- Persohn E, Schachner M (1990) Immunohistological localization of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM in the developing hippocampus of the mouse. *J Neurocytol* 19:807-819.
- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J (1999) A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J* 18:1738-1747.
- Peyrieras N, Hyafil F, Louvard D, Ploegh HL, Jacob F (1983) Uvomorulin: a nonintegral membrane protein

- of early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6274-6277.
- Pfenninger KH, Friedman LB (1993) Sites of plasmalemmal expansion in growth cones. *Brain Res Dev Brain Res* 71:181-192.
- Phillips GR, Tanaka H, Frank M, Elste A, Fidler L, Benson DL, Colman DR (2003) Gamma-protocadherins are targeted to subsets of synapses and intracellular organelles in neurons. *J Neurosci* 23:5096-5104.
- Phillips GR, Huang JK, Wang Y, Tanaka H, Shapiro L, Zhang W, Shan WS, Arndt K, Frank M, Gordon RE, Gawinowicz MA, Zhao Y, Colman DR (2001) The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. *Neuron* 32:63-77.
- Piper M, Salih S, Weigl C, Holt CE, Harris WA (2005) Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. *Nat Neurosci* 8:179-186.
- Polishchuk EV, Di Pentima A, Luini A, Polishchuk RS (2003) Mechanism of constitutive export from the golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains. *Mol Biol Cell* 14:4470-4485.
- Poskanzer K, Needleman LA, Bozdagi O, Huntley GW (2003) N-cadherin regulates ingrowth and laminar targeting of thalamocortical axons. *J Neurosci* 23:2294-2305.
- Prakash S, Caldwell JC, Eberl DF, Clandinin TR (2005) *Drosophila* N-cadherin mediates an attractive interaction between photoreceptor axons and their targets. *Nat Neurosci* 8:443-450.
- Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO (1997) Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* 181:64-78.
- Ramanathan R, Wilkemeyer MF, Mittal B, Perides G, Charness ME (1996) Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *J Cell Biol* 133:381-390.
- Rao A, Kim E, Sheng M, Craig AM (1998) Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 18:1217-1229.
- Rathjen FG, Schachner M (1984) Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *Embo J* 3:1-10.
- Redies C, Takeichi M (1996) Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. *Dev Biol* 180:413-423.
- Redies C, Ast M, Nakagawa S, Takeichi M, Martinez-de-la-Torre M, Puelles L (2000) Morphologic fate of diencephalic prosomeres and their subdivisions revealed by mapping cadherin expression. *J Comp Neurol* 421:481-514.
- Riehl R, Johnson K, Bradley R, Grunwald GB, Cornel E, Lilienbaum A, Holt CE (1996) Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* 17:837-848.
- Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM (2003) Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol* 5:599-609.
- Rollenhagen A, Lubke JH (2006) The morphology of excitatory central synapses: from structure to function. *Cell Tissue Res* 326:221-237.
- Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M (1999) Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 274:36734-36740.
- Roux A, Uyhazi K, Frost A, De Camilli P (2006) GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441:528-531.
- Rubio ME, Curcio C, Chauvet N, Bruses JL (2005) Assembly of the N-cadherin complex during synapse formation involves uncoupling of p120-catenin and association with presenilin 1. *Mol Cell Neurosci* 30:611-623.
- Rutishauser U, Gall WE, Edelman GM (1978) Adhesion among neural cells of the chick embryo. IV. Role of the cell surface molecule CAM in the formation of neurite bundles in cultures of spinal ganglia. *J Cell Biol* 79:382-393.
- Saffell JL, Williams EJ, Mason IJ, Walsh FS, Doherty P (1997) Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* 18:231-242.
- Saghatelyan AK, Nikonenko AG, Sun M, Rolf B, Putthoff P, Kutsche M, Bartsch U, Dityatev A, Schachner M (2004) Reduced GABAergic transmission and number of hippocampal perisomatic inhibitory synapses in juvenile mice deficient in the neural cell adhesion molecule L1. *Mol Cell Neurosci* 26:191-203.

- Sakisaka T, Takai Y (2005) Cell adhesion molecules in the CNS. *J Cell Sci* 118:5407-5410.
- Salinas PC, Price SR (2005) Cadherins and catenins in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 15:73-80.
- Sanes JR (1997) Genetic analysis of postsynaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Curr Opin Neurobiol* 7:93-100.
- Sans N, Petralia RS, Wang YX, Blahos J, 2nd, Hell JW, Wenthold RJ (2000) A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20:1260-1271.
- Sara Y, Biederer T, Atasoy D, Chubykin A, Mozhayeva MG, Sudhof TC, Kavalali ET (2005) Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *J Neurosci* 25:260-270.
- Sato T, Fujita N, Yamada A, Ooshio T, Okamoto R, Irie K, Takai Y (2006) Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 281:5288-5299.
- Schaefer AW, Kamiguchi H, Wong EV, Beach CM, Landreth G, Lemmon V (1999) Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J Biol Chem* 274:37965-37973.
- Schaefer AW, Kamei Y, Kamiguchi H, Wong EV, Rapoport I, Kirchhausen T, Beach CM, Landreth G, Lemmon SK, Lemmon V (2002) L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J Cell Biol* 157:1223-1232. Epub 2002 Jun 1224.
- Scheiffele P (2003) Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 26:485-508.
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657-669.
- Schmid RS, Pruitt WM, Maness PF (2000) A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J Neurosci* 20:4177-4188.
- Schmid RS, Graff RD, Schaller MD, Chen S, Schachner M, Hemperly JJ, Maness PF (1999) NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol* 38:542-558.
- Schultheis M, Diestel S, Schmitz B (2006) The Role of Cytoplasmic Serine Residues of the Cell Adhesion Molecule L1 in Neurite Outgrowth, Endocytosis, and Cell Migration. *Cell Mol Neurobiol*.
- Schurmann G, Haspel J, Grumet M, Erickson HP (2001) Cell adhesion molecule L1 in folded (horseshoe) and extended conformations. *Mol Biol Cell* 12:1765-1773.
- Schuster CM, Davis GW, Fetter RD, Goodman CS (1996a) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* 17:641-654.
- Schuster CM, Davis GW, Fetter RD, Goodman CS (1996b) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity. *Neuron* 17:655-667.
- Schuster T, Krug M, Stalder M, Hackel N, Gerardy-Schahn R, Schachner M (2001) Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J Neurobiol* 49:142-158.
- Senzaki K, Ogawa M, Yagi T (1999) Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell* 99:635-647.
- Serafini T (1999) Finding a partner in a crowd: neuronal diversity and synaptogenesis. *Cell* 98:133-136.
- Serizawa S, Miyamichi K, Takeuchi H, Yamagishi Y, Suzuki M, Sakano H (2006) A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* 127:1057-1069.
- Serpinskaya AS, Feng G, Sanes JR, Craig AM (1999) Synapse formation by hippocampal neurons from agrin-deficient mice. *Dev Biol* 205:65-78.
- Serra-Pages C, Medley QG, Tang M, Hart A, Streuli M (1998) Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins. *J Biol Chem* 273:15611-15620.
- Setou M, Nakagawa T, Seog DH, Hirokawa N (2000) Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288:1796-1802.
- Shapira M, Zhai RG, Dresbach T, Bresler T, Torres VI, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2003)

- Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. *Neuron* 38:237-252.
- Shapiro L, Colman DR (1999) The diversity of cadherins and implications for a synaptic adhesive code in the CNS. *Neuron* 23:427-430.
- Shapiro L, Kwong PD, Fannon AM, Colman DR, Hendrickson WA (1995) Considerations on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6793-6797.
- Sheetz MP, Dai J (1996) Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends Cell Biol* 6:85-89.
- Shen K, Meyer T (1999) Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science* 284:162-166.
- Shen K, Bargmann CI (2003) The immunoglobulin superfamily protein SYG-1 determines the location of specific synapses in *C. elegans*. *Cell* 112:619-630.
- Shen K, Fetter RD, Bargmann CI (2004) Synaptic specificity is generated by the synaptic guidepost protein SYG-2 and its receptor, SYG-1. *Cell* 116:869-881.
- Sheng M (2001) Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7058-7061.
- Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R (1999) Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284:1811-1816.
- Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, et al. (1995) Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* 128:949-957.
- Shima Y, Kengaku M, Hirano T, Takeichi M, Uemura T (2004) Regulation of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin. *Dev Cell* 7:205-216.
- Silletti S, Mei F, Sheppard D, Montgomery AM (2000) Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J Cell Biol* 149:1485-1502.
- Sivasankar S, Briehner W, Lavrik N, Gumbiner B, Leckband D (1999) Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11820-11824.
- Somogyi P, Freund TF, Hodgson AJ, Somogyi J, Beroukas D, Chubb IW (1985) Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus and visual cortex of the cat. *Brain Res* 332:143-149.
- Song H, Poo M (2001) The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol* 3:E81-88.
- Song JY, Ichtchenko K, Sudhof TC, Brose N (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1100-1105.
- Spacek J, Harris KM (1998) Three-dimensional organization of cell adhesion junctions at synapses and dendritic spines in area CA1 of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 393:58-68.
- Sperry RW (1963) Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50:703-710.
- Stallcup WB, Beasley L (1985a) Involvement of the nerve growth factor-inducible large external glycoprotein (NILE) in neurite fasciculation in primary cultures of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:1276-1280.
- Stallcup WB, Beasley L (1985b) Polymorphism among NILE-related glycoproteins from different types of neurons. *Brain Res* 346:287-293.
- Stephens DJ, Pepperkok R (2001) Illuminating the secretory pathway: when do we need vesicles? *J Cell Sci* 114:1053-1059.
- Steward O, Schuman EM (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 24:299-325.
- Stoeck A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, Gutwein P, Ludwig A, Rubinstein E, Altevogt P (2006) A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393:609-618.
- Sumita K, Sato Y, Iida J, Kawata A, Hamano M, Hirabayashi S, Ohno K, Peles E, Hata Y (2007) Synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) membrane-associated guanylate kinase with inverted organization

- (MAGI)-2 is associated with cell adhesion molecules at inhibitory synapses in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 100:154-166.
- Sundara Rajan S, Vu TQ (2006) Quantum dots monitor TrkA receptor dynamics in the interior of neural PC12 cells. *Nano Lett* 6:2049-2059.
- Super H, Soriano E (1994) The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer DiI. *J Comp Neurol* 344:101-120.
- Super H, Martinez A, Del Rio JA, Soriano E (1998) Involvement of distinct pioneer neurons in the formation of layer-specific connections in the hippocampus. *J Neurosci* 18:4616-4626.
- Suter DM, Forscher P (1998) An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 8:106-116.
- Suter DM, Forscher P (2000) Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* 44:97-113.
- Suter DM, Forscher P (2001) Transmission of growth cone traction force through apCAM-cytoskeletal linkages is regulated by Src family tyrosine kinase activity. *J Cell Biol* 155:427-438.
- Suzuki SC, Inoue T, Kimura Y, Tanaka T, Takeichi M (1997) Neuronal circuits are subdivided by differential expression of type-II classic cadherins in postnatal mouse brains. *Mol Cell Neurosci* 9:433-447.
- Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Dityatev A, Schachner M (2004) Trans-Golgi network delivery of synaptic proteins in synaptogenesis. *J Cell Sci* 117:381-388.
- Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Delling M, Dityateva G, Dityatev A, Schachner M (2002) Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts. *J Cell Biol* 159:649-661. Epub 2002 Nov 2018.
- Tachibana K, Nakanishi H, Mandai K, Ozaki K, Ikeda W, Yamamoto Y, Nagafuchi A, Tsukita S, Takai Y (2000) Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *J Cell Biol* 150:1161-1176.
- Takai Y, Nakanishi H (2003) Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* 116:17-27.
- Takeda Y, Asou H, Murakami Y, Miura M, Kobayashi M, Uyemura K (1996) A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J Neurochem* 66:2338-2349.
- Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455.
- Takeichi M (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7:619-627.
- Takeichi M (2006) The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci*.
- Takeichi M, Abe K (2005) Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends Cell Biol* 15:216-221.
- Takumi Y, Ramirez-Leon V, Laake P, Rinvik E, Ottersen OP (1999) Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 2:618-624.
- Tanabe K, Takahashi Y, Sato Y, Kawakami K, Takeichi M, Nakagawa S (2006) Cadherin is required for dendritic morphogenesis and synaptic terminal organization of retinal horizontal cells. *Development* 133:4085-4096.
- Tanaka E, Sabry J (1995) Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83:171-176.
- Tanaka H, Shan W, Phillips GR, Arndt K, Bozdagi O, Shapiro L, Huntley GW, Benson DL, Colman DR (2000) Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron* 25:93-107.
- Tang BL (2001) Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. *J Neurochem* 79:923-930.
- Tang L, Hung CP, Schuman EM (1998) A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 20:1165-1175.
- Tang N, He M, O'Riordan MA, Farkas C, Buck K, Lemmon V, Bearer CF (2006) Ethanol inhibits L1 cell adhesion molecule activation of mitogen-activated protein kinases. *J Neurochem* 96:1480-1490.
- Tani T, Miyamoto Y, Fujimori KE, Taguchi T, Yanagida T, Sako Y, Harada Y (2005) Trafficking of a ligand-receptor complex on the growth cones as an essential step for the uptake of nerve growth factor at the distal end of the axon: a single-molecule analysis. *J Neurosci* 25:2181-2191.

- Taniguchi H, Kawauchi D, Nishida K, Murakami F (2006) Classic cadherins regulate tangential migration of precerebellar neurons in the caudal hindbrain. *Development* 133:1923-1931.
- Tashiro A, Yuste R (2004) Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci* 26:429-440.
- Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M (2000) Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:91-100.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.
- Thiery JP, Brackenbury R, Rutishauser U, Edelman GM (1977) Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. *J Biol Chem* 252:6841-6845.
- Thoumine O, Lambert M, Mege RM, Choquet D (2006) Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Mol Biol Cell* 17:862-875. Epub 2005 Nov 2030.
- Thoumine O, Saint-Michel E, Dequidt C, Falk J, Rudge R, Galli T, Faivre-Sarrailh C, Choquet D (2005) Weak effect of membrane diffusion on the rate of receptor accumulation at adhesive contacts. *Biophys J* 89:L40-42. Epub 2005 Sep 2016.
- Tissir F, Bar I, Jossin Y, De Backer O, Goffinet AM (2005) Protocadherin Celsr3 is crucial in axonal tract development. *Nat Neurosci* 8:451-457.
- Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M (2002) Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 35:77-89.
- Togashi H, Miyoshi J, Honda T, Sakisaka T, Takai Y, Takeichi M (2006) Interneurite affinity is regulated by heterophilic nectin interactions in concert with the cadherin machinery. *J Cell Biol* 174:141-151. Epub 2006 Jun 2026.
- Tojima T, Akiyama H, Itofusa R, Li Y, Katayama H, Miyawaki A, Kamiguchi H (2007) Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat Neurosci* 10:58-66.
- Toomre D, Keller P, White J, Olivo JC, Simons K (1999) Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 1):21-33.
- Torres R, Firestein BL, Dong H, Staudinger J, Olson EN, Hagan RL, Brecht DS, Gale NW, Yancopoulos GD (1998) PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* 21:1453-1463.
- Tosney KW, Wessells NK (1983) Neuronal motility: the ultrastructure of veils and microspikes correlates with their motile activities. *J Cell Sci* 61:389-411.
- Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol* 135:767-779.
- Uemura K, Kihara T, Kuzuya A, Okawa K, Nishimoto T, Ninomiya H, Sugimoto H, Kinoshita A, Shimohama S (2006) Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1. *Neurosci Lett* 402:278-283.
- Ullrich B, Ushkaryov YA, Sudhof TC (1995) Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron* 14:497-507.
- Umehori H, Linhoff MW, Ornitz DM, Sanes JR (2004) FGF22 and its close relatives are presynaptic organizing molecules in the mammalian brain. *Cell* 118:257-270.
- Uryu K, Butler AK, Chesselet MF (1999) Synaptogenesis and ultrastructural localization of the polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *J Comp Neurol* 405:216-232.
- van den Pol AN, Kim WT (1993) NILE/L1 and NCAM-polysialic acid expression on growing axons of isolated neurons. *J Comp Neurol* 332:237-257.
- Van Vactor D (1998) Adhesion and signaling in axonal fasciculation. *Curr Opin Neurobiol* 8:80-86.
- Varoqueaux F, Sigler A, Rhee JS, Brose N, Enk C, Reim K, Rosenmund C (2002) Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9037-9042.
- Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Sudhof TC, Brose N (2006) Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51:741-754.
- Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E (2000) Directed actin polymerization is the driving force for

- epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 100:209-219.
- Vega IE, Hsu SC (2001) The exocyst complex associates with microtubules to mediate vesicle targeting and neurite outgrowth. *J Neurosci* 21:3839-3848.
- Verderio C, Coco S, Pravettoni E, Bacci A, Matteoli M (1999) Synaptogenesis in hippocampal cultures. *Cell Mol Life Sci* 55:1448-1462.
- Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Sudhof TC (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287:864-869.
- Waites CL, Marie Craig A, Garner CC (2005) Mechanisms of Vertebrate Synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci* 28:251-274.
- Walsh FS, Doherty P (1997) Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:425-456.
- Wang CY, Chang K, Petralia RS, Wang YX, Seabold GK, Wenthold RJ (2006) A novel family of adhesion-like molecules that interacts with the NMDA receptor. *J Neurosci* 26:2174-2183.
- Wang X, Su H, Bradley A (2002) Molecular mechanisms governing Pcdh-gamma gene expression: evidence for a multiple promoter and cis-alternative splicing model. *Genes Dev* 16:1890-1905.
- Washbourne P, Bennett JE, McAllister AK (2002) Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nat Neurosci* 5:751-759.
- Washbourne P, Dityatev A, Scheiffele P, Biederer T, Weiner JA, Christopherson KS, El-Husseini A (2004) Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci* 24:9244-9249.
- Waterman-Storer CM, Desai A, Bulinski JC, Salmon ED (1998) Fluorescent speckle microscopy, a method to visualize the dynamics of protein assemblies in living cells. *Curr Biol* 8:1227-1230.
- Weiner JA, Wang X, Tapia JC, Sanes JR (2005) Gamma protocadherins are required for synaptic development in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8-14.
- Weiss P (1934) In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *Journal of Experimental Zoology* 68:393-448.
- Wheelock MJ, Johnson KR (2003) Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* 15:509-514.
- Whitesides JG, 3rd, LaMantia AS (1995) Distinct adhesive behaviors of neurons and neural precursor cells during regional differentiation in the mammalian forebrain. *Dev Biol* 169:229-241.
- Wilde A, Beattie EC, Lem L, Riethof DA, Liu SH, Mobley WC, Soriano P, Brodsky FM (1999) EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* 96:677-687.
- Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P (1994) Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13:583-594.
- Williams EJ, Mittal B, Walsh FS, Doherty P (1995) A Ca²⁺/calmodulin kinase inhibitor, KN-62, inhibits neurite outgrowth stimulated by CAMs and FGF. *Mol Cell Neurosci* 6:69-79.
- Winckler B, Forscher P, Mellman I (1999) A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* 397:698-701.
- Wisco D, Anderson ED, Chang MC, Norden C, Boiko T, Folsch H, Winckler B (2003) Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *J Cell Biol* 162:1317-1328.
- Wizenmann A, Lumsden A (1997) Segregation of rhombomeres by differential chemoaffinity. *Mol Cell Neurosci* 9:448-459.
- Wojtowicz WM, Flanagan JJ, Millard SS, Zipursky SL, Clemens JC (2004) Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell* 118:619-633.
- Wollmuth LP, Sobolevsky AI (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 27:321-328.
- Wong EV, Kenwrick S, Willems P, Lemmon V (1995) Mutations in the cell adhesion molecule L1 cause mental retardation. *Trends Neurosci* 18:168-172.
- Wong EV, Schaefer AW, Landreth G, Lemmon V (1996) Casein kinase II phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 66:779-786.
- Wood PM, Schachner M, Bunge RP (1990) Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J Neurosci* 10:3635-3645.
- Wu Q, Maniatis T (1999) A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell

adhesion genes. *Cell* 97:779-790.

- Wyszynski M, Kim E, Dunah AW, Passafaro M, Valtschanoff JG, Serra-Pages C, Streuli M, Weinberg RJ, Sheng M (2002) Interaction between GRIP and liprin-alpha/SYD2 is required for AMPA receptor targeting. *Neuron* 34:39-52.
- Yagi T, Takeichi M (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14:1169-1180.
- Yamada A, Irie K, Deguchi-Tawarada M, Ohtsuka T, Takai Y (2003) Nectin-dependent localization of synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) at the puncta adherentia junctions formed between the mossy fibre terminals and the dendrites of pyramidal cells in the CA3 area of the mouse hippocampus. *Genes Cells* 8:985-994.
- Yamagata M, Sanes JR (1995) Lamina-specific cues guide outgrowth and arborization of retinal axons in the optic tectum. *Development* 121:189-200.
- Yamagata M, Herman JP, Sanes JR (1995) Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J Neurosci* 15:4556-4571.
- Yamagata M, Weiner JA, Sanes JR (2002) Sidekicks: synaptic adhesion molecules that promote lamina-specific connectivity in the retina. *Cell* 110:649-660.
- Yamagata M, Sanes JR, Weiner JA (2003) Synaptic adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15:621-632.
- Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V (1997) CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics* 28:175-178.
- Yap AS, Briehner WM, Pruschy M, Gumbiner BM (1997) Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol* 7:308-315.
- Yip PM, Siu CH (2001) PC12 cells utilize the homophilic binding site of L1 for cell-cell adhesion but L1-alpha3 interaction for neurite outgrowth. *J Neurochem* 76:1552-1564.
- Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2001) Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron* 29:131-143.
- Zhang H, Miller RH, Rutishauser U (1992) Polysialic acid is required for optimal growth of axons on a neuronal substrate. *J Neurosci* 12:3107-3114.
- Zhang W, Benson DL (2001) Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J Neurosci* 21:5169-5181.
- Zhao X, Siu CH (1995) Colocalization of the homophilic binding site and the neuritogenic activity of the cell adhesion molecule L1 to its second Ig-like domain. *J Biol Chem* 270:29413-29421.
- Zhao X, Yip PM, Siu CH (1998) Identification of a homophilic binding site in immunoglobulin-like domain 2 of the cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 71:960-971.
- Zheng J, Buxbaum RE, Heidemann SR (1993) Investigation of microtubule assembly and organization accompanying tension-induced neurite initiation. *J Cell Sci* 104 (Pt 4):1239-1250.
- Zheng J, Buxbaum RE, Heidemann SR (1994) Measurements of growth cone adhesion to culture surfaces by micromanipulation. *J Cell Biol* 127:2049-2060.
- Zisch AH, Pasquale EB (1997) The Eph family: a multitude of receptors that mediate cell recognition signals. *Cell Tissue Res* 290:217-226.
- Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.
- Ziv NE, Garner CC (2001) Principles of glutamatergic synapse formation: seeing the forest for the trees. *Curr Opin Neurobiol* 11:536-543.
- Ziv NE, Garner CC (2004) Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci* 5:385-399.

Liste des publications et communications

PUBLICATIONS

du Roure O., **Dequidt C.**, Richert A., Austin R. H., Buguin A., Chavrier P., Silberzan P. & Ladoux B. (2004). Microfabricated arrays of elastomeric posts to study cellular mechanics. *Proc. S.P.I.E.* 5345, 26-34 (2004).

Falk J., Thoumine O., **Dequidt C.**, Choquet D., Faivre-Sarrailh C. (2004). NrCAM coupling to the cytoskeleton depends on multiple protein domains and partitioning into lipid rafts. *Mol. Biol. Cell.* 15, 4695-4709.

Thoumine O., Saint-Michel E., **Dequidt C.**, Falk J., Rudge R., Galli T., Faivre-Sarrailh C., Choquet D. (2005). Weak Effect of Membrane Diffusion on the Rate of Receptor Accumulation at Adhesive Contacts. *Biophys J.* 2005, 89(5):L40-2.

Saglietti L., **Dequidt C.**, Fagni L., Thoumine O., Choquet D., Sala C., Sheng M., Passafaro M. (2007). Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron* 54(3), 461-477.

Dequidt C., Danglot L., Alberts P., Galli T., Choquet D., and Thoumine O.. Fast turnover of L1 adhesions in neuronal growth cones involving both surface diffusion and exo/endocytosis of L1 molecules. *Mol Biol Cell.* Epub 30 May 2007.

COMMUNICATIONS

- Journées de l'Ecole Doctorale "Sciences Biologiques et Médicales"
Arcachon, 2005 et 2006

Dequidt C., Alberts P., Galli T., Choquet D. & Thoumine O.
Dynamics of L1-dependent contacts on neuronal growth cones (2005, poster)

Dequidt C., Saglietti L., Passafaro M., Thoumine O. & Choquet D.
A functional interaction between GluR2 and N-cadherin (2006, poster)

- 7e Colloque de la Société des Neurosciences
Lille 17-20 mai 2005 _

Dequidt C., Alberts P., Galli T., Choquet D. & Thoumine O.
Dynamics of L1-dependent contacts on neuronal growth cones (poster)

- 15th IUPAB & 5th EBSA International Biophysics Congress
27 Août - 1 septembre 2005, Montpellier - France

Dequidt C., Alberts P., Galli T., Choquet D. & Thoumine O.
Dynamics of L1-dependent contacts on neuronal growth cones (*Obtention du prix du poster "morphogénèse"*)

- 5th Forum of European NeuroSciences (FENS)
Vienne (Autriche), 8-12 juillet 2006

Dequidt C., Saglietti L., Passafaro M., Thoumine O. & Choquet D.
A functional interaction between GluR2 and N-cadherin (poster)