



Susd2 et Susd4 sont deux nouveaux gènes codant pour des protéines avec domaines CCP (Complement Control Protein) jouant un rôle dans plusieurs étapes du développement des circuits neuronaux au sein de cultures d'hippocampe de rat

Yann Nadjar

► **To cite this version:**

Yann Nadjar. Susd2 et Susd4 sont deux nouveaux gènes codant pour des protéines avec domaines CCP (Complement Control Protein) jouant un rôle dans plusieurs étapes du développement des circuits neuronaux au sein de cultures d'hippocampe de rat. Neurobiologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. <NNT : 2014PA066664>. <tel-01158503>

HAL Id: tel-01158503

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01158503>

Submitted on 1 Jun 2015

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE – UFR DE BIOLOGIE

Ecole Doctorale Cerveau Cognition Comportement (ED3C)

Présentée par et soutenue le 5 décembre 2014 par **Yann NADJAR**

Sujet de la thèse :

Susd2 et Susd4 sont deux nouveaux gènes codant pour des protéines avec domaines CCP (Complement Control Protein) jouant un rôle dans plusieurs étapes du développement des circuits neuronaux au sein de cultures d'hippocampe de rat.

Laboratoire d'Accueil : **Biologie cellulaire de la Synapse, unité INSERM 1024, Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), Paris.**

Jury composé de :

Madame le Professeur Ann LOHOF	Président
Madame le Docteur Valérie CASTELLANI	Rapporteur
Monsieur le Docteur Fabrice ANGO	Rapporteur
Monsieur le Docteur Jean-Louis BESSEREAU	Examineur
Madame le Docteur Andréa DUMOULIN	Encadrante

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement mes encadrants Andréa Dumoulin et Jean-Louis Bessereau qui ont guidé mes premiers pas dans le monde de la biologie cellulaire et moléculaire, et Antoine Triller pour son accueil dans le laboratoire.

Je remercie chaleureusement Valérie Castellani et Fabrice Ango pour avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse, ainsi que Ann Lohoff pour être la présidente du Jury de thèse.

Merci à mes collègues et amis du laboratoire pour leur aide et leur soutien, et particulièrement Alain, Benjamin, Cécile, Charlotte, Christian, Delphine, Géraldine, Kim, Laetitia, Lorena, Luis, Magali, Marianne, Marie, Patricia, Philippe, Sabrina, Sarrah, Serge, Thomas, Valérie, et Yasmine.

Enfin, merci à ma famille et mes proches.

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION	5
A.	FONCTIONS DES PROTEINES D'ADHESION DANS LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX.	6
1.	Concepts généraux.....	6
2.	Exemples de quelques familles de protéines d'adhésion	10
a)	Neuroligins (Nlg) et Neurexins (Nrx)	11
b)	NGL (Netrin-G Ligand) et Netrin-G	16
c)	SALMs (Synaptic Adhesion-Like Molecule).....	17
d)	LRRTM (Leucin Rich Repeat Transmembrane Protein)	18
e)	Ig CAM (Cell Adhesion Molecules) : L1CAM, NCAM.....	18
f)	Intégrines.....	19
g)	Cadhérines.....	20
B.	IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE FAMILLE DE PROTEINES D'ADHESION A FONCTIONS NEURONALES : LES PROTEINES A DOMAINES CCP (COMPLEMENT CONTROL PROTEIN)	21
1.	Les domaines CCP et le système du Complément	21
2.	Les protéines à domaines CCP avec fonctions neuronales	25
a)	Chez les invertébrés	25
b)	Chez les mammifères	26
3.	Les protéines du système du complément ayant un rôle dans le SNC.	29
C.	SUSD2 et SUSD4 sont des protéines qui peuvent avoir des fonctions intéressantes au sein du SNC.	31
1.	SUSD2 (Sushi Domain containing protein 2)	32
2.	SUSD4 (Sushi Domain containing protein 4)	33
D.	LA CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES D'HIPPOCAMPE DE RAT : UN MODELE D'ETUDE POUR LE DEVELOPPEMENT DU SNC.....	35
II.	ARTICLE « Susd2 »	36

III.	RESULTATS / MATERIEL ET METHODES : SUSD4	37
A.	RESULTATS.....	37
1.	Expression tissulaire de Susd4 (ARNm) dans le tissu	37
2.	Expression de Susd4 dans des cultures primaires de cellules hippocampiques	39
3.	Topologie de SUSD4	43
4.	Effets des modifications d'expression de Susd4 sur le nombre de synapses	45
5.	Effets des modifications d'expression de Susd4 sur la morphologie dendritique	49
B.	MATERIEL ET METHODES	52
IV.	DISCUSSION	54
A.	Expression spatio temporelle de Susd2 et Susd4 dans le système nerveux central.....	54
B.	Clivage de la protéine Susd2	57
C.	Fonction synaptique de Susd2	59
D.	Fonction de régulation de croissance neuritique de Susd2 et Susd4	63
1.	Rôle de Susd2 dans la croissance axonale.....	63
2.	Rôle de Susd2 et Susd4 dans la croissance dendritique.....	66
3.	Rôle de Susd2 dans la régulation différentielle entre croissance axonale et dendritique. ..	68
E.	Interacteurs de Susd2.....	69
V.	CONCLUSION	71
VI.	RESUME.....	72
VII.	BIBLIOGRAPHIE.....	74

I. INTRODUCTION

Le développement cérébral est une succession de plusieurs étapes aboutissant à l'établissement d'un réseau neuronal. Ce réseau, composé de plusieurs milliards de neurones, est extrêmement complexe du fait des multiples variables qui le caractérisent. Citons quelques variables clés pour un neurone donné : sa place exacte au sein du réseau, la morphologie de ses extensions dendritiques, le lieu de projection de son axone, la localisation précise sub cellulaire des contacts (synapses) avec les autres neurones du réseau, la composition moléculaire individuelle de chaque synapse. La précision de la mise en œuvre des étapes du développement cérébral (migration neuronale, dendritogénèse, croissance axonale, synaptogénèse) permet d'aboutir à un réseau fonctionnel. L'orchestration de cette mise en œuvre fait intervenir de nombreux acteurs, notamment des protéines, qui agissent chacun en interaction avec d'autres, en un temps et un lieu déterminé. De nombreux gènes jouant un rôle dans le développement cérébral ont été identifiés. Certains d'entre eux codent pour des protéines d'adhésion localisées à la membrane cellulaire, qui permettent l'interaction des neurones avec l'environnement extra cellulaire (matrice extra cellulaire et autres cellules). L'identification de ces protéines d'adhésion, et l'étude de leur fonction, tient une place majeure dans la compréhension des mécanismes du développement cérébral. Cela est souligné par la description de mutations ou de variants de ces gènes codant pour des protéines d'adhésion au sein de populations de patients souffrant de diverses maladies neuro psychiatriques : le retard mental, l'autisme, la schizophrénie, les troubles de l'humeur (maladie bipolaire), l'épilepsie. Souvent, ces patients n'ont pas d'anomalies évidentes cérébrales à l'imagerie voire même en histologie, suggérant que des anomalies subtiles de l'architecture structurale et/ou moléculaire du cerveau peuvent avoir des conséquences fonctionnelles majeures.

Le temps que j'ai consacré à cette thèse de Biologie m'a permis de caractériser deux nouveaux gènes, *Susd2* et *Susd4*, qui jouent un rôle dans plusieurs aspects du développement neuronal in vitro. Ces gènes codent pour des protéines contenant des domaines CCP (Complement Control Protein), domaines connus depuis longtemps car présents dans de nombreuses protéines d'adhésion participant au système immunitaire du complément et en particulier à sa régulation. Très récemment, des protéines à domaines CCP ont été décrites chez les invertébrés puis chez la souris comme ayant une fonction dans le développement neuronal (*SRPX2* et *SEZ6* chez la souris). Les protéines d'adhésion connues pour participer au développement cérébral sont majoritairement organisées en familles qui partagent un même domaine protéique dominant leur composition structurale, laissant à penser que de nouvelles protéines à domaines CCP sont susceptibles d'y jouer

également un rôle. L'existence de nombreuses protéines prédites avec domaines CCP n'appartenant pas au système du complément, et sans fonction connue, m'ont conduit à tenter de caractériser SUSD2 et SUSD4 qui en font partie.

A. FONCTIONS DES PROTEINES D'ADHESION DANS LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX.

1. Concepts généraux

Les molécules d'adhésion participent à toutes les étapes conduisant à la mise en place de la structure finale du réseau neuronal (migration neuronale, dendritogénèse, croissance axonale, synaptogénèse) ainsi qu'à sa maturation, stabilisation et plasticité. Chacune de ces étapes nécessite l'expression finement régulée dans le temps et dans l'espace de centaines de molécules incluant les protéines d'adhésion. Ces protéines d'adhésion interagissent spécifiquement avec certains partenaires en cis ou en trans (c'est-à-dire, par exemple, qu'une protéine de localisation post synaptique peut interagir avec une protéine respectivement post ou pré synaptique). Elles permettent de stabiliser mécaniquement certaines structures dans leur environnement (synapse, dendrites,...) mais ont des fonctions plus complexes, notamment parce qu'elles sont capables de transduire un signal intra cellulaire à destinations multiples (cytosquelette, calcium, ADN, ...). Depuis l'accumulation importante de connaissances à leur sujet, plusieurs concepts clés ont émergé.

1/ Regroupement en familles protéiques

Ces protéines sont principalement réunies en familles qui partagent des mêmes domaines protéiques : domaines Immunglobuline (Ig) (NCAM, L1CAM, SynCAM), Leucin Rich Repeat (LRR) (SALMs, NGLs, LRRTMs), Cadhérines. Les membres d'une même famille peuvent avoir des fonctions proches qui peuvent être partiellement redondantes avec des différences parfois subtiles, ou au contraire avoir des fonctions bien distinctes, comme peuvent en témoigner des patrons d'expression spatio temporels non chevauchants. La multitude des Cadhérines, du fait de leur interaction homophile, sert par exemple un code combinatoire permettant à différentes populations neuronales de ne pas résider dans une même région cérébrale et participe à la morphogénèse des structures cérébrales (Redies, Hertel, and Hübner 2012). Les différentes SALMs et Neuroligins ont

quasiment toutes un rôle dans la synaptogénèse, mais différent quant à la nature du sous type synaptique où elles exercent leur fonctions : Neuroligin2 et SALM3 par exemple ont un rôle majeur dans la synaptogénèse inhibitrice, que les autres membres de la famille n'ont pas (Krueger et al. 2012; J. Nam, Mah, and Kim 2011). En revanche, une des protéines SALM -SALM1- n'a pas de fonction synaptique clairement identifiée, mais favorise la croissance dendritique et axonale (P. Y. Wang, Seabold, and Wenthold 2008).

2/ Pléiotropie

Il est très fréquent qu'une seule protéine puisse avoir plusieurs fonctions, souvent dans des contextes spatiaux ou temporels différents. Les phénomènes mécanistiques qui sous-tendent la fonction ne sont pas nécessairement les mêmes, avec des interactions protéiques pouvant exister uniquement pour une seule fonction. Par exemple, EphB2, un récepteur tyrosine kinase qui interagit principalement avec les ephrinsB, a été d'abord identifié comme transducteur d'un signal de répulsion dans le cône de croissance d'axones de neurones corticaux, via son interaction directe avec la protéine Pak (Srivastava et al. 2013). Puis son rôle propre dans la synaptogénèse excitatrice a été mis en évidence, avec une fonction de recrutement des récepteurs NMDA via une interaction extra cellulaire directe (Dalva, McClelland, and Kayser 2007).

3/ Redondance

Il semble que les fonctions de nombre de ces protéines soient redondantes avec d'autres membres de la même famille. Ce phénomène est observé notamment lors de l'étude des phénotypes de souris KO pour des gènes codant des protéines d'adhésion. Lorsque un gène est déficient, le phénotype est souvent considéré comme normal, et plusieurs gènes de protéines similaires doivent être invalidés pour produire un phénotype pathologique comme pour les Neuroligins (Piechotta, Dudanova, and Missler 2006) (voir sections suivantes de ce manuscrit pour détails). Autre exemple, la protéine transmembranaire SynCAM de localisation synaptique fut une des premières à démontrer in vitro une activité « synaptogénique », suggérant un rôle majeur dans la synaptogénèse (on définit ici l'effet synaptogénique d'une protéine quand elle suffit à elle seule à induire la formation d'une différenciation pré ou postsynaptique in vitro). Comme pour d'autres gènes, la souris KO ne démontra aucun phénotype neurologique évident (Fujita et al. 2006). Il est donc très probable qu'une fonction aussi cruciale que la synaptogénèse centrale soit servie par plusieurs protéines à fonctions partiellement redondantes, même si cela n'est pas le cas pour la synaptogénèse de la jonction neuromusculaire, complètement désorganisée en l'absence de la protéine Agrin (Gautam et

al. 1996). Cependant, il est également possible que les souris KO sans phénotype pathologique neurologique aient en fait des déficits subtils difficiles à mettre en évidence chez la souris.

4/ Dissemblances entre les phénotypes in vitro et in vivo

L'exemple le plus démonstratif est celui de la fonction in vitro dite « synaptogénique » de certaines protéines d'adhésion, comme précédemment évoqué pour SynCAM (Craig, Graf, and Linhoff 2006). De même, certains gènes codant des protéines d'adhésion ont été invalidés in vitro par ARN interférence, avec obtention d'un phénotype in vitro reproductible suggérant un rôle dans la synaptogénèse, souvent une diminution du nombre de synapses (ex : SALMs, Neuroligins) (Dalva, McClelland, and Kayser 2007). Pourtant in vivo, par exemple pour les souris KO Neuroligin, le nombre de synapses n'est pas modifié (Varoqueaux et al. 2006). Cela ne peut être que partiellement expliqué par la redondance de fonctions des protéines d'adhésion, et démontre les limites des modèles de culture cellulaire pour appréhender certaines fonctions.

5/ Complexité du protéome

Théoriquement, les possibilités de complexifier les modes d'action de ces protéines d'adhésion sont immenses : plusieurs d'entre elles peuvent subir un épissage alternatif augmentant de manière considérable le nombre d'isoformes pouvant être produites à partir d'un seul gène (exemple des Neurexines) (Krueger et al. 2012). Les modifications post traductionnelles, comme la glycosylation et le clivage par des protéases participent également à accroître cette complexité (Weber and Saftig 2012). Les protéases qui clivent une protéine transmembranaire par exemple peuvent à la fois modifier la fonction du fragment transmembranaire restant et libérer une fonction via le fragment sécrété qui pourra agir à distance du site de clivage. Ces deux phénomènes participent aux fonctions de NCAM, par exemple (voir ci-dessous).

6/ Implication dans les maladies neuropsychiatriques

Enfin, l'implication clinique de ces gènes codant pour des protéines d'adhésion a une place importante dans la physiopathologie de certaines maladies neuro psychiatriques dite neuro développementales : la schizophrénie, l'autisme, la maladie bipolaire, l'épilepsie, le retard mental (Hosak 2013; Matsushima et al. 2005; Pandolfo 2013; Raymond and Tarpey 2006; Redies, Hertel, and Hübner 2012; Ye, Liu, and Wu 2010). Quelques uns de ces gènes ont une association de causalité à la maladie. Une délétion de novo de 320 kb incluant le promoteur et les premiers exons du gène Neurexin 1 a été identifiée chez un patient de 7 ans souffrant du syndrome d'Asperger, qui est une forme particulière d'autisme (Friedman et al. 2006). Puis d'autres études ont confirmé l'imputabilité

de Neurexin 1, notamment une étude trouvant chez 4 patients autistes une mutation faux sens dans la région du signal peptide de Neurexin 1 alors qu'il n'y en avait aucune dans une population saine de 535 individus (Feng et al. 2006). Neurexin 1 est aussi impliqué dans la schizophrénie : des délétions de Neurexin 1 comprenant des exons ont été trouvées beaucoup plus fréquemment dans une population de patients schizophrènes en comparaison à une population contrôle (Rujescu et al. 2009). Parmi les interacteurs des Neurexins, Neuroligin 3 est également fortement associé à l'autisme avec notamment une mutation faux sens du domaine estérase identifié dans une famille suédoise avec deux enfants atteints (Jamain et al. 2003). Globalement il est intéressant de constater que parmi les gènes associés à l'autisme, qui est une maladie à fort substrat génétique mais très hétérogène tant en clinique qu'en génétique, les gènes liés aux protéines d'adhésion ont une place prépondérante (Ye, Liu, and Wu 2010). Les autres gènes impliqués sont répertoriés sur le tableau I-1. L1CAM, codant pour une protéine d'adhésion avec domaines Ig like, est responsable d'un syndrome associant un retard mental à des anomalies morphologiques cérébrales et extra cérébrales (Chidsey et al. 2014). Enfin, des mutations de PCDH19, un gène lié à l'X codant pour une protocadhérine, est responsable uniquement chez les femmes d'une épilepsie avec retard mental, mais aussi d'une épilepsie sans atteinte des fonctions cognitives (Depienne et al. 2011; Redies, Hertel, and Hübner 2012).

Gene symbol	Full name	Chromosomal location
Neurexin family		
NRXN1*	Neurexin 1	2p16.3
CNTNAP2*	Contactin associated protein-like 2	7q35-q36
CNTNAP5	Contactin-associated protein-like 5	2q14.3
Neuroigin family		
NLGN1	Neuroigin 1	3q26.31
NLGN3*	Neuroigin 3	Xp22.32-p22.31
NLGN4X*	Neuroigin 4, X-linked	Xq13.1
NLGN4Y	Neuroigin 4, Y-linked	Yq11.221
Ig family		
CNTN3	Contactin 3	3p26
CNTN4	Contactin 4	3p26-p25
NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	7q31.1-q31.2
CADM1	Cell adhesion molecule 1	11q23.2
ROBO1	Roundabout, axon guidance receptor, homolog 1	3p12
ROBO2	Roundabout, axon guidance receptor, homolog 2	3p12.3
ROBO3	Roundabout, axon guidance receptor, homolog 3	11q24.2
ROBO4	Roundabout homolog 4, magic roundabout	11q24.2
Cadherin family		
CDH9	Cadherin 9	5p14.1
CDH10	Cadherin 10	5p14.2
CDH18	Cadherin 18	5p14.3
PCDH9	Protocadherin 9	13q21.32
PCDH10	Protocadherin 10	4q28.3
Integrins		
ITGB3*	Integrin, β_3	17q21.32
ITGA4	Integrin, α_4	2q31.3
Other CAMs		
ASTN2	Astrotactin 2	9q33.1
Genes involved in CAM signaling pathways		
SHANK1	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1	19q13.3
SHANK2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2	11q13.3
SHANK3*	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3	22q13.3
SLC6A4*	Serotonin transporter	17q11.2
LAMB1	Laminin, β_1	7q31.1

Asterisks indicate genes that show strong association with ASD.

Tableau I-1 tiré de (Ye, Liu, and Wu 2010). Gènes codant pour des protéines d'adhésion étant impliqués dans l'autisme. L'astérisque indique une forte association pour ces gènes.

2. Exemples de quelques familles de protéines d'adhésion

Voici un aperçu des données connues concernant quelques grandes familles de protéines d'adhésion impliquées dans le développement cérébral. La famille des Neuroligins et de ses partenaires Neurexins a été de loin la plus étudiée au cours des quinze dernières années pour ses différentes

fonctions au sein de la synapse. Les concepts généraux identifiés au paragraphe précédent sont en partie tirés de l'accumulation des connaissances concernant cette famille de protéines d'adhésion, qui a ce titre est traitée de manière plus approfondie dans ce qui suit.

a) Neuroligins (Nlg) et Neurexins (Nrx)

Ces protéines se sont avérées avoir plusieurs fonctions dans la synaptogénèse, qui est une succession d'étapes nécessaires à l'établissement d'une synapse mature (Lisé and El-Husseini 2006) :

1/ Priming de la terminaison axonale au voisinage du dendrite cible, suivi du contact entre les deux, probablement médié par des protéines d'adhésion qui assurent une fonction de reconnaissance de cible comme les Cadhérines. Cette fonction permet par exemple la distribution différentielle des contacts synaptiques inhibiteurs des neurones en panier (basket cells) et des neurones étoilés (stellate cells) vers respectivement le segment initial de l'axone et les dendrites des cellules de Purkinje.

2/ Recrutement des protéines pré et post synaptique qui inclut des protéines d'adhésion, des récepteurs ionotropiques et métabotropiques, et des protéines d'échafaudage.

3/ Maturation synaptique, c'est-à-dire l'évolution progressive vers des caractéristiques moléculaires et électrophysiologiques proches de la synapse mature. Ces caractéristiques doivent ensuite être maintenues, ce qui est un processus actif, pour permettre la stabilité du réseau neuronal.

4/ Le processus global de synaptogénèse inclut aussi une étape d'élimination synaptique permettant le modelage progressif de la cartographie des contacts synaptiques. L'activité synaptique a une influence sur le processus d'élimination synaptique.

Les Neurexins (Nrx) ont d'abord été identifiées comme des récepteurs pour l' α -latrotoxine, qui est un venin d'araignée ayant la propriété de déclencher la libération massive de neurotransmetteurs à partir des vésicules pré synaptiques (Ushkaryov et al. 1992). Les Neuroligins (Nlg) ont été ensuite identifiées comme des protéines interagissant avec les Nrx (Ichtchenko et al. 1995). Nlg1 a pu être localisé dans la post synapse excitatrice (Song et al. 1999). Au décours, la découverte de l'effet synaptogénique de Nlg1 a ouvert la voie à de très nombreuses études visant à comprendre le rôle des Nrx et Nlg dans la synaptogénèse.

Les Nlg sont des protéines transmembranaire de type 1 comprenant plusieurs domaines avec un signal peptide clivé, un domaine cholinesterase like (CLD), un domaine transmembranaire, et un court domaine intra cytoplasmique avec un motif de liaison au domaine PDZ (Ichtchenko, Nguyen, and Südhof 1996). Les Nlg sont présentes chez l'humain, le rongeur, la drosophile et C.elegans (Bolliger et al. 2001; Gilbert et al. 2001; Ichtchenko, Nguyen, and Südhof 1996; Ichtchenko et al. 1995; J. Y. Kwon et al. 2004; Paraoanu et al. 2006). Quatre gènes ont été identifiés chez le rongeur, 5 chez l'humain (Bolliger et al. 2001; Ichtchenko, Nguyen, and Südhof 1996). Toutes les Nlg peuvent subir un épissage alternatif sur deux sites, A et B (Ichtchenko, Nguyen, and Südhof 1996; Ichtchenko et al. 1995). Chaque gène Nlg peut donc produire 4 isoformes différentes par épissage alternatif (Boucard et al. 2005; Ichtchenko, Nguyen, and Südhof 1996; Ichtchenko et al. 1995).

Les Nr1 sont le produit de 3 gènes chez les mammifères. Pour chaque gène, deux promoteurs différents peuvent aboutir à la transcription d'un ARNm long codant une α -Nr1 et d'un ARNm court codant une β -Nr1 (Ullrich, Ushkaryov, and Südhof 1995; Ushkaryov et al. 1994). Il a été montré que l'épissage alternatif des Nr1 peut potentiellement aboutir à la production de plus de mille différents isoformes (M Missler, Fernandez-Chacon, and Südhof 1998; M Missler and Südhof 1998). Les Nr1 sont des protéines transmembranaires de type 1 avec en extra cellulaire six domaines LNS séparés par 3 domaines EGF like pour les α -Nr1 alors que les β -Nr1 comportent seulement un domaine LNS (Ushkaryov et al. 1992, 1994). Les deux types de Nr1 ont également un domaine transmembranaire et un court domaine intra cellulaire. Le domaine LNS des β -Nr1 est responsable de l'interaction avec les Nlg via leur domaine CLD.

Les nombreuses possibilités d'isoformes des Nlg et des Nr1 ont fait imaginer la possibilité d'un code combinatoire sous tendant divers aspects de la diversité synaptique. Plusieurs études ont montré que les déterminants majeurs de la sélectivité d'interactions entre isoformes des Nlg et Nr1 sont le site d'épissage SS4 des Nr1 et l'insert B des Nlg. La présence de l'insert B inhibe la liaison entre Nlg1 et α -Nr1; alors que la présence d'un insert en SS4 chez les β -Nr1 affaiblit son interaction avec Nlg1(+B) (Boucard et al. 2005; Tanaka et al. 2011). L'une des fonctions de cette diversité protéique est la spécification de la nature excitatrice ou inhibitrice de la synapse. β -Nr1 (-SS4) favorise la synaptogénèse excitatrice, alors que les α -Nr1 favorisent la synaptogénèse inhibitrice (Chih, Gollan, and Scheiffele 2006; Kang et al. 2008). La cinétique de recrutement des molécules synaptiques est aussi affectée par l'expression différentielle des isoformes (Fu and Huang 2010; H. Lee, Dean, and Isacoff 2010). Enfin, une étude récente a montré que l'insert en SS4 de Nr1 est régulé

différentiellement entre différentes régions cérébrales lors du développement, et aussi que l'activité neuronale favorise la transcription de Nr_x (-SS4) au dépend de Nr_x (+SS4) (Iijima et al. 2011).

L'interaction hétérophilique entre Nr_x et Nlg est également régulée par des mécanismes différents de l'épissage alternatif. La liaison Ngl β-Nr_x est dépendante du calcium, sans que soit compris le rôle in vivo de cette propriété (Ichtchenko et al. 1995). Les Nlg et Nr_x ont des sites de N et O glycosylation, qui participent à la régulation des affinités entre isoformes Nr_x et Nlg : par exemple l'abolition de la N-glycosylation de Nlg1 augmente l'affinité de Nlg1 avec β-Nr_x1 (Comoletti et al. 2003). L'oligomérisation joue également un rôle : les mutations de résidus indispensables à l'oligomérisation de Nlg1 abolissent son interaction avec les β-Nr_x (Comoletti et al. 2003; Dean et al. 2003).

Chez le rongeur, Les 3 Nlg (1 à 3) sont fortement exprimées principalement dans le cerveau (Ichtchenko, Nguyen, and Südhof 1996; Ichtchenko et al. 1995). En immunohistochimie, Nlg1 est exprimé dans les neurones du SNC spécifiquement dans la post synapse excitatrice alors que Nlg2 est principalement localisé aux synapses inhibitrices (Song et al. 1999). Nlg3 est possiblement exprimé également dans les cellules gliales (Gilbert et al. 2001). Pendant le développement murin, Nlg1 est faiblement exprimé avant la naissance, puis son expression augmente entre 1 et 8 jours après la naissance et reste stable au décours jusqu'à l'âge adulte (Song et al. 1999). Cette cinétique est compatible avec une fonction dans la synaptogénèse qui est très active pendant cette période suivant la naissance. PSD95 et d'autres protéines synaptiques ont la même cinétique d'expression (Petralia et al. 2005). Nr_x1 et Nr_x2 sont sélectivement exprimés dans le cerveau, alors que Nr_x3 a une expression ubiquitaire (Occhi et al. 2002). Les Nr_x sont principalement localisées à la membrane présynaptique (Südhof 2008). A la différence des Nlg, les Nr_x sont détectés dès E10 avec une augmentation progressive de leur expression avec le développement du SNC, suggérant un rôle développemental plus précoce (Püschel and Betz 1995).

En plus des Nlg, les Nr_x interagissent avec d'autres protéines synaptiques comme les dystroglycans ou les Neurexophilines sans implication fonctionnelle connue à ce jour (Südhof 2008). Plus récemment, les LRRTMs ont été identifiés comme partenaires de Nr_x1, avec une affinité de liaison identique à celle mesurée entre Nlg et Nr_x. C'est via une interaction en trans avec Nr_x que LRRTM2 promeut la synaptogénèse excitatrice (Ko et al. 2009; de Wit et al. 2011). La Cerebellin 1 precursor protein (Cbln1), protéine sécrétée ayant un rôle dans la formation de la synapse excitatrice entre les fibres parallèles et la cellule de Purkinje, est aussi un ligand récemment identifié de Nr_x (S.-J. Lee et

al. 2012). En intra cellulaire, Nr_x interagit via son domaine PDZ à CASK qui est lié au cytosquelette d'actine, et à Synaptotagmine qui joue un rôle dans l'exocytose des vésicules synaptiques (Biederer and Sudhof 2001; Borg et al. 1999). Le domaine PDZ de Nlg1 interagit avec PSD95 qui est une protéine d'échafaudage de la post synapse excitatrice elle-même en interaction avec de nombreuses protéines synaptiques (Irie et al. 1997). Nlg2 interagit directement, ou via la collybistine, avec la protéine majeure d'échafaudage de la synapse inhibitrice Gephyrin (Poulopoulos et al. 2009).

Les premières expériences visant à comprendre les fonctions des Nlg et Nr_x dans la synaptogénèse ont d'abord été réalisées in vitro dans des cultures primaires de cellules d'hippocampe. La présentation de Nlg1 ou Nlg2 pas des cellules non neuronales est suffisante pour induire une présynapse fonctionnelle au sein des axones en contact. Les vésicules de ces pré-synapses artificielles sont capables de subir une exocytose dépendante de la polarisation du potentiel de membrane (Scheiffele et al. 2000). L'effet synaptogénique de Nlg1 est dépendant de son interaction avec β-Nr_x : l'effet est aboli dans le même système auquel est ajouté de la β-Nr_x soluble visant à empêcher l'interaction trans cellulaire entre Nlg1 et β-Nr_x. Dans le même système de coculture, β-Nr_x exprimé dans des cellules non neuronales induit dans les dendrites au contact la formation de post synapses excitatrices avec recrutement de Nlg1, PSD95, NR1 (Composant du récepteur NMDA), et également inhibitrices avec recrutement de Nlg2 et Gephyrin (Graf et al. 2004). Cependant, β-Nr_x ne recrute pas GluR1 et GluR2 (qui composent le récepteur AMPA) à la synapse excitatrice, ni α et β dystroglycan à la synapse inhibitrice (Graf et al. 2004; C. I. Nam and Chen 2005).

Toujours in vitro dans des cultures primaires d'hippocampe de rat ou souris, la surexpression de Nlg1 ou Nlg2, via l'agrégation de β-Nr_x endogène, induit une augmentation du nombre et de la taille des synapses excitatrices et inhibitrices, et une augmentation du nombre et de la taille des épines dendritiques (Chih, Engelman, and Scheiffele 2005; Dean et al. 2003; Prange et al. 2004; Sara et al. 2005). La diminution d'expression des Nlg par ARN interférence diminue le nombre de synapses excitatrices et inhibitrices (Chih), mais entraîne également un défaut de maturation surtout des synapses inhibitrices qui présentent une altération de leur transmission (Chih, Engelman, and Scheiffele 2005; Levinson et al. 2005). L'agrégation des différentes isoformes de Nlg a un impact sur la nature du recrutement post synaptique : Nlg 1, 3 et 4 s'agrègent principalement avec PSD95 à la synapse excitatrice, alors que Nlg2 s'agrège également avec la Gephyrin à la synapse inhibitrice (Graf et al. 2004). La surexpression de mutants de Nlg1 aussi été étudiée. Notamment, la surexpression de Nlg1 sans domaine de liaison à PDZ (empêchant l'interaction avec PSD95) diminue le nombre et la taille des agrégats de PSD95 et GluR2, et diminue l'amplitude et la fréquence des

mini EPSC (Excitatory Post Synaptic Current) médiés par les récepteurs AMPA, sans modifier la transmission synaptique inhibitrice (C. I. Nam and Chen 2005). Toutes les études in vitro précitées étudiaient les Nlg contenant les deux inserts A et B qui se lient préférentiellement aux β -Nrx. La surexpression de Nlg (-B), qui interagit aussi avec α -Nrx affecte surtout la taille des présynapses et des épines, sans modification notable du nombre de synapses (Boucard et al. 2005).

Dans le cerveau de rat, Nlg1 est localisé aux synapses excitatrices, alors que Nlg2 est localisé aux synapses inhibitrices (Song et al. 1999). La modulation du ratio entre synapses excitatrices et inhibitrices (E/I) via les effets différentiels de Nlg1 et Nlg2 sur le recrutement post synaptique est contrôlée en partie par PSD95. La co expression de PSD95 et Nlg1 abolit l'augmentation attendue du nombre de synapses inhibitrices lorsque Nlg1 est surexprimée seule, ce qui a pour effet d'augmenter le ratio E/I (Prange et al. 2004). L'explication mécanistique est que la surexpression de PSD95 induit le déplacement de Nlg2 des synapses inhibitrices vers les synapses excitatrices (Graf et al. 2004; Levinson et al. 2005). Par contraste, la diminution d'expression de PSD95 par siRNA favorise la localisation de Nlg1 dans les synapses inhibitrices.

Les souris triple KO pour α -Nrx et triple KO pour Nlg ont pu être étudiées. Ces souris meurent à la naissance à cause d'un défaut de transmission synaptique des centres respiratoires (Markus Missler et al. 2003; Varoquaux et al. 2006). Chez le triple KO pour les Nlg, le nombre de synapses n'est pas modifié mais la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique est déficiente (Varoquaux et al. 2006). Chez le triple KO pour α -Nrx, le nombre de synapses inhibitrices est diminué de moitié, alors que le nombre de synapses excitatrices est inchangé, et il existe un défaut d'exocytose des vésicules présynaptiques excitatrices et inhibitrices (Markus Missler et al. 2003). Les α -Nrx sont également nécessaires pour le fonctionnement des récepteurs NMDA mais pas AMPA (Kattenstroth et al. 2004). Une des explications possible pouvant rendre compte de la différence des phénotypes observés in vitro et in vivo est la démonstration qu'in vitro la diminution de Nlg1 au sein d'un neurone n'est responsable d'une diminution du nombre de synapses en contact avec ce neurone uniquement si les neurones voisins ne sont pas déplétés en Nlg1 (H.-B. Kwon et al. 2012).

Les Nlg et Nrx participent également aux fonctions de la synapse mature. Nlg1 est nécessaire à la maintenance de la transmission synaptique médié par les récepteurs NMDA dans l'amygdale (Jung et al. 2010; Juhyun Kim et al. 2008). La délétion de Nlg1 affecte la LTP (Long Term Potentiation) dans les neurones amygdaliens uniquement sur les afférences thalamiques et non corticales. La délétion et la surexpression de Nlg1 affectent aussi la LTP hippocampique en CA1, phénomène corrélé à des

anomalies comportementales des souris avec notamment un déficit d'apprentissage (Blundell et al. 2010; Dahlhaus et al. 2010)

Pour conclure, les Nlg/Nrx ont des rôles multiples partiellement indépendants lors des différentes étapes de la synaptogénèse. La fonction de maturation synaptique est la mieux documentée et comprise. La fonction d'initiation de la synaptogénèse est plus difficile à appréhender du fait de l'absence de phénotype de défaut de connectivité synaptique des souris KO malgré les données in vitro. La découverte ultérieure (voir ci après) d'autres protéines dites synaptogéniques potentiellement partiellement redondantes avec les Nlg/Nrx, qui partagent peut être certaines mêmes voies de signalisation, peuvent expliquer les contradictions des données in vitro versus in vivo. Les possibilités très nombreuses d'interactions transsynaptiques, entre différentes isoformes des Nlg/Nrx et entre les Nlg/Nrx et d'autres protéines d'adhésion, pourraient théoriquement déterminer différentes identités synaptiques. Le rôle de cette diversité moléculaire et d'interactions dans l'élaboration précise de l'architecture des connexions synaptiques est certainement une question scientifique majeure sans réponses claires actuellement.

b) NGL (Netrin-G Ligand) et Netrin-G

NGL-1, 2 et 3 sont des gènes présents uniquement chez les vertébrés, et codent pour des protéines de même structure : ce sont des protéines transmembranaires avec des domaines LRR (Leucine Rich Repeat) extra cellulaires et une partie intra cellulaire contenant un domaine PDZ (Woo, Kwon, and Kim 2009). Les protéines NGL sont principalement exprimées dans le cerveau et sont détectées dans les synapses excitatrices et non inhibitrices en post synaptique (S. Kim et al. 2006). NGL1 et NGL2 interagissent respectivement avec Netrin-G1 et 2, qui sont des protéines ancrées à la membrane présynaptique par une ancre GPI (S. Kim et al. 2006). NGL1 et Netrin-G1 sont impliqués dans la croissance axonale et la migration du cône de croissance des neurones thalamiques (Lin et al. 2003). Les couples NGL Netrin-G 1 et 2 interviennent dans la localisation différentielle sub cellulaire des contacts axones-dendrites en CA1 : lors de l'absence d'expression axonale de Netrin-G1 ou Netrin-G2, les contacts sont dispersés sans localisation spécifique habituelle, dendritique distale ou proximale respectivement (Nishimura-Akiyoshi et al. 2007). La protéine NGL2 participe à la synaptogénèse excitatrice : la diminution de son expression in vitro diminue le nombre de synapses excitatrices formées, et elle possède une fonction synaptogénique pouvant induire une différenciation présynaptique excitatrice (S. Kim et al. 2006). NGL2 forme un complexe avec les

récepteurs NMDA à la synapse, alors que l'agrégation de NGL1 ou 2 sur une surface dendritique induit l'agrégation des récepteurs NMDA et non AMPA (S. Kim et al. 2006). NGL3 n'interagit pas avec Netrin-G mais avec le récepteur tyrosine phosphatase LAR (Leukocyte common Antigen-Related) (Woo, 2009). LAR est détecté dans les neurites et le cône de croissance et est impliqué dans la croissance neuritique (Yang et al. 2005). LAR est aussi détecté dans les synapses excitatrices, et promeut la synaptogénèse excitatrice : La diminution d'expression de LAR diminue le nombre de synapse excitatrices in vitro, de même que la diminution d'expression de son partenaire NGL3 (Woo et al. 2009). LAR et NGL3 sont toutes deux des protéines synaptogéniques induisant in vitro une différenciation respectivement post et pré synaptique excitatrices (Woo et al. 2009).

c) SALMs (Synaptic Adhesion-Like Molecule)

Il existe 5 gènes de cette famille (SALM 1-5), codant pour des protéines transmembranaires de structure similaire avec 6 domaines LRR en extra cellulaire (J. Nam, Mah, and Kim 2011). De manière intéressante, les domaines LRR ont d'abord été étudiés dans des protéines du système immunitaire, comme pour les domaines CCP (voir ci-dessous) (Kobe and Deisenhofer n.d.). Les SALMs existent seulement chez les vertébrés, elles sont fortement exprimées dans le SNC avec un pic d'expression en post natal de 0 à 4 semaines, suggérant une fonction neurodéveloppementale. Les SALMs sont localisées dans les axones et dendrites, SALM1 et 2 étant également enrichies dans la synapse excitatrice, alors que SALM4 est à a fois présente dans la synapse excitatrice et inhibitrice en pré et post synaptique (Ko et al. 2006; Seabold et al. 2008; C.-Y. Wang et al. 2006). SALM1 interagit avec les récepteurs NMDA via PSD95 et non avec les récepteurs AMPA, alors que SALM2 interagit préférentiellement avec les récepteurs AMPA (Ko et al. 2006; C.-Y. Wang et al. 2006). Les SALM2, 3 et 5 favorisent la synaptogénèse excitatrice, et également inhibitrice pour SALM3 et SALM5. SALM2 serait plutôt impliquée dans la maturation synaptique car sa fonction principale est de recruter les récepteurs AMPA qui arrivent tardivement à la synapse, alors qu'elle n'a pas d'activité synaptogénique, contrairement à SALM3 et SALM5 (Ko et al. 2006). En effet, SALM3 et SALM5 peuvent induire une différenciation présynaptique à la fois excitatrice et inhibitrice (Mah et al. 2010). Lorsque SALM3 est agrégé artificiellement dans le compartiment dendritique, cela induit l'agrégation de PSD95 permettant le recrutement des protéines post synaptiques excitatrices (Mah et al. 2010). SALM5, qui n'a pas de motif de liaison au domaine PDZ et n'interagit donc pas avec PSD95, ne recrute pas de protéines post synaptiques comme le fait SALM3. Les 5 SALMs ont également des fonctions autres que synaptiques, puisqu'elles favorisent la croissance neuritique à la fois des

dendrites et de l'axone, comme l'ont montré des expériences de diminution d'expression et de surexpression en culture (P. Y. Wang, Seabold, and Wenthold 2008).

d) LRRTM (Leucin Rich Repeat Transmembrane Protein)

Les LRRTMs sont une famille de protéines possédant de multiples domaines LRR, décrite plus récemment que les SALMs, qui ont des fonctions synaptiques. Les 4 gènes LRRTMs existent seulement chez les vertébrés, ont la même composition en domaines (10 domaines LRRs en extra cellulaire, un segment transmembranaire et une partie intra cytoplasmique), et sont fortement exprimés dans le SNC (Ko 2012). LRRTM2 a été identifié en 2009 comme une protéine synaptogénique lors d'un crible, et les 3 autres protéines se sont avérées avoir la même propriété (Linhoff et al. 2009). LRRTM2 est localisée à la synapse excitatrice et absente de la synapse inhibitrice. Sa surexpression et celle de LRRTM1 augmente spécifiquement le nombre de synapses excitatrices. LRRTM2 est un ligand d'isoformes spécifiques des Neurexins, et cette interaction est nécessaire à sa fonction synaptogénique (Ko et al. 2009). Cependant, la diminution d'expression de LRRTM1 et 2 en culture primaire d'hippocampe ne modifie pas le nombre de synapses (Ko et al. 2011). Pour obtenir un phénotype avec une réduction drastique du nombre de synapses excitatrices, il est nécessaire que LRRTM1, 2 et Neuroligin3 aient en même temps une expression diminuée dans des cultures de souris KO pour Neuroligin1, témoignant du phénomène déjà décrit de redondance (Ko et al. 2011). In vivo, sur des tranches d'hippocampe en culture, le phénotype est différent : la diminution d'expression à la fois de LRRTM1 et 2 diminue la transmission synaptique médiée spécifiquement par les récepteurs AMPA (Soler-Llavina et al. 2011).

e) Ig CAM (Cell Adhesion Molecules) : L1CAM, NCAM.

Ces protéines transmembranaires ou attachées à la membrane par une ancre GPI créent des interactions homo ou hétérophiliques et sont responsables d'une stabilisation de l'architecture entre deux structures, mais aussi d'une transduction de signal via des protéines « linker » (Ankyrine, Doublecortine) en relation avec le cytosquelette notamment (Davis, McLaughlin, and Bennett 1993; Hortsch, Nagaraj, and Godenschwege 2009). Il a été montré que L1CAM, via son interaction avec Ankyrin B, promeut la formation des premiers neurites dans des neurones granulaires de cervelet en culture (Nishimura et al. 2003). L'expression de différentes protéines linker qui interagissent avec

L1CAM à différents temps du développement joue un rôle dans la régulation de la neuritogénèse (Gibson n.d.). L1CAM participe également à la mise en place de la topographie précise des projections axonales des cellules ganglionnaires de la rétine vers le colliculus supérieur (Buhusi et al. 2008). Cela a été mis en évidence chez une souris KI avec mutation de L1CAM abolissant l'interaction avec la protéine Ankyrin. NCAM a également des fonctions multiples, régulées notamment par la présence d'un sucre particulier, volumineux, le PSA (acide polysialylé) (Gibson n.d.). NCAM-PSA joue notamment un rôle dans la plasticité synaptique : il est impliqué dans le phénomène de LTP (Long Term Potentiation) étudié dans des tranches d'hippocampe de souris (Senkov et al. 2006). NCAM peut être clivé à la surface membranaire et libérer un fragment dénommé NCAM-EC (Diestel et al. 2005). La souris transgénique surexprimant ce fragment présente plusieurs anomalies comme une dysfonction du phénomène de LTP, et présente des caractéristiques comportementales évoquant des traits schizophréniques (Leann Hinkle Brennaman and Maness 2008). NCAM joue également un rôle dans la croissance et le guidage axonale (P Doherty, Williams, and Williams 2000). Il a notamment été montré que le clivage de NCAM par la métalloprotéase ADAM10 est nécessaire à la répulsion du cône de croissance médié par le récepteur EphA dans des cultures de neurones corticaux (Leann H Brennaman, Moss, and Maness 2014).

f) Intégrines

Les Intégrines fonctionnent en hétéro dimères composés d'une sous unité α et d'une sous unité β (Milner and Campbell 2002). Elles sont exprimées dans différents types cellulaires du SNC dont le neurone, et sont responsables d'interactions entre cellules, et entre cellules et matrice extra cellulaire (MEC). Chez la souris KO pour l'intégrine β 1 spécifiquement au sein des neurones corticaux et de la glie radiaire, l'interaction entre la glie radiaire (qui guide la migration neuronale de la zone périventriculaire vers les différentes couches du cortex) et la membrane basale ne se fait plus, ce qui perturbe gravement la migration des neurones corticaux, qui envahissent la zone marginale de manière anormale (Graus-Porta et al. 2001). Les intégrines ont également un rôle dans la plasticité synaptique : l'inhibition de l'interaction des intégrines avec la MEC dans des tranches d'hippocampe n'altère pas l'induction de la LTP mais empêche son maintien, avec une intensité qui décroît rapidement après l'induction de manière anormale (Stäubli, Chun, and Lynch 1998). Les intégrines participent aussi à la maturation des synapses centrales : leur blocage empêche les modifications physiologiques de la composition en récepteurs de la synapse et des caractéristiques d'exocytose des

vésicules synaptiques (diminution de la quantité en neurotransmetteur par vésicule avec la maturation) (Chavis and Westbrook 2001).

g) Cadhérines

Les cadhérines sont un groupe très important de protéines d'adhésion, avec plus de 100 protéines différentes exprimées dans le SNC (Redies, Hertel, and Hübner 2012). Ce sont des glycoprotéines dont les domaines cadhérine localisés en extra cellulaire sont responsables de la spécificité d'adhésion qui est homophile de manière générale et dépendante du calcium. Le domaine intra cytoplasmique des cadhérines permet une signalisation intra cellulaire via l'interaction avec des protéines comme les caténines qui interagissent avec le cytosquelette. Les cadhérines ont été largement étudiées et participent à la formation de la circuiterie cérébrale à tous les niveaux. Elles ont un rôle probable dans la morphogénèse des structures cérébrales : en général les neurones exprimant la même cadherine se regroupent entre eux et se ségrègent des autres neurones qui n'expriment pas cette cadherine (Redies, Hertel, and Hübner 2012). Par exemple les 6 couches neuronales du néocortex ont une expression différentielle de cadhérines très marquée avec des profils d'expression de cadhérines spécifiques d'une couche (Hertel and Redies 2011). Les cadhérines participent également à la migration neuronale : 4 cadherines (Cadherine 6, 8, 11, et Ncadherine) sont exprimées dans les flux migratoires de neurones cérébelleux, et l'expression de deux constructions dominantes négatives pour Ncadherin et cadherin11 ralentissent ce flux migratoire (Taniguchi et al. 2006). Les cadherines ont aussi un profil d'expression spécifique de certains circuits suggérant une fonction dans le ciblage axonal. Par exemple, les modifications d'expression de Ncadherine dans les régions cibles des neurones de la rétine chez le poulet induisent des erreurs de reconnaissances de cibles (Yamagata and Sanes 1995). Enfin les cadhérines, présentes à la synapse, ont également une fonction synaptique. Ncadherine régule la morphogénèse et la densité des épines dendritiques (Togashi 2002), participe à la stabilisation des épines dendritiques liées à l'activité synaptique (Mendez 2010), et joue un rôle dans la LTP tardive (Bozdagi et al. 2010; Mendez et al. 2010; Togashi et al. 2002).

B. IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE FAMILLE DE PROTEINES D'ADHESION A FONCTIONS NEURONALES: LES PROTEINES A DOMAINES CCP (COMPLEMENT CONTROL PROTEIN)

A la fois chez les invertébrés et chez les vertébrés, plusieurs gènes codants des protéines avec domaines CCP ont récemment été identifiés comme ayant une fonction dans le développement neuronal. Jusqu'alors les nombreuses protéines connues avec domaines CCP étaient uniquement connues pour participer au système immunitaire dit inné, qu'on appelle système du complément. Avant d'évoquer ces nouvelles protéines neuronales à domaines CCP, je vais brièvement introduire les connaissances acquises concernant les domaines CCP et leur contexte biologique habituel dans le système immunitaire.

1. Les domaines CCP et le système du Complément

Les domaines protéiques CCP (Complement Control Protein) font environ 60 acides aminés, et sont caractérisés par une séquence consensus comprenant notamment 4 cystéines toujours présentes (Kirkitadze and Barlow 2001). Le premier domaine CCP dont la structure en 3D a pu être résolue est le domaine CCP numéro 16 du facteur H (voir figure I-1). Il est constitué de deux feuillets β antiparallèles opposés (sandwich), regroupés dans une forme ovoïde stabilisée par 2 ponts disulfures entre les cystéines 1 et 3 puis 2 et 4 de la séquence primaire. La forme globale du domaine CCP est ovale, les feuillets β étant tous alignés sur le grand axe de l'ovale. Les terminaisons N et C terminales sont chacune à l'opposé du grand axe. Des structures d'autres domaines CCP ont ultérieurement été révélées, mais malgré de discrets changements par rapport au premier module décrit, la forme globale était identique.

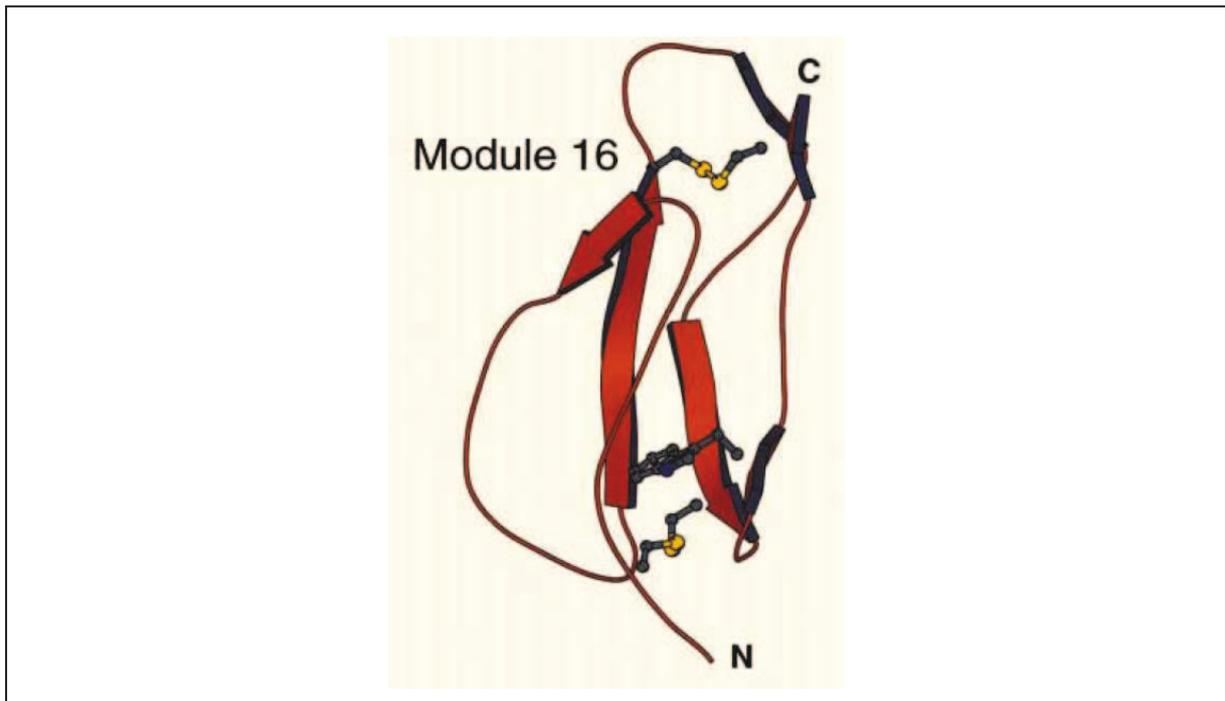


Figure I-1 : Représentation schématique de la structure 3D du domaine CCP numéro 16 du facteur H (Kirkitadze and Barlow 2001)

Les premières protéines décrites contenant des domaines CCP sont les protéines participant au système du complément, dont beaucoup sont plus particulièrement impliquées dans la régulation du complément (Carroll and Sim 2011) (voir encadré I-1 pour les fonctions connues des protéines avec domaine CCP). Le système du complément fait partie de l'immunité innée, ce qui le distingue de l'immunité acquise liée à la génération d'anticorps. Il comprend une quarantaine de glycoprotéines synthétisées par le foie et localisées dans le plasma ou au contact des surfaces cellulaires. Sa fonction est de reconnaître des « particules » étrangères au soi afin de les éliminer via l'opsonisation (marquage moléculaire qui favorise l'internalisation par les cellules phagocytaires) ou la lyse par le complexe d'attaque membranaire (CAM) si la particule possède une bicouche lipidique. La reconnaissance de la particule étrangère au soi peut se faire de différentes façons ce qui donne lieu aux 3 voies d'activation du complément (voie classique, voie alterne, voie des lectines). Une fois une de ces voies activée, une suite d'interactions entre les protéines du complément qui s'activent en cascade permet une amplification du signal initial, la libération par clivage de fragments protéiques qui favorisent la réponse inflammatoire et l'opsonisation, et enfin l'édification d'un complexe multiprotéique (le CAM, fait de fragments de protéines issues de protéines clivées du complément) qui est capable de perforer la bicouche lipidique des bactéries par exemple (Figure I-2).

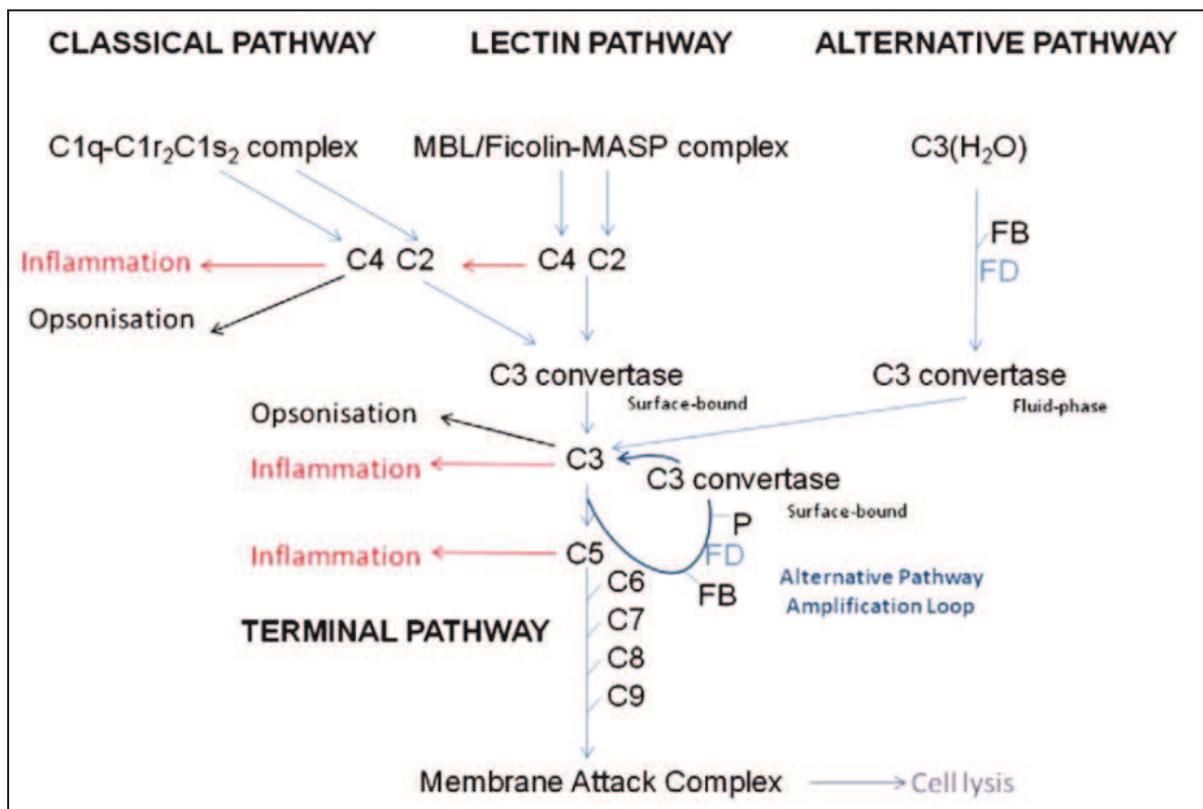


Figure I-2 : Voies du complément (Carroll and Sim 2011)

Du fait de l'autoamplification de la cascade du complément, un système actif de freinage est nécessaire pour le retour à l'état basal après activation du complément. Ces protéines qui régulent l'activité du complément sont : le facteur H, C4b-BP, DAF, MCP, CR1 et CR2. Dans ces protéines, les domaines CCP sont nombreux (parfois plusieurs dizaines d'affilée), très largement majoritaires dans la composition en domaines. Ils participent aux multiples interactions protéiques spécifiques entre les protéines du complément proprement dit et les protéines de régulation du complément (mais aucune interaction entre deux protéines contenant au moins un domaine CCP n'a jamais été décrite ; voir encadré I-2) . A titre d'exemple, le mode d'action du facteur H est double : il peut dissocier un complexe multiprotéique qui est au cœur de la cascade d'activation du complément (C3bBb), et favoriser le clivage de C3b par une protéase (Facteur I).

Protéines de l'espèce Homo Sapiens contenant des domaines CCP classées par fonction

(d'après SMART*)

Complément : C1s, C1r, C2, FB (complement factor B), C6, C7, MASP-1, MASP2.

Régulation du complément : CR1 (complement receptor 1), CR2 (complement receptor 2), C4b-BP DAF (complement decay accelerating factor), FH (complement factor H), FHR1 (complement factor H related protein 1), FHR2, FHR3, FHR4, FHR5, MCP (membrane cofactor protein)

Système immunitaire (autre que complément) : receptor interleukin 15 sous unité alpha, recepteur interleukin 2 sous unité alpha, selectine E, selectine P.

Coagulation : Beta2GP1, Facteur 13 coagulation chaine B, haptoglobine.

Fonction neuronale : GABA-B sous unité 1, SEZ6, SRPX2.

Fonctions inconnues : CSMD1, CSMD2, CSMD3, fibulin 7, SUSD1, SUSD2, SUSD3, SUSD4, SUSD5, PAMR1, PAPP1, PAPP2, Thyroid peroxydase, PGCB, SEZ6L, SEZ6L2, SNED1.

**: SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) est un outil disponible sur le Web, permettant notamment d'identifier des protéines répertoriées dans plusieurs bases de données à partir des domaines protéiques qui la composent (Schultz et al. 1998).*

Encadré I-1

Protéines du complément connues pour interagir directement avec des protéines contenant au moins un domaine CCP (nom de la protéine d'interaction entre parenthèses) :

C2 (C1s)

C3 (CR1, CR2, FH)

C4 (C1s, VCP, CR1, C4BP)

A priori, il n'existe pas de protéines à domaines CCP connue pour interagir directement avec une autre protéine à domaines CCP.

Encadré I-2

2. Les protéines à domaines CCP avec fonctions neuronales

Jusqu'à présent, 4 gènes codant des protéines à domaines CCP ont été étudiés dans le SNC et s'avèrent avoir des fonctions bien caractérisées : 1 chez *Drosophila Melanogaster* (Hig, pour Hikaru Genki), 1 chez *C. elegans* (*lev-9*), et 2 chez le mammifère (Sez6, pour Seizure related gene 6, et Srxp2, pour Sushi –Repeat containing Protein X-linked 2). Après avoir résumé l'état des connaissances concernant ces gènes, j'évoquerai les gènes non caractérisés parfois cités dans la littérature.

a) Chez les invertébrés

(1) Hikaru Genki (Hig)

Hig est un gène de *Drosophila Melanogaster* identifié par un crible génétique, codant une protéine avec 4 domaines CCP (Hoshino et al. 1996). La protéine, Hig, est sécrétée par les terminaisons synaptiques et s'accumule dans la fente synaptique. L'inhibition de son expression à la période embryonnaire précise correspondant à la synaptogénèse aboutit à un phénotype moteur adulte anormal, suggérant un rôle de Hig dans la synaptogénèse.

(2) LEV-9

Lev-9 est un gène qui a été identifié chez *C. elegans* après criblage génétique (Gendrel et al. 2009). *Lev-9* code une protéine sécrétée contenant 8 domaines CCP, localisée à la jonction neuromusculaire de *C. elegans*. LEV-9 forme avec d'autres protéines un complexe extra synaptique permettant l'agrégation à la jonction neuromusculaire des récepteurs à l'acétylcholine. Un clivage protéique en C-terminal est nécessaire à sa fonction d'agrégation des récepteurs (Briseño-Roa and Bessereau 2014). De manière intéressante, le système du complément n'existe pas chez *C. elegans*, suggérant que les protéines à domaines CCP des mammifères sans fonction caractérisée à ce jour pourraient avoir une fonction neuronale indépendante du système du complément.

b) Chez les mammifères

(1) SEZ6, SEZ6L, SEZ6L2

Sez6 code 3 protéines isoformes qui ont la même composition en domaines protéiques, à savoir 3 domaines CUB et 2 domaines CCP (Gunnensen et al. 2007). Les isoformes 1 et 2 sont des protéines transmembranaire de type 1 alors que l'isoforme 3 est une protéine sécrétée. Sez6 a d'abord été identifié comme un gène dont l'expression augmente après traitement de neurones corticaux par une drogue pro épileptogène, le PTZ (Pentylentetrazole) (Shimizu-Nishikawa et al. 1995). Sez6 est exprimé dans les testicules et le SNC avec une expression plus importante pendant la période du développement du SNC, au moment de l'apparition des couches neuronales du néocortex et de l'hippocampe en pré natal (M. H. Kim, Gunnensen, and Tan 2002). La protéine SEZ6 est fortement exprimée dans le cortex en néonatal pendant la première semaine, puis son expression diminue progressivement, ce qui est également observé en immunohistochimie dans le cortex cérébral et dans l'hippocampe (Osaki, Mitsui, and Yuri 2011). Ces données, suggérant un rôle neuro développemental dévolu à Sez6, ont conduit à l'étude du développement neuronal chez la souris KO pour Sez6 (Gunnensen et al. 2007). La souris KO est parfaitement viable et n'a pas de déficit neurologique évident. Le cerveau des souris KO ne présente pas d'anomalies morphologiques de structure du cortex, ni de projections axonales anormales des neurones corticaux de la couche 5. Les neurones corticaux en culture primaire de souris KO pour Sez6 ont une arborisation dendritique anormalement développée, avec une augmentation du nombre de dendrites primaires et secondaires, associée à une diminution de la longueur moyenne des dendrites, et finalement une longueur dendritique totale identique aux neurones Wild Type (WT). Le phénotype in vivo est identique pour les neurones pyramidaux des couches 5 et 6. L'ajout de l'isoforme sécrétée de SEZ6 (SEZ6-3) dans le milieu de culture de neurones corticaux WT augmente le nombre de dendrites totales sauf les primaires. Dans des cultures KO, la surexpression de SEZ6 transmembranaire (SEZ6-2) diminue le nombre de dendrites, alors qu'il augmente lorsque c'est SEZ6-3 qui est surexprimé. In vivo, les dendrites des neurones pyramidaux KO pour Sez6 de la couche 5 du cortex ont moins d'épines dendritiques, une diminution du nombre de synapses excitatrice marquées par PSD95, avec comme traduction électrophysiologique une diminution du potentiel post synaptique évoqué par la stimulation des neurones de la couche 2 et 3. En immunohistochimie, SEZ6 est associé à un

marquage dendritique (MAP2), sans localisation spécifiquement synaptique. Finalement, après analyse fine, la souris KO pour *Sez6* présente des déficits lors de tests moteurs et comportementaux évaluant notamment la mémoire spatiale et les comportements évocateurs de dépression et d'anxiété. *Sez6* a donc un rôle de régulation de l'arborisation dendritique et favorise la synaptogénèse excitatrice. Motopsin, une sérine protéase sécrétée dans la fente synaptique et possédant des domaines protéiques d'adhésion, a été identifiée comme un partenaire de *Sez6* (Mitsui et al. 2013). Motopsin est impliquée dans les fonctions cognitives et le développement cérébral, sa perte de fonction étant responsable d'un retard mental sévère chez l'humain (Molinari et al. 2003).

Enfin, il a été montré que des variants du gène *Sez6* sont retrouvés plus fréquemment dans une population d'enfants présentant des crises convulsives fébriles en comparaison à des contrôles, faisant de *Sez6* un potentiel gène de susceptibilité pour les crise convulsives fébriles (Mulley et al. 2011). Lors d'une étude protéomique sur le LCR de patients psychiatriques, la protéine *Sez6* a été trouvée significativement plus élevée chez les patients que chez les contrôles (Maccarrone et al. 2013).

Deux autres gènes sont similaires à *Sez6*, car ils codent pour des protéines prédites avec exactement la même composition en domaines protéiques : ce sont les gènes *Sez6L* et *Sez6L2*. Aucun n'a de fonction connue. Cependant, un anticorps anti *Sez6L2* a été trouvé chez un patient présentant un syndrome cérébelleux et une rétinopathie, pouvant potentiellement être un anticorps marqueur d'une maladie neurologique dysimmunitaire (Yaguchi et al. 2014). Aussi, des variants de *Sez6L* ont été décrits chez des femmes souffrant de maladie bipolaire (Xu et al. 2013).

(2) SRPX2

Srpx2 est un gène lié à l'X codant une protéine sécrétée contenant uniquement 3 domaines CCP. Il a été identifié initialement chez des patients de deux familles différentes, comme responsable d'un phénotype associant retard mental, épilepsie rolandique, dysphasie, et polymicrogyrie péri sylvienne bilatérale à l'imagerie cérébrale (Roll et al. 2006). Deux mutations ont été identifiées, les deux étant des substitutions, l'une responsable d'un gain de glycosylation. Chez l'Homme, l'ARN messager de *Srpx2* est exprimé dans tous les tissus dont le cerveau en RT-PCR ; en hybridation in situ (HIS) sur cerveau (cortex rolandique), *Srpx2* est uniquement exprimé dans les neurones. Chez la souris, *Srpx2* est exprimé dans différentes régions du cerveau murin adulte en HIS et en immunohistochimie (IHC). Au cours du développement du cerveau de souris, *Srpx2* est exprimé en RT-PCR à partir de E12. En

IHC à PO, SrpX2 est exprimé dans les neurones. L'étude des mutations de SrpX2 en culture montre une distribution intra cellulaire de la protéine altérée suggérant un repliement anormal. Deux autres individus souffrant d'épilepsie rolandique ont récemment été rapportés comme porteurs de mutations de SrpX2 mais ne représentaient qu'un faible pourcentage des patients avec épilepsie rolandique testés (Reinthal et al. 2014).

La recherche d'interacteurs de SRPX2 a permis d'identifier uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor) (Royer-Zemmour et al. 2008). uPAR fait partie d'un système de clivage protéolytique de la matrice extra cellulaire, et son absence chez la souris est responsable d'anomalies de migration et de maturation des interneurons GABAergiques, et d'une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie. D'autres interacteurs ont été trouvés (CTSB et ADMATS4) qui participent également à la protéolyse de la MEC, suggérant un rôle de SrpX2 dans la régulation de systèmes de protéolyse pouvant servir la migration cellulaire. SrpX2 et uPAR semblent régulés par le facteur de transcription FoxP2, qui interagit avec les promoteurs de SrpX2 et uPAR, et inhibe leur expression (Roll et al. 2010). En clinique, les mutations de FoxP2 sont aussi responsables de troubles du langage. Une mutation de FoxP2 trouvée en clinique est responsable de l'absence d'interaction de FoxP2 avec les promoteurs de SrpX2 et uPAR, ayant pour conséquence une augmentation de l'expression des deux protéines SRPX2 et uPAR (Roll et al. 2010).

Un système d'électroporation de shRNA diminuant l'expression de SrpX2 in utero a montré que les neurones corticaux de rat avec diminution d'expression de SrpX2 ont une migration radiale défectueuse avec des anomalies morphologiques cellulaires témoignant d'une absence de polarité (Salmi et al. 2013). Il a ensuite été montré que SrpX2 augmentent le nombre de synapses excitatrices dans des cultures de neurones de cortex de rat (Sia, Clem, and Huganir 2013). En immunocytochimie, SRPX2 colocalise avec des marqueurs de synapse excitatrice. La diminution d'expression de SrpX2 par shARN dans des cultures de neurones diminue le nombre de synapses excitatrices, suggérant que SrpX2 joue un rôle dans la synaptogénèse excitatrice. La surexpression de FoxP2 dans ce système est responsable d'une diminution du nombre de synapses excitatrices, via une diminution de l'expression de SrpX2. Ces résultats ont été confirmés in vivo par électroporation in utero de shRNA ciblant SrpX2.

(3) CSMD1

Csmd1 (CUB and Sushi Multiple Domains 1) est un gène codant pour une protéine transmembranaire de type 1 de grande taille d'environ 400 KDa composé de très nombreux domaines CCP. In vitro,

CSMD1 bloque la voie classique du complément mais pas la voie alterne (Kraus et al. 2006). Csm1 pourrait également avoir une fonction neuronale non liée au complément, car l'ARN et la protéine sont fortement exprimés dans le SNC. Au niveau cellulaire, CSMD1 est enrichie au niveau du cône de croissance axonal. La souris KO pour CSMD1 présente une modification des réponses comportementales avec un émoussement émotionnel, de l'anxiété et de la dépression (Steen et al. 2013). Suite à une étude GWAS (Genome Wide Association Study) comparant des patients schizophrènes à des contrôles, des variants de CSMD1 associés à la schizophrénie ont été identifiés, dont l'allèle A du SNP rs10503253 ("Genome-Wide Association Study Identifies Five New Schizophrenia Loci." 2011). Plusieurs études neuropsychologiques ont ensuite tenté avec succès d'associer ce variant avec des phénotypes neuropsychologiques chez des sujets sains ou schizophrènes : les porteurs du variant ont des déficits de performance cognitive notamment sur la mémoire (Donohoe et al. 2013; Koiliari et al. 2014; Rose et al. 2013). Enfin, une étude des exomes de patients autistes a trouvé plusieurs altérations du gène Csm1 pouvant être impliquées dans la maladie (Cukier et al. 2014).

(4) CSMD3

CSMD3 est une protéine similaire à CSMD1, transmembranaire de type 1, de grande taille, composée de nombreux domaines CCP. Chez l'humain, Csm3 est exprimé principalement dans le cerveau, à l'âge embryonnaire et à l'âge adulte (Shimizu et al. 2003). Deux patients autistes ont été identifiés avec une translocation équilibrée responsable d'une cassure dans une région génomique où se trouve le gène Csm3 (Floris et al. 2008).

3. Les protéines du système du complément ayant un rôle dans le SNC.

Récemment, des protéines du complément et du système immunitaire se sont vues attribuer de nouvelles fonctions, cette fois au sein du SNC. Aucune d'entre elles cependant ne possède de domaine CCP, mais leur étude pourrait être une piste pour tenter de comprendre le mécanisme d'action des protéines à domaine CCP dans le SNC.

Plusieurs protéines connues depuis longtemps pour leur rôle dans le système immunitaire ont récemment été étudiées dans le SNC (Boulanger 2009). Il s'avère de manière étonnante que des protéines comme celles appartenant à la famille du CMH1, des récepteurs du CMH1 (PIRB, DAP12), le TNF alpha, ou l'IL-6, ont une fonction neuronale concernant principalement la formation, le maintien et la plasticité des synapses centrales. Deux protéines du système du complément, C1q et C3, s'ajoutent à cette liste. C1q et C3 ne possèdent pas de domaines CCP, mais comme vu précédemment interagissent avec des protéines de régulation du complément qui ont des domaines CCP. D'autres protéines, comme les pentraxines, ont une similarité structurelle forte avec des protéines connues pour leur fonction dans le système immunitaire. Enfin, DSCAM, une protéine d'adhésion identifiée chez la drosophile et ayant des rôles multiples dans la mise en place du réseau neuronal, a vu secondairement ses fonctions s'étendre du SNC vers le système immunitaire. Toutes ces découvertes ont participé à la mesure de l'importance des fonctions pleiotropiques des protéines dans les organismes vivants. Une des questions actuellement posée est celle des mécanismes d'action de ces protéines dans ces contextes cellulaires aussi différents : il se pourrait qu'ils soient identiques d'un point de vue mécanistique, produisant un effet différent uniquement du fait de la différence d'environnement ; il est également possible qu'une toute autre mécanistique soit mise à l'œuvre, avec par exemple des interactions protéiques qui existeraient uniquement dans un environnement donné.

C1q est la protéine initiatrice de la voie classique du complément, alors que C3 est au cœur de la cascade du complément en aval de C1q (cf. Figure 2). Les souris KO pour C1q ou C3 ont le même phénotype de défaut d'élimination synaptique dans le système reticulogéniculaire (les neurones de la formation réticulaire du tronc cérébral projetant vers les corps géniculés) (Chu et al. 2010). Les neurones des corps géniculés, au lieu de recevoir une seule connexion synaptique forte, en reçoivent une forte et plusieurs faibles. Ce phénotype est en faveur d'un défaut d'élimination structurel mais non fonctionnel des contacts synaptiques non désirés. C1q et C3 joueraient un rôle d'effecteur dans l'élimination synaptique, et non d'instructeur, ce qui présente une analogie avec leur fonction dans le système immunitaire. De ce point de vue, il est possible que C1q et C3 aient un mode d'action identique dans le SNC et le système immunitaire.

Les pentraxines sont des protéines sécrétées jouant un rôle dans la réponse immunitaire humorale, en marquant les cellules qui doivent être phagocytées. Deux pentraxines exprimées dans les neurones ont été identifiées : NP1 et NARP. Les pentraxines neuronales sont détectées aux synapses excitatrices et régulent le nombre de synapses excitatrices dans des modèles in vitro (R. J. O'Brien et

al. 1999; R. O'Brien et al. 2002). Elles sont sécrétées et forment des complexes multimériques entre elles et avec le NPR (Neuronal Pentraxin Receptor). Elles sont capables d'agréger les récepteurs AMPA à la surface d'un neurone ou d'une cellule non neuronale. Les pentraxines neuronales, qui présentent beaucoup de similarité avec les pentraxines du système immunitaires et particulièrement des domaines C-terminaux identiques, sont un exemple de génération de fonction par utilisation des propriétés d'un domaine protéique dans un contexte différent de celui d'origine. Ce type de création de fonction pourrait s'être répandu au cours de l'évolution du fait de l'économie qu'elle génère en terme de temps. C'est un des arguments pour penser que les domaines CCP ont également pu être utilisés de cette façon, motivant la recherche de nouvelles fonctions aux protéines à domaines CCP.

C. SUS D2 et SUS D4 sont des protéines qui peuvent avoir des fonctions intéressantes au sein du SNC.

L'émergence de protéines avec domaines CCP ayant une fonction neuronale développementale d'une part, et d'autre part l'organisation habituelle des protéines d'adhésion neuronales en famille partageant un même domaine protéique, suggèrent que les protéines à domaine CCP non caractérisées pourraient jouer un rôle dans le développement du SNC. A l'aide du logiciel SMART utilisable en ligne (<http://smart.embl-heidelberg.de>), j'ai pu identifier la totalité des protéines à domaines CCP du protéome de la souris incluant celles uniquement prédites sur la base du génome. Parmi ces protéines, onze ne sont pas connues pour faire partie du système du complément et sont détectées dans le cerveau de souris adulte en hybridation in situ sur la base des données du Brain Allen Atlas (<http://www.brain-map.org>). Le Brain Allen Atlas fournit librement des images d'hybridation in situ de cerveau de souris adulte réalisées de manière automatisée, avec à terme le but de rendre disponibles le patron d'expression cérébral de chaque gène du génome murin (Jones, Overly, and Sunkin 2009). Ces protéines sont : SEZ6, SEZ6L, SEZ6L2, SRPX2, SUS D2, SUS D4, SUS D5, CSMD1, CSMD3, PAPP A2, RAMP. Parmi ces onze protéines, j'ai choisi d'étudier les protéines SUS D2 et SUS D4 qui n'avaient alors jamais été caractérisées ni dans le SNC ni ailleurs.

1. SUSD2 (Sushi Domain containing protein 2)

SUSD2 est une protéine transmembranaire de type 1 de 820 acides aminés, comprenant plusieurs domaines N-terminaux impliqués dans des fonctions d'adhésion (VWF, AMOP, SB), un domaine CCP situé au plus proche du domaine transmembranaire, et une partie intra-cytoplasmique C-terminal très courte (voir figure I-3). Susd2 a été identifié initialement comme un gène suppresseur de tumeur potentiel, du fait de sa diminution d'expression dans des cellules transformées tumorigènes (Sugahara et al. 2007). Dans cet article, Sugahara et al. Montrent que Susd2 est exprimé dans de nombreux tissus chez la souris, incluant le cerveau. Les données de l'Allen Brain Atlas montrent que Susd2 est exprimé dans le cerveau adulte de souris dans plusieurs structures incluant l'hippocampe (cornes d'Ammon et gyrus dentelé), bulbe olfactif, cervelet (cellules de Purkinje), cortex, et plusieurs noyaux moteurs du tronc cérébral où l'expression est particulièrement forte (voir figure I-4). Une étude sur lignée cellulaire transfectée confirme que SUSD2 est bien exprimée à la membrane avec les domaines d'adhésion en extra cellulaire, et subit une N-glycosylation et un clivage protéique (Sugahara et al. 2007). Sa surexpression modifie les propriétés adhésives des cellules transfectées, avec une diminution de l'adhésion à la fibronectine, une diminution des capacités de migration cellulaire lors de tests in vitro, et une inhibition de la croissance cellulaire même en suspension. Enfin, Susd2 a été identifié comme un gène de susceptibilité potentiel pour la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) dans une population chinoise de Hans (Deng et al. 2013).

Figure I-3. Représentations schématiques des protéines de rat SUSD2 et SUSD4 selon leur composition en domaines protéiques. Les nombres correspondent à la position du début de chaque domaine sur la séquence primaire en acides aminés (en commençant en N-terminal). Les barres noires correspondent aux domaines transmembranaires. SP : signal peptide ; SB : Somatomedin B ; AMOP : Adhesion associated domain present in MUC4 and Other Proteins) ; VWD : Von Willebrand factor type D domain ; CCP : Complement Control Protein.

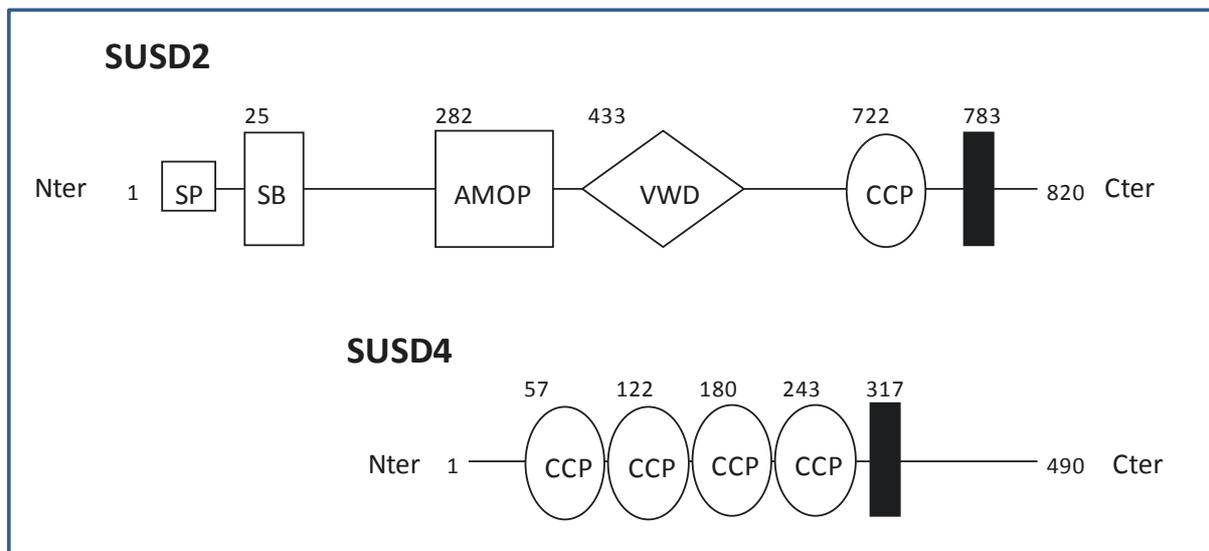


Figure I-3.

2. SUSD4 (Sushi Domain containing protein 4)

SUSD4 est une protéine transmembranaire de type 1 composée uniquement de domaines CCP au nombre de 4 situés en N-terminal (voir figure I-3). Chez la souris, *Susd4* est exprimé dans le cerveau, la moelle épinière, l'œil et les testicules (Tu et al. 2010). Les données de l'Allen Brain Atlas montrent que *Susd4* est exprimé dans le cerveau adulte de souris dans l'hippocampe (cornes d'Ammon et gyrus dentelé), bulbe olfactif, le cervelet (cellules de Purkinje), et le cortex (voir figure I-4). Son étude *in vitro* a montré que *Susd4* augmente l'activité de la voie alterne du complément, mais pas celle de la voie classique (Tu et al. 2010). Son inactivation chez le Zebrafish embryonnaire par des morpholinos est responsable d'anomalies morphologiques développementales. Une autre étude a montré plutôt un profil d'inhibiteur du complément limité à la voie classique et à la voie des lectines (Holmquist et al. 2013). En pathologie, lors d'une étude des CNV (Copy Number Variations) dans une population de patients autistes comparée à des contrôles, un patient présentait une délétion de 100 kb comprenant uniquement le gène *Susd4*, qui n'a pas été retrouvée chez les contrôles (Cuscó et al. 2009). *Susd4* pourrait donc être impliqué dans la physiopathologie de l'autisme. La délétion 1q42q42 a été décrite chez plusieurs patients pédiatriques présentant soit un syndrome de Fryns soit un syndrome de Robinow, qui sont deux syndromes malformatifs différents toujours associés à un retard mental (Mazzeu et al. 2010; Shaffer et al. 2007). La région génomique délétée commune à tous ces patients comprend plusieurs gènes incluant *Susd4*, possiblement impliqué dans ces syndromes génétiques.

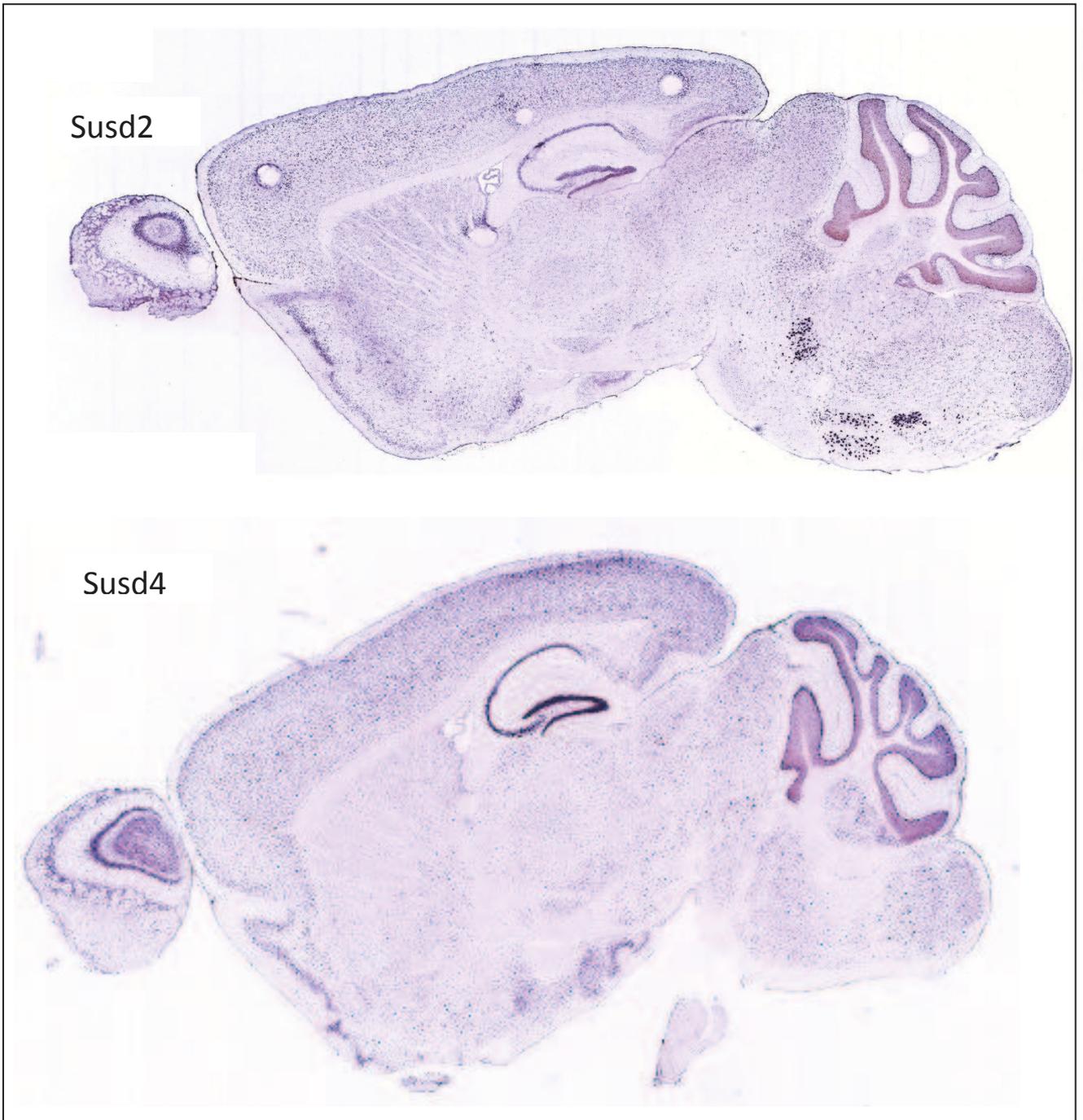


Figure I-4. Images d'hybridation in situ tiré de l'Allen Brain Atlas révélant le patron d'expression de *Susd2* et de *Susd4* dans le cerveau de souris adulte.

D. LA CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES D'HIPPOCAMPE DE RAT : UN MODELE D'ETUDE POUR LE DEVELOPPEMENT DU SNC

La culture primaire de cellules d'hippocampe de rat ou souris est le modèle le plus utilisé pour l'étude des neurones en culture. Il a été caractérisé par Banker et Cowan à la fin des années 70 (Banker and Cowan 1977). Plusieurs questions neuroscientifiques concernant le développement neuronal ont trouvé réponse à l'aide de ce modèle, car lors de la mise en culture, le neurone qui a perdu ses extensions neuritiques va passer par différentes phases développementales bien caractérisées : polarisation à J3 avec apparition d'un axone et de dendrites, interconnexions entre neurones, synaptogénèse (Bartlett and Banker 1984; Deitch and Banker 1993; Dotti, Sullivan, and Banker 1988; Grabrucker et al. 2009). Les caractéristiques morphologiques des neurones, le patron d'expression et la localisation des protéines neuronales semblent identiques à ce qui est connu in vivo, ce qui valide la pertinence du modèle (Garner, Waites, and Ziv 2006). La culture permet de manipuler génétiquement des neurones par des méthodes de transfection, de délivrer facilement des agents pharmacologiques, d'observer les cellules en haute résolution, de faire des enregistrements électrophysiologiques. La synaptogénèse étudiée dans ce modèle de culture a fait l'objet de nombreuses publications, et des protocoles in vitro originaux comme le modèle de co culture ont permis d'accélérer la découverte de protéines à fonction synaptique, ultérieurement caractérisées in vivo. De fait de ses avantages et de son utilisation en routine dans le laboratoire, j'ai donc utilisé ce modèle pour tenter de caractériser les fonctions neuronales de deux nouvelles protéines avec domaines CCP, SUSD2 et SUSD4.

II. ARTICLE « Susd2 »

Ci-après l'article tel que soumis au journal « Molecular and Cellular Neuroscience ». Il fait l'objet d'une numérotation de page indépendante du reste du manuscrit de thèse (de 1 à 27).

**The Susd2 protein regulates neurite growth and excitatory synaptic density in
hippocampal cultures**

Yann Nadjar¹, Antoine Triller, Jean-Louis Bessereau² and Andrea Dumoulin^{*}

Affiliation address:

Ecole Normale Supérieure, IBENS, Inserm U1024, 75005 Paris France

¹ present address:

Département de Neurologie, Hôpital Pitié Salpêtrière, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris
France

² present address:

University Claude Bernard Lyon1, CGphiMC UMR CNRS 5534, 69622 Villeurbanne, France

^{*} corresponding author

Inserm u1024, IBENS
46 rue d'Ulm
Ecole Normale Supérieure
75005 Paris, France

email	andrea.dumoulin@ens.fr
phone	00 33 (0)1 44 32 23 06
fax	00 33 (0)1 44 32 36 54

Abstract:

Complement Control Protein (CCP) domains have adhesion properties and are commonly found in proteins that control the complement immune system. However, an increasing number of proteins containing CCP domains have been reported to display neuronal functions. Susd2 is a transmembrane protein containing one CCP domain. It was previously identified as a tumor-reversing protein, but has no characterized function in the CNS. The present study investigates the expression and function of Susd2 in the rat hippocampus. Characterization of Susd2 during development showed a peak in mRNA expression two weeks after birth. In hippocampal neuronal cultures, the same expression profile was observed at 15 days *in vitro* for both mRNA and protein, a time consistent with synaptogenesis in our model. At the subcellular level, Susd2 was located on the soma, axons and dendrites, and appeared to associate preferentially with excitatory synapses. Inhibition of Susd2 by shRNAs led at 15-16 DIV to decreased numbers of excitatory synaptic profiles, exclusively. Also, morphological parameters were studied on young (5DIV) developing neurons. After Susd2 inhibition, increase in dendritic tree length but decrease in axon elongation were observed, suggesting changes in adhesion properties. Our results demonstrate a dual role for Susd2 at different developmental stages, and raise the question whether Susd2 and other CCP-containing proteins expressed in the CNS could be function-related.

Keywords (6): CCP domain, Sushi, adhesion molecule cleavage, axon elongation, dendritic outgrowth, synapse regulation

ABBREVIATIONS

aa : amino acid(s)

AMOP : adhesion-associated domain in Muc-4 and other proteins

CCP : complement control protein

DIV : days in vitro

HA ; human influenza hemagglutinin

HEK : human embryonic kidney

HRP : horseradish peroxidase

LRR : leucine rich repeat

SCR : short consensus repeat

SO : somatomedin B-like domain

VWD : von Willebrand factor type D domain

INTRODUCTION

In the nervous system, adhesion molecules participate in neuronal migration, neurite outgrowth, synapse formation, maintenance and plasticity, their diversity and patterns of expression allowing the elaboration of complex neuronal networks (Togashi et al. 2009). Altered function of such proteins may lead to neurological developmental disorders (Ye et al. 2010; Redies et al. 2012), reflecting sometimes subtle defects in neuronal circuitry. Adhesion molecules are often part of large protein families, characterized by a specific proteic domain with adhesive properties. This is the case for proteins of the immunoglobulin superfamily, for integrins and N-cadherins, and for the newly identified Leucin Rich Repeat (LRR) superfamily (Linhoff et al. 2009; Nam et al. 2011). Recently, proteins containing the complement control protein (CCP) domain have also been shown to be involved in several aspects of neuronal development in the invertebrate and vertebrate (Nakayama & Hama 2011).

CCP domains, also named Sushi or SCR (for short consensus repeat), contain approximately 60 amino acids and are characterized by a consensus sequence that includes four invariant cysteines participating in an ovoid ternary structure (Schmidt et al. 2008). CCP domains support protein-protein and protein-carbohydrate interactions. They were first identified in a number of plasmatic proteins of the immune system, in particular proteins regulating activation of the complement system (Sjöberg et al., 2009; Trouw & Daha 2011). In *Drosophila*, the *Hikaru genki* gene codes a secreted protein with five CCP domains, identified in a screen for mutants exhibiting reduced locomotion (Hoshino et al. 1996). Location in the synaptic cleft and specific requirement of protein expression during development for correct behavioral phenotype suggested a role in synapse formation. In *C.elegans*, LEV-9, a secreted protein containing eight CCP domains, was shown to localize at the neuromuscular junction and to be necessary for the clustering of nicotinic acetylcholine receptors (Gendrel et al. 2009). In humans, three genes coding CCP-containing proteins were found to be related to clinical conditions: *CSMD1/2*, *Srpx2*, and *Sez6*. *CSMD1/2*

proteins are expressed in the nervous system and were identified as genetic susceptibility factors in schizophrenia (Håvik et al. 2011). *Srpx2* was found to be mutated in two different families suffering from rolandic seizures, mental retardation and speech disorder (Roll et al. 2006). Involvement in migration of cortical neurons in rodents has been suggested for *Srpx2* (Royer-Zemmour et al. 2008) and, more recently, it was demonstrated to regulate excitatory synapse formation and vocalization in mice (Sia et al., 2013). Finally, mutation of the *Sez6* gene was identified as a risk factor for childhood febrile seizures (Yu et al. 2007). Manipulation of *Sez6* protein levels in the mouse cortex was shown to affect dendritic arborization and excitatory synaptogenesis (Gunnarsen et al. 2007). Hence, several CCP-containing proteins expressed in the CNS appear to play a role on its development and/or function.

When considering the expression of CCP-containing proteins in the CNS according to the Allen Brain Atlas (<http://mouse.brain-map.org>) and their described function in the literature, a new candidate gene was identified, of unknown function in the nervous tissue. The *Sushi domain containing 2* (*Susd2*) gene codes a 822 amino acids type 1 membrane protein with one extracellular CCP domain along SO, AMOP and VWD domains. Initial studies suggested a role for *Susd2* as a tumor-reversing gene (Sugahara et al. 2007) which has been more specifically related to breast cancer (Watson et al., 2013). However, Sugahara et al. (2007) also showed *Susd2* expression in the rodent brain. Because *Susd2* mRNA appears to be expressed at high levels in areas of the brain such as the hippocampus (Allen Brain Atlas), we hypothesized that *Susd2* might play a role in the nervous system. Using primary hippocampal cell cultures, we investigated the expression and function of the protein in this model. We show in the present paper that *Susd2* protein levels control neuritic outgrowth and excitatory synapse numbers.

Experimental methods

Construction of vectors

Three RT-PCRs targeting overlapping cDNA fragments of *Susd2* from adult rat hippocampus were necessary to obtain a full-length *Susd2* PCR amplified fragment. Primers used were (from Nter to Cter; 5'-3'): (1) forward GGCAATCTCTGAGCCACTGT, reverse GGAAGTCATCACCCAGATGC; (2) forward GGCCCTCTGGACCAATGAT, reverse CAGAAACATGCCCTTCAGGT; (3) forward TGAACAAAATTGGATGGACCT, reverse GTCAAGGGTGCTGTGGTGT. Full-length *Susd2* was cloned into the mammalian expression vector pEGFP-N1 (Clontech) to obtain a *Susd2*-GFP construct. Full-length *Susd2*, with an insertion of a N-terminal HA tag between the signal peptide and the SO domain, was similarly cloned to obtain the pHA-*Susd2*-GFP construct. ShRNA#1 and shRNA#2 against *Susd2* were obtained according to manufacturer's instructions (pSUPER from Clontech) using the following oligonucleotides: shRNA#1 forward GATCCCCTGGGAACACTCAACGATAATTCAAGAGATTATCGTTGAGTGTTCCCATTTTTG GAAA, shRNA#1 reverse AGCTTTTCCAAAATGGGAACACTCAACGATAATCTCTTG AATTATCGTTGAGTGTTCCCAGGG, shRNA#2 forward GATCCCCTGCGTTCTTGAC GTGATATTCAAGAGATATCACGTCAAGAACGCAGTTTTTGGAAA, shRNA#2 reverse AGCTTTTCCAAA AACTGCGTTCTTGACGTGATATCTCTTGAATATCACGTCAAGAACG CAGGGG.

RT-PCR and quantitative RT-PCR

For standard RT-PCR, total RNA was isolated using the Qiagen mini RNAeasy mini kit. Equivalent amounts of total RNA (800 ng) were reverse-transcribed according to the protocol of Super ScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen). Negative controls were prepared by incubation of samples without reverse transcriptase. Primers used for *Susd2* (5'-3') were: forward CTATGACTCTCGGCCTCTGG, reverse ACTTCAAGCCTTCCTTGTGC; for

GAPDH : forward ACAGCAACAGGGTGGTGGAC, reverse TTTGAGGGTGCAGCGAACTT. PCR was performed with an annealing temperature of 60°C, for 34 cycles, using the manufacturer's instructions (Taq polymerase, New England Biolabs).

To perform quantitative RT-PCR (qRT-PCR), total RNA was isolated from three different Sprague Dawley rat littermates at different developmental stages. qRT-PCRs were performed using the reaction mixture SYBR Green I Master (Roche) in the LightCycler 480 (Roche). *Susd2* mRNA was quantified using *Pgk1* as the reference mRNA. Primers for *Pgk1* (5'-3') were : forward CTGACTTTGGACAAGCTGGACG, reverse GCAGCCTTGATCCTTTGTTA. Efficiency (E) of each primer-specific PCR was calculated using serial dilutions. Crossing point (Cp) values for *Susd2* were normalized to the Cp values of the *Pgk1* control from the same experiment, as follows : $(E_{GAPDH}^{Cp_{GAPDH}})/(E_{target}^{Cp_{target}})$. The size of the PCR products was confirmed on agarose gels.

Western Blot

Transfected HEK cells were collected in Laemmli buffer. Hippocampal cultured cells were resuspended in 50mM HEPES, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA, 1% Triton X-100 and protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Equal amounts of proteins were separated by 12% SDS-PAGE and blotted onto polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Membranes were hybridized with anti-GFP mouse antibody (1:2500, clone JL8, Clontech), anti-HA rat antibody (1:3000, Roche), anti-*Susd2* rabbit antibody directed against extracellular amino acids 545-775 (1:300, gift from Toshiwo Andoh, Tokyo, Japan; Suhagara et al. 2007), and mouse anti-GAPDH antibody (1:3000, clone 6C5, Millipore). HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse (1:50, DAKO) were used as secondary antibodies. Immunoblots were processed with a chemiluminescence detection system (ECL Plus Western Blot Detection Reagent; GE Healthcare).

Coimmunoprecipitation

HEK cells were transfected with pHA-*Susd2*-GFP and resuspended after 24hs in the same

buffer as in the Western blot procedure. After homogenization and centrifugation, the supernatant was diluted in at a final 0.2% Triton-X-100 concentration. The solution was incubated with agarose beads (Chromotek) coated with anti-GFP antibodies at 4°C for 4 hs. After washing, beads were boiled at 95°C in Laemmli buffer to recover the eluate fraction. Immunoprecipitated (IP) and input (IN) samples were then used for Western blotting.

Cell Culture

All research using animals in the present paper was carried according to the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Primary cultures of hippocampal neurons were prepared from E18 rat embryos as described in the literature by Goslin et al. (1998) with some modifications of the protocol. HEK 293 cells were cultured at 37°C in humidified 5% CO₂ incubators in DMEM (Gibco) containing penicillin, streptomycin, glutamin (Gibco) and 10% fetal bovine serum (v/v, Gibco).

Transfection procedure

Primary hippocampal cell cultures were transfected with 0.5-1 µg of total plasmid DNA per 20 mm-well. For transfection of HEK cells, cultures were selected when showing 80% confluence in 9.6 cm² wells and transfected with 2.5 µg of total plasmid DNA per well. Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used for transfection of both neurons and HEK cells.

In situ hybridization

In vitro transcription reactions of pGEMT vector (Promega) containing the Susd2 PCR-amplified fragment (see above) and incorporating digoxigenin-conjugated UTP (Digoxigenin11UTP, Roche) were used to obtain sense and antisense riboprobes. Products were purified using probeQuant (GE Healthcare). Hippocampal cells were fixed with paraformaldehyde (4% w/v, Serva Feinbiochemica) in PBS, pH 7.4. In situ hybridization (ISH) was adapted from Schaeren-Wiemers and Gerfin-Moser (1993), and Henrique et al. (1995). For riboprobe detection, an alkaline-phosphatase conjugated anti-digoxigenin

antibody (1:3000, Roche) was used. Each experiment included an antisense control riboprobe.

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed on 4% paraformaldehyde-fixed neurons, as previously described (Charrier et al. 2006). Alternatively, neurons were fixed with chilled methanol (-20°C), followed by a heat-induced epitope retrieval step. This consisted in an incubation at 90°C for 20 min in citrate buffer, pH6, before proceeding to the blocking step. Primary antibodies were: guinea-pig anti-VGLUT1 (1:1000; Millipore), guinea-pig anti-VGAT (1/1000 ; Millipore), rat anti-HA (1:2500 ; Roche), rabbit anti-PSD95 (1:200 ; Abcam), rabbit anti-Susd2 (1:200, see Western blot procedure), rabbit anti-Tau (1:5000; Synaptic Systems), mouse anti-synapsin (1:1000; Synaptic Systems), mouse anti-MAP2 (1:500, clone MAB378 ; Millipore). Secondary antibodies were: DyLight649-conjugated donkey anti-guinea pig (Jackson ImmunoResearch), Dylight649-conjugated goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch), Cy3-conjugated goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch), AlexaFluor594-conjugated goat anti-rat (Invitrogen), and Alexa555-conjugated donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch). For HA-tag immunodetection, living neurons were incubated for 20 min at 37°C with the primary antibody in culture maintenance medium. Following rinses, cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde and further processed.

Image acquisition and quantification analysis.

Images from *in situ* hybridization and 5 DIV hippocampal cell cultures (for the dendritic tree analysis) were acquired using a Leica TCS SP2 upright epifluorescence microscope (25X oil-immersion objective) equipped with a CoolSnap camera (Princeton Instruments). Dendritic morphology was analyzed with NIH ImageJ software and NeuronJ plugin. All other fluorescence experiments were imaged with a spinning-disk microscope (Leica DM5000B; spinning disk CSU10) equipped with a Coolsnap HQ2 CCD camera (Princeton Instruments)

using MetaView software (Molecular Devices). MetaMorph (Molecular Devices) was used for quantification of axonal length. Quantification of synaptic density and colocalization was performed using Matlab (MathWorks) as described in Hennekinne et al. (2013).

Statistical Analysis

Microsoft Excel (Microsoft) was used for data analysis. Synapse colocalization results are presented as percentages. In morphology quantification experiments, raw data was normalized to the corresponding control condition (set arbitrarily at 100), for reasons of culture variability. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (sem), and means were compared using Student's t-test. Differences were considered significant for p values < 0.05 . The number n refers to the number of experiments (or cultures) considered for quantification. Finally, fifteen to thirty neurons were imaged per condition per culture.

RESULTS

Susd2 mRNA expression in tissue and neuronal cultures

To analyze *susd2* expression, we first performed Susd2 RT-PCR from several tissues of adult rat. The *Pgk1* house-keeping gene was chosen as a control since it does not display modification of expression at the studied stages, unlike beta-actin or GAPDH (Boda et al. 2009). Susd2 mRNA was expressed in all tested tissues (muscle, kidney, spleen, lung, liver, testis), brain structures (hippocampus, cerebellum, cortex), and spinal cord (data not shown). An additional, heavier band was observed in the liver. We then investigated the expression of Susd2 in embryonic telencephalon and postnatal hippocampus by qRT-PCR. Susd2 was expressed as early as embryonic day 14 (E14) in the telencephalon and expression levels increased until E19 (figure 1A1). Ratios of Susd2/*Pgk1* levels were 28.7 ± 0.54 and 70 ± 3.5 at E14 and E19, respectively (n=3). In postnatal hippocampus, Susd2 expression strongly increased from postnatal day 1 (P1) to P23 (SUSD2/*Pgk1* ratios: 68.7 ± 12.65 to 308.3 ± 29 ; n=3) and then reached a plateau (figure 1A2).

In vitro expression of Susd2 mRNA was in line with the latter result, since RT-PCR of hippocampal cell cultures showed very low levels at 0 days in vitro (DIV), intermediate levels at 7 DIV, and strong levels at 14, 21 and 28 DIV (figure 1B1). *In situ* hybridization in 15 DIV cultured hippocampal cells showed intense Susd2 mRNA staining in neurons, whereas only very faint staining could be detected in non neuronal cells (figure 1B2). Non neuronal cells (mainly astrocytes in this type of culture) were identified by a negative NeuN staining (not shown). Therefore, Susd2 mRNA expression in culture was almost exclusively neuronal. Our results, both in tissue and cultures, show that this gene is upregulated at the time where a massive increase in synaptic connections is known to occur in the hippocampus.

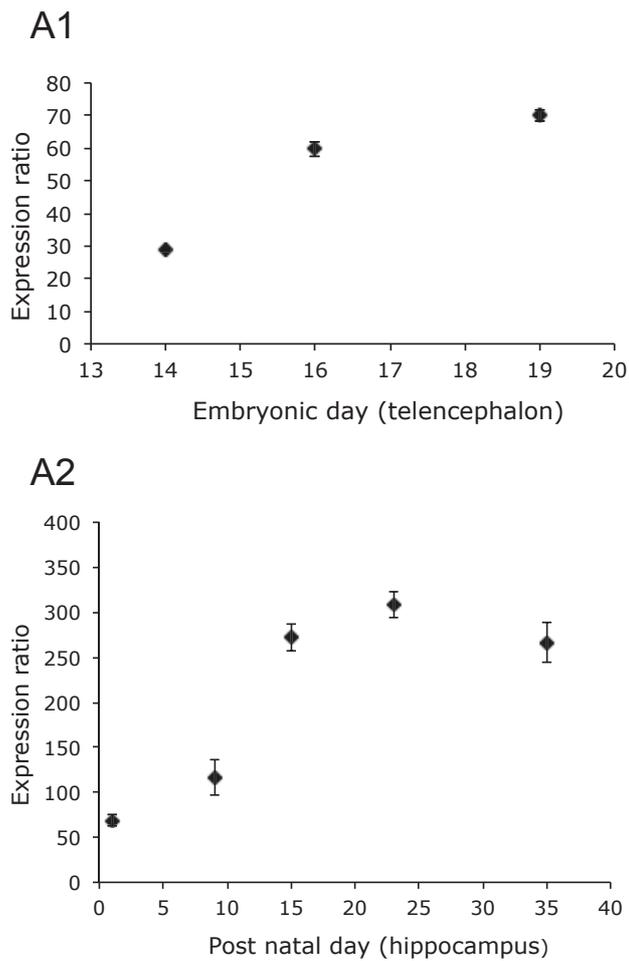


Figure 1. Susd2 mRNA expression in tissue and culture

A: qRT-PCR of rat telencephalon at 3 different embryonic stages (A1) and of postnatal rat hippocampus between 1 and 35 days (A2). Susd2 mRNA levels are expressed as a ratio between the levels of Susd2 and those of Pgk1 (n=3). The expression of Susd2 shows a two-fold increase during embryonic development, and a five-fold increase in the postnatal hippocampus between days 1 and 23. **B:** Susd2 is expressed in hippocampal cell cultures. (B1) Between 0 and 28 DIV, a strong up-regulation is observed between 0 and 14 DIV (RT-PCR; n=2). Levels are stable thereafter. (B2) *In situ* hybridization signal in hippocampal neurons in culture (15 DIV). Susd2 mRNA is strongly detected in neurons (arrows), whereas glial cells appear faintly stained (asterisk). Scale bar: 10 μ m

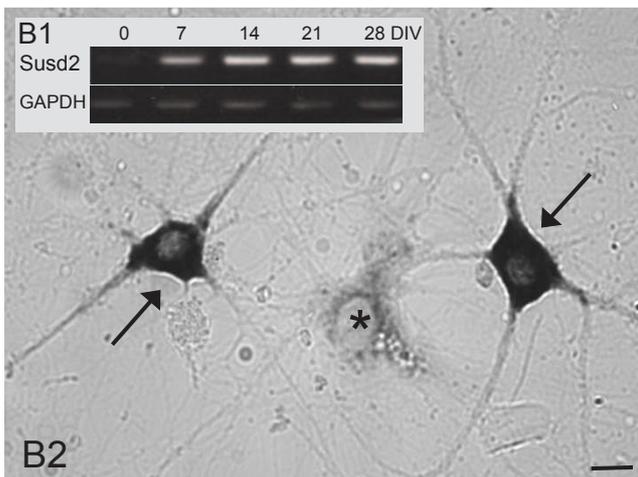


Figure 1
(1 column)

Susd2 protein expression

To assess the expression of the Susd2 protein in hippocampal cultures, we used a rabbit antibody directed against a portion of the extracellular region (Sugahara et al. 2007; see Western blot section). To test whether the antibody recognized the protein in our system, we transfected HEK cells with a pHA-Susd2-GFP construct that expresses the full length protein (822 aa) with a N-term HA tag and a C-term GFP, represented in figure 2A. Western blots from transfected cells lysates showed a main 80 kDa band when using antibodies against GFP or Susd2 (figure 2B), assessing the specificity of the antibody against Susd2. Since the predicted size of the HA-Susd2-GFP recombinant protein is around 117 kDa, the detected size possibly indicates a posttranslational cleavage of the protein, which was also observed by Sugahara et al. (2007) and by Watson et al. (2013) in different systems. Also, a faint series of bands was detected between 120 and 90 kDa when using the anti-GFP antibody. These could correspond to partially cleaved forms and/or different N-glycosylation states of the protein, as demonstrated by Sugahara et al. (2007). We then detected the endogenous Susd2 protein in lysates from hippocampal cultures at different stages (8, 15, and 22 DIV) with the antibody against Susd2 (figure 2C). Two bands around 50-55 kDa were labelled, with a maximal expression at 15 DIV. Again, a mismatch between the predicted molecular weight of the endogenous protein (90 kDa) and its apparent counterpart was observed, indicating that cleavage of the ectodomain probably also occurs *in vivo*.

Recombinant Susd2 protein expression

To further investigate shedding of the protein, we performed a Western blot from HEK cells expressing HA-Susd2-GFP, using antibodies against GFP (targeting the C-term region) or against HA (targeting the N-ter region) for detection (figure 2D). Use of the antibody against GFP resulted as previously in a high intensity band at 80 kDa, and three secondary bands between 100 and 120 kDa. Two of those secondary bands were also present in the anti-HA Western blot, but not the major 80 kDa band. Instead, the major band in the anti-HA blot had a 55 kDa size. Therefore, we can assume that the majority of recombinant

Susd2GFP-HA in HEK cells is cleaved in (at least) two fragments. A final experiment was performed, where the lysate from HA-Susd2-GFP-expressing HEK cells was immunoprecipitated (IP) with the antibody against GFP, and detected with the anti-HA antibody. A major 55 kDa band was retrieved in both input and IP lanes with this protocol (figure 2E). Fainter bands around 100 kDa were also detected in the IP lane. These results indicate an interaction between the C-term and N-term regions of HA-Susd2-GFP. Thus, most of the recombinant protein appears to be cleaved but retains the ability to interact with its cleaved fragment. Partially cleaved forms, secondary cleavage sites and/or different N-glycosylation states of the protein would explain the fainter bands.

Susd2 distribution in hippocampal cultures

Distribution of Susd2 protein was investigated in our cultures with the same antibody as for the Western blots. Only after a heat-epitope retrieval procedure, a staining was observed on soma, dendrites and axon as small clusters distributed on the cell surface (figure 3A). The antibody also detected HA-Susd2-GFP expressed in transfected neurons (figure 3B). In order to further assess the specificity of Susd2 immunodetection, we stained neurons that had been transfected with a short hairpin RNA (shRNA) Susd2 plasmid (shRNA#1), demonstrated to decrease Susd2 expression levels by 92% (see next section). A decrease was observed after immunodetection with the Susd2 antibody on the integrated intensity of the fluorescent signal in the shRNA#1 vs. control pSup condition (-20%, $p=0.017$, $n=2$). However, the number of clusters between the two conditions was not significantly different. We concluded that the antibody, while being adapted to western blot procedures, was not reliable for immunocytochemistry.

For this reason, in the next set of experiments we used neurons transfected for 36hs with low levels of HA-Susd2-GFP (0.5 μ g cDNA/well). Distribution of the HA-Susd2-GFP protein in transfected neurons was assessed by use of an anti-HA antibody on living cells, in order to detect molecules inserted in the plasma membrane only. HA-Susd2-GFP was present in cell body, dendrites and axon. In young neurons (5 DIV), the staining was diffuse

throughout the cell membrane and showed no clusters. In older neurons (15 DIV), diffuse staining was present in the axon, and the somatodendritic staining appeared as aggregates, often within spines, but also on the cell surface and shafts (figure 3C). Co-detection of HA and the synaptic marker synapsin revealed a partial colocalization of the two stainings (figure 3C1-3), including at dendritic spine profiles. Quantification of data from transfected dendrites revealed that $47.6\% \pm 2.05$ of synapsin-positive clusters were associated with (colocalized or within a two-pixel range) HA-positive staining. To assess whether this association was preferential to excitatory or to inhibitory neurons, we double-stained transfected neurons with excitatory (VGLUT1) or inhibitory (VGAT) synaptic markers. An increased proportion of VGLUT1-terminals were associated with HA-staining, as compared with VGAT ones ($56.48\% \pm 3.99$ vs $27.49\% \pm 1.49$, respectively). These results could indicate a preferential distribution of Susd2 at excitatory profiles.

Effects of manipulation of Susd2 expression levels on synapse numbers

As Susd2 expression was increased at both mRNA and protein levels from 15 DIV on and associated with synaptic sites, we sought a synaptic function for Susd2. We first investigated changes in synapse numbers. We designed two specific small hairpin RNAs plasmids (shRNAs) from pSup backbone, each targeting a different part of Susd2 mRNA. To test shRNAs efficiencies, we co-transfected shRNAs and pSusd2-GFP in HEK cells and performed a Western blot using an anti-GFP antibody. Both shRNAs#1 and #2 efficiently decreased Susd2-GFP expression (by 92 and 98%, respectively; figure 4A1) and were subsequently used for Susd2 knockdown experiments. Hippocampal cultures were co-transfected at 9 DIV either with GFP and pSup, or with GFP and shRNAs#1 or #2, and stained at 15-16 DIV for VGLUT1 (figure 4B) or VGAT. Quantification of VGLUT1 clusters was performed on proximal dendrites of GFP-positive neurons (figure 4C). ShRNA-transfected neurons showed decreased numbers of VGLUT1 clusters per dendrite length (72 ± 4.2 , $n=6$ for shRNA#1 and 71 ± 3.8 , $n=3$ for shRNA#2, vs. 100 ± 3.2 for the control ; $p<0,001$ for both shRNAs). No significant change in the number of VGAT clusters was

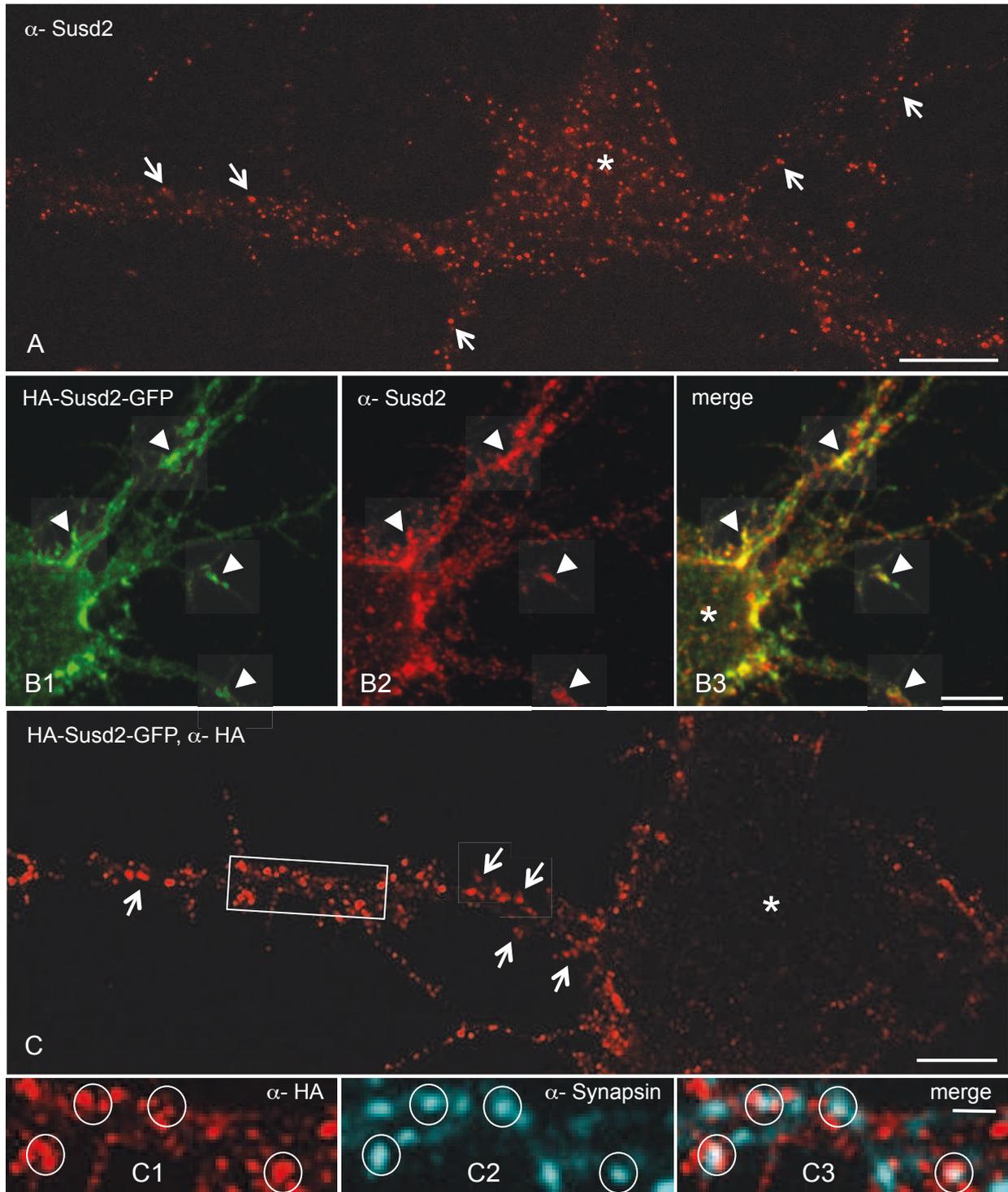


Figure 3
(2 columns)

Figure 3. Endogenous and transfected-Susd2 distribution in hippocampal neurons.

A: Endogenous Susd2 staining appears as small clusters (arrows) on somatic (asterisk) and dendritic compartments in 15 DIV neurons. **B:** The antibody against Susd2 (B2) recognizes the recombinant protein HA-Susd2-GFP (B1) expressed in neurons (9DIV). **C:** Detection in live conditions of the extracellular HA-tag in 15 DIV neurons transfected with HA-Susd2-GFP shows a clustered distribution on dendrites (arrows), including spine-like structures, and around the soma (indicated by an asterisk). **C1-3:** magnification of the inset in C. Co-detection of the synaptic protein synapsin (C2) reveals a high number of colocalized or apposed profiles between synapsin and cell-surface HA-Susd2-GFP (circles) in dendrites. Scale bars: 10 μm in A, 5 μm in B and C, 2 μm in C3

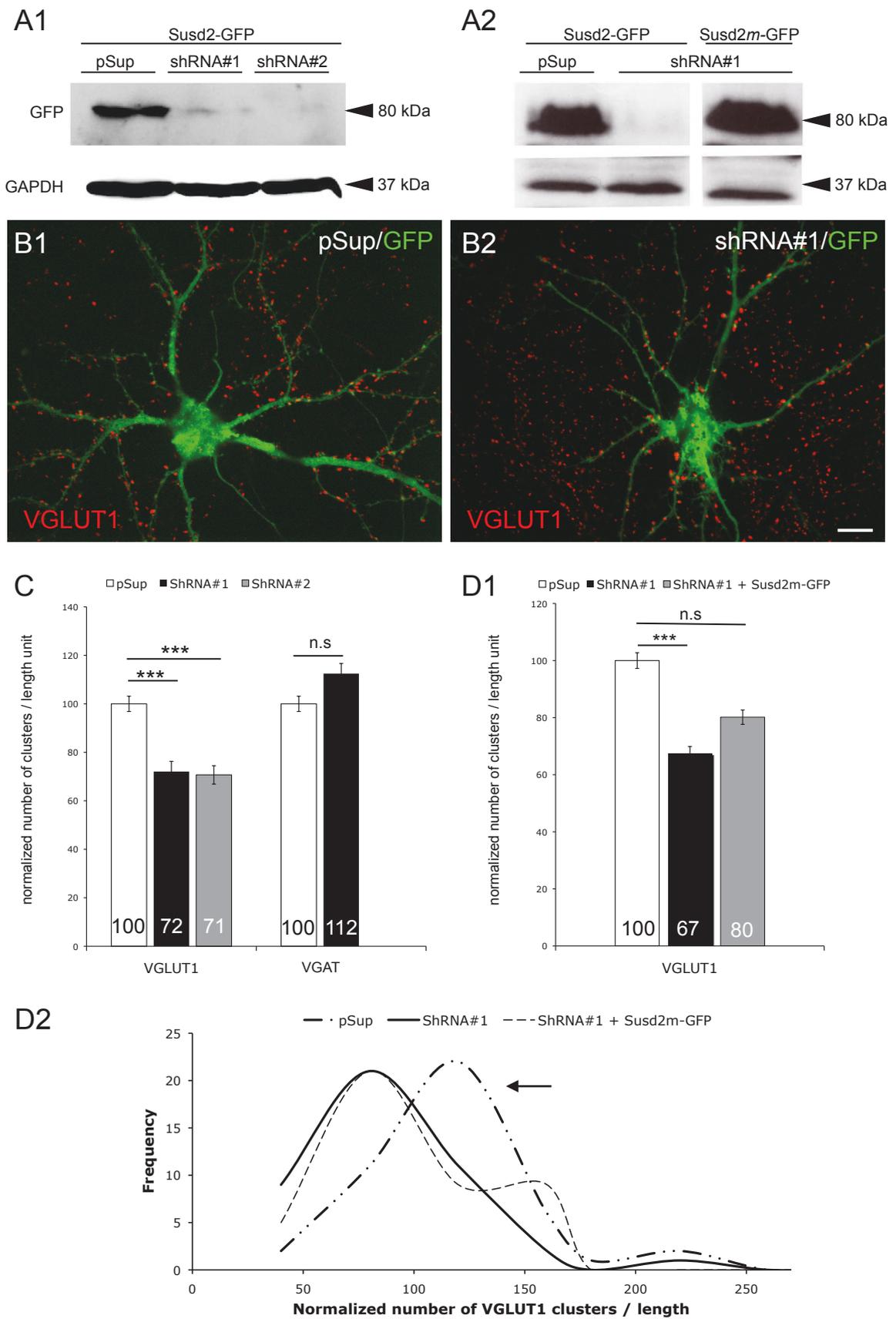


Figure 4
(2 columns)

Figure 4. Effect of *Susd2* shRNA-mediated knockdown on synapses.

A: Detection of *Susd2* in Western blots of lysates from HEK cells expressing different combinations of recombinant proteins, revealed by an antibody against GFP. A1: Western blot from HEK cells expressing *Susd2*-GFP and either pSup (negative control) or shRNAs (#1 and #2). *Susd2*-GFP protein expression was almost abolished by any of the two shRNAs against *Susd2*. A2: Western blot from HEK cells expressing a modified version of *Sud2*-GFP (*Susd2m*-GFP) and either pSup or shRNA#1. *Susd2m*-GFP appears to be resistant to shRNA#1 degradation, as indicated by the band detected at 80 kDA. **B:** Representative images of 15 DIV culture hippocampal neurons expressing cytosolic GFP and pSup (B1) or GFP and shS2#1 (B2), immunostained against the excitatory synaptic marker VGLUT1. In shRNA#1-transfected neurons, less excitatory terminals are observed, as compared with pSup-transfected neurons. **C:** Quantification of synaptic profiles after pSup or shRNA#1 co-transfection with GFP. Normalized numbers of VGLUT1 or VGAT clusters per proximal dendrite length, on neurons expressing pSup, shRNA#1 or shRNA#2 are presented. Inhibition of *Susd2* very significantly decreases the number of VGLUT1 clusters (T-test, $p < 0.001$; 6 cultures for shRNA#1, 3 cultures for shRNA#2). No significant effect of *Susd2* inhibition is observed on inhibitory synapse numbers (T-test, $p = 0.35$; 4 cultures). **D:** Rescue experiment. Co-transfection of *Susd2m*-GFP and shRNA#1 (rescue condition) leads to an increase in the number of VGLUT1-positive profiles on neurons, as compared with GFP and shRNA#1 co-transfection (D1), but lacks to reach significant values (T-test, $p = 0.07$; 3 cultures). Distribution of the number of VGLUT1 cluster per cell in the three conditions (D2) indicates that only a subpopulation of neurons appears to be rescued by *Susd2*GFPm (arrow). For C and D, 15-20 neurons per condition per culture were considered.
scale bar : 10 μ m

demonstrated after shRNA#1 transfection (112 ± 10.3 vs 100 ± 8.1 , $p=0.35$, $n=4$). To assess the specificity of the effect of shRNAs on VGLUT1 cluster numbers, a rescue experiment was carried. Hence, a modified expression vector, pSUSD2m-GFP, was constructed. pSUSD2m-GFP expressed a recombinant protein strictly identical to Susd2-GFP, translated from a mutated mRNA resistant to shRNA#1 degradation (figure 4A2). Neuronal co-transfection with shRNA#1 and Susd2m-GFP was shown to increase numbers of VGLUT1 clusters as compared with neurons co-transfected with shRNA#1 and GFP (figure 4D1; 80.2 ± 5 vs. 67 ± 5.1 ; respectively). However, the rescue was not efficient, since this difference was not significant ($p=0.08$, $n=3$) (figure 4D1). To further investigate the latter result, the distribution of VGLUT1 clusters values in (1) pSup, (2) shRNA#1 and (3) rescue conditions was represented as a cumulative probability plot (figure 4D2). This representation revealed that a subset of neurons was indeed efficiently rescued. Thus, Susd2 is involved in excitatory synapse numbers regulation, but not all neuronal types may be regulated similarly by Susd2. Finally, only inhibition of Susd2 appears to affect synapse numbers, since overexpression of Susd2-GFP induced no significant change as compared with GFP controls ($n=4$, data not shown).

We also investigated the potential synaptogenic properties of Susd2, by testing it in the co-culture paradigm described by Scheiffele et al. (2000) where HEK cells, transfected with the transmembrane protein of interest, act as reservoirs for the co-cultured neurons. Here, HEK cells transfected with Neuroligin-1GFP (gift from Kim Gerrow, Paris) were used as a positive control, which led to a high number of profiles positive for the presynaptic protein synapsin on the surface of HEK cells as detected by immunocytochemistry. On the contrary, no synapsin positive-profiles were detected on HEK cells transfected with Susd2-GFP (data not shown). Susd2-GFP-expressing HEK cells were not able to induce postsynaptic clusters either, since no PSD95 clusters were detected in the dendrites that contacted transfected HEK cells. Thus, Susd2 was not able to induce either pre- nor post-synaptic specializations, indicating that Susd2 is not sufficient to trigger synaptogenesis *per*

se in this assay. Either Susd2 requires interacting partners in this artificial system, or has a role at later stages of synapse formation or stabilisation.

Role of Susd2 on neuritic growth

As adhesion proteins can have pleiotropic effects in neuronal development, we also investigated potential changes of axonal and dendritic growth induced by manipulation of Susd2 expression levels. Hippocampal cells were transfected at 2 DIV either with GFP and control pSup, or with Susd2-GFP, fixed at 5 DIV, and stained for MAP2 or Tau proteins (dendritic and axonal markers, respectively). A striking feature of neurons transfected with Susd2-GFP was the display of particularly long axons, when compared to control neurons (figure 5A). For quantification, the total axon length was measured on GFP fluorescent profiles, either negative for MAP2 or positive for Tau (depending on the culture). Length values were increased in neurons overexpressing Susd2-GFP as compared with GFP-expressing neurons (148.59 ± 7.89 vs 96.57 ± 5.83 , $p < 0.0001$, $n=4$) (figure 5B1). This was correlated with increased numbers in secondary and tertiary axonal branches (4.40 ± 0.35 vs 5.89 ± 0.30 , $p < 0.001$, and 1.85 ± 0.25 vs 2.74 ± 0.27 , $p < 0.01$, respectively). This effect on the axon was not correlated with changes in the dendritic tree morphology, as the number of dendrites, the total dendritic length, and the mean length per dendrite showed no significant difference with the control ($n=3$, data not shown).

We then investigated the effects of Susd2 inhibition. Hippocampal cultures were cotransfected at 2 DIV with GFP and control pSup, or with GFP and shRNA#1 against Susd2, fixed at 5 DIV and immunostained as described previously. The shRNA#1 condition resulted in a decrease of the axonal length of transfected neurons at 5 DIV, as confirmed by quantification of the data (70.4 ± 4.63 vs 99.56 ± 6.42 , $p < 0.001$, $n=3$) (figure 5B1). Axonal branching was also affected and neurons had less secondary and tertiary axonal branches than controls (4.14 ± 0.35 vs 3.01 ± 0.25 , $p < 0.01$, and 1.14 ± 0.18 vs 0.41 ± 0.11 , $p < 0.001$, respectively). Thus, inhibition and overexpression of Susd2 protein have opposite effects on axonal growth. Representation of the data as a cumulative probability plot showed a similar

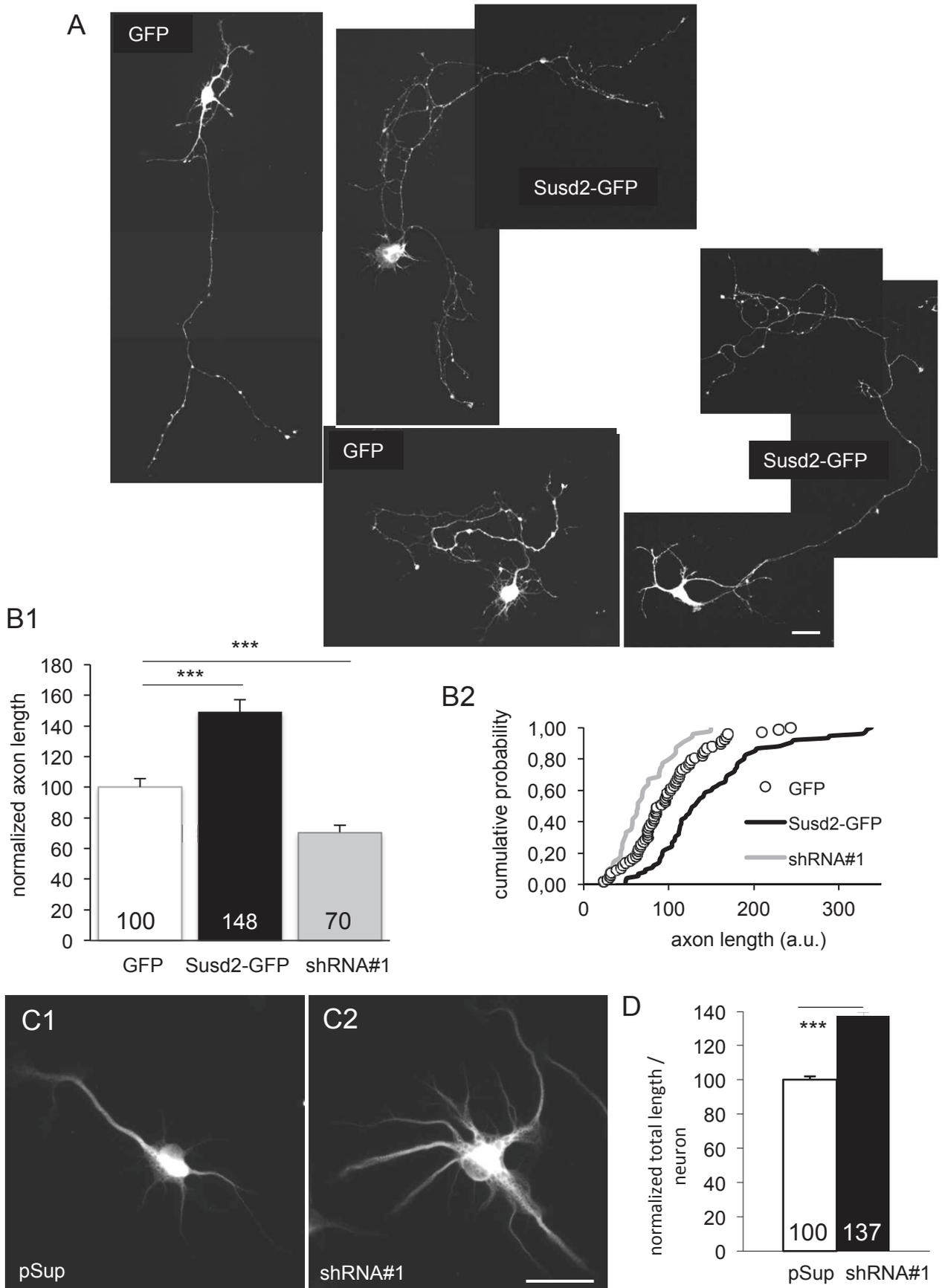


Figure 5
(2 columns)

Figure 5. Effect of Susd2 manipulation on dendritic growth.

A: Representative images of 5 DIV hippocampal neurons transfected with pSup and GFP or with Susd2-GFP, showing longer axonal processes in the Susd2-GFP condition. **B:** Quantitative analysis of axonal length in neurons transfected with pSup/GFP (white), Susd2-GFP (black) or shRNA#1 and GFP (grey); 15-20 neurons per condition per culture were considered. B1: Histograms showing the mean increase (SUSD2-GFP condition, T-test, $p < 0.0001$, 4 cultures) and decrease (shRNA#1 and GFP condition, T-test, $p < 0.001$, 3 cultures) in the total length of the axon, expressed as the mean value normalized to the control condition mean value, for each culture. B2: Cumulative probability plot of the individual values of axon length for the three conditions, showing a similar distribution for all conditions. **C:** Representative images of 5 DIV, MAP2-stained hippocampal neurons transfected with pSup and GFP (C1) or with shRNA#1 and GFP (C2). An increase in the total dendritic length per neuron is observed after inhibition of Susd2 (D; T-test, $p < 0.001$, 3 cultures). 20-30 neurons per condition per culture were considered.
scale bars : 10 μm in A and C

distribution for the three conditions (GFP, Susd2-GFP and shRNA#1), indicating that the axon length of all neuronal populations was similarly affected (figure 5B2).

Another observation in the shRNA#1 condition neurons was a modification in the dendritic tree patterning (figure 5C). Indeed, after Susd2 inhibition, neurons displayed more dendrites (121.7 ± 2.7 vs 100 ± 2.6 , $p < 0,01$) of increased mean length (116.0 ± 2.1 vs 100 ± 2.1 , $p < 0,01$). As a consequence, the total dendritic length per neuron increased of $37\% \pm 5.5$ ($p < 0.001$, $n=3$, figure 5D). This clearly indicates that Susd2 inhibition affects outgrowth in an opposite fashion for dendrites and for axons.

DISCUSSION

The data presented here shows that *Susd2* is expressed during development in the CNS, including in the hippocampus where maximal expression is detected around postnatal day 15. In neuronal hippocampal cultures, manipulation of *Susd2* levels at different culture stages led to modifications of morphological features and to altered numbers of synaptic profiles. Thus, like a number of cell-adhesion molecules, *Susd2* appears to subserve different roles during development.

Shedding of the *Susd2* protein

Western blots of recombinant *Susd2* in HEK cells showed that *Susd2* is mainly cleaved in two fragments that do interact with each other. Shedding of the ectodomain in transmembrane cell adhesion molecules can be involved in cell adhesion and migration, but also in modulation of the synaptic function. Indeed, metalloproteases and γ -secretase-mediated cleavage of synaptic N-cadherin was shown to be a physiologic regulator of synaptic strength (Restituito et al. 2011). In another paradigm, increased cleavage of neuroligin-1 by the metalloprotease ADAM10 was observed as a consequence of the activation of synaptic NMDA receptor, which in turn led to a decrease in spine density (Suzuki et al. 2012). From the present study we cannot conclude whether the cleaved *Susd2* fragment, the transmembrane remaining one, or the complex formed by both, is responsible for the observed effects. The role played by the cleavage of *Susd2* will deserve further attention in the future.

***Susd2* regulates excitatory synapse numbers**

Many of the genes involved in synaptic functions are upregulated at 15 days post partum (Mody 2001, Stead 2006), a stage where high synaptogenic activity is described both *in vivo* and *in vitro* (Grabrucker 2009, Sutor 1995). Temporal expression of *Susd2* fits with this profile; we therefore investigated a potential role for *Susd2* in synapse formation. Negative results of the neuronal/HEK cells cocultures paradigm discarded *Susd2* as a synaptogenic

factor *per se*. However, inhibition of Susd2 in cultured hippocampal neurons transfected with shRNAs against Susd2 showed a decrease in the number of excitatory profiles, exclusively. Susd2 is thus involved not in synapse formation, but in the regulation of a specific population of synapses. This is also the case for SrpX2, another CCP-containing protein, very recently demonstrated to control excitatory synaptic numbers in the cortex both *in vitro* and *in vivo* (Sia et al., 2013). Complementary data obtained in our study showed that Susd2-GFP overexpression did not induce modifications in the numbers of excitatory synapses. Thus, Susd2 appears to be necessary for synapse maintenance in “physiological” conditions, but is not able to trigger the formation nor promote supernumerary synapses when overexpressed. This could be explained if endogenous levels of Susd2 were sufficient to saturate partners binding. In that case, increased concentrations of the protein would not affect synapse physiology.

Involvement of Susd2 in axonal elongation

Neurite extension is an essential feature for proper neuronal function in circuits. Our data demonstrates that Susd2 promotes axonal growth and branching in hippocampal neurons in culture. Several adhesion molecules have been shown to be involved in axon elongation and/or branching regulation. In particular, proteins containing a leucine-rich repeat (LRR) protein-protein interaction motif (Woo et al. 2009). It is the case of SALM2, of the SALM1-5 family, which induces increased numbers of axons and branches (Wang et al., 2008). Another such molecule is neuroligin-1. Two isoforms of neuroligin-1 exist, one transmembrane and one secreted. Surprisingly, the two isoforms exert opposite effects on axonal growth of mouse thalamic neurons (Lin et al., 2003). Although we do not know which domain of Susd2 is responsible for the observed axonal effects, the CCP domain cannot be ruled out, in particular since preliminary data in our laboratory shows that another CCP-containing protein candidate also regulates neurite outgrowth.

Opposite effects of Susd2 in axonal and dendritic growth

It is accepted that growth of the dendritic tree is dependent on the adhesion strength to the substrate, and that conditions of decreased adhesion can favor axon elongation (Chamak & Prochiantz, 1989). In the present work, we observe indeed an opposite modulation of axonal and dendritic elongation after inhibition of Susd2. However, since the lack of Susd2 promotes dendritic outgrowth while decreasing axonal elongation, our results would suggest a negative role for Susd2 in adhesion regulation. Also, growth of axons and dendrites rely on a stability balance between the main cytoskeletal components, namely actin and microtubules, and on their associated proteins. Axon elongation requires stable microtubules and rapid actin turnover, while in dendrites microtubules are more dynamic and the actin cytoskeleton, more stable (Arimura & Kaibuchi 2007; Tahirovic & Bradke 2009). Actually, a PI3K/PIP3 switch between axon elongation and dendrite outgrowth has been proposed (Tahirovic & Bradke 2009). Susd2 could somehow interact with this pathway, and shift the balance towards microtubules stabilisation and/or actin depolymerization.

Dual role of Susd2 during development

Susd2 appears to subserve different roles at different developmental stages in hippocampal neurons. Actually, a number of adhesion molecules have these two types of developmental effects, i.e. neurite outgrowth and synapse remodelling/maintenance. It is the case for the above-mentioned SALMs (Wang et al. 2008) and neuroligin-1 (Lin et al. 2003), but also for N-Cadherin (Redies, 2000, for a review) and Sez-6. Sez-6 is a transmembrane protein containing multiple CUB and CCP domains, expressed in developing and postnatal mouse forebrain (Gunnensen et al. 2007). Sez-6 expression decreases after birth in the cortex and persists in the hippocampus. In a very similar fashion to our results for Susd2, manipulation of Sez6 protein levels in mouse cortex alters dendritic arborization patterns and affects excitability and excitatory synaptic profile numbers (Gunnensen et al. 2007). These results suggest that CCP-containing proteins, present in the CNS and not belonging to the immune system, could be function-related.

The molecular mechanisms leading to the pleiotropic functions described here are still unknown. One possibility is that different proteic domains are involved in different functions, as in the case of N-Cadherin (Williams et al. 2001; Bozdagi et al. 2004). There are three domains in *Susd2* that can ensure adhesion/binding functions: CCP, AMOP and VWD. However, neither AMOP nor VWD domains have been linked so far to neuritic outgrowth or synapse regulation. There is thus a possibility that the CCP domain mediates the two functions simply by interacting with different partners and activating different pathways.

Regarding other adhesion molecules, a common feature to SALMs and neuroligins is an intracellular sequence that allows binding to PDZ domains of interacting synaptic proteins (PSD95, in particular), through which they regulate their synaptogenic or synapse stabilizing effects (Wang et al., 2006; Mah et al., 2010), or even promote axonal growth (Wang et al., 2008). *Susd2* does not possess a PDZ-binding domain identified in the online PDZBase database (<http://icb.med.cornell.edu/services/pdz/start>), and the mechanism by which *Susd2* could act in neurons is unknown. To date, the only molecule shown to interact with *Susd2*, in vitro, is galectin-1 (Ewing et al. 2007; Watson et al. 2013). Galectin-1 is a β -galactoside-binding lectin, expressed in cortex, subventricular zone and hippocampus in the mouse brain. In the latter, galectin-1 is detected in neuronal and non-neuronal cells (Imaizumi et al. 2011). Watson et al. (2013) suggested that *Susd2* (which is glycosylated) could interact with galectin-1 either by acting as a chaperone for galectin-1 to get to the cell surface, or by binding galectin-1 on the cell surface. Further experiments are required to demonstrate whether the interaction with galectin-1 is involved in either of the two functions shown for *Susd2* in the present paper.

CCP-containing proteins in mammalian CNS

After *Sez-6* and *SrpX2*, *Susd2* is a new mammalian gene coding for a CCP-containing protein involved on synapse regulation and / or neurite growth. As CCP domains were initially described in proteins acting in the complement system, identification of CCP-containing proteins playing a role in neuronal development raises the question of the link

between the complement system and neuronal development. Similarly to other proteins that are part of the immune system, proteins from the complement are now thought to be involved in normal neural development (Boulanger, 2009). Recent studies have shown that complement activated products can be related to neurological conditions (Håvik et al. 2011), and also modulate synapse formation during brain development. In particular, C1q was shown to tag synapses for elimination, leading to remodelling of synaptic connections in the developing visual system (Stevens et al. 2007). Also, a complete genetic deficiency of C1q resulted in enhanced circuitry that led to epileptogenesis in mouse models (Chu et al. 2010). However, C1q does not have CCP domains, and its function in synaptic pruning is directly linked to its classic immune activity. Finally, the complement system does not exist in protostomes (Nonaka & Yoshizaki 2004), meaning that synaptic functions described for the CCP domain-containing proteins Hikaru genki in *Drosophila* and LEV9 in *C.elegans* cannot be related to the complement system. This suggests that an ancestral function in CNS, probably related to the synapse, could be devoted to CCP-containing proteins, independently from the involvement in immune functions.

ACKNOWLEDGMENTS

Y. Nadjar was supported by Inserm (Poste d'accueil 2009). This work was funded by the Federation pour la Recherche sur le Cerveau (appel d'offre 2007), Inserm (u1024) and the Ecole Normale Superieure.

BIBLIOGRAPHY

- Arimura, N., Kaibuchi, K., 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 194–205.
- Boda, E., Pini, A., Hoxha, E., Parolisi, R., Tempia, F., 2009. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR studies in mouse brain. *J Mol Neurosci* 37, 238–53.
- Boulanger, L.M., 2009. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 64, 93–109.
- Bozdagi, O., Valcin, M., Poskanzer, K., Tanaka, H., Deanna, L., 2004. Temporally Distinct Demands for Classic Cadherins in Synapse Formation and Maturation. *Mol Cell Neurosci* 27, 509–521.
- Chamak, B., Prochiantz, A., 1989. Influence of extracellular matrix proteins on the expression of neuronal polarity. *Development* 106, 483–491.
- Charrier, C., Ehrensperger, M.V., Dahan, M., Lévi, S., Triller, A. 2006. Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane. *J Neurosci* 26, 8502–8511.
- Chu, Y., Jin, X., Parada, I., Pesic, A., Stevens, B., Barres, B., Prince, D.A., 2010. Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 7975–80.
- Ewing, Rob M, Peter Chu, Fred Elisma, Hongyan et al. 2007. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 3, 89.
- Gendrel, M., Rapti, G., Richmond, J.E., Bessereau, J.L., 2009. A secreted complement-control-related protein ensures acetylcholine receptor clustering. *Nature* 461, 992–996.
- Grabrucker, A., Vaida, B., Bockmann, J., Boeckers, T.M. 2009. Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture. *Cell Tissue Res* 338, 333–341.
- Gunnarsen, J.M., Kim, M.H., Fuller, S.J., De Silva, M., Britto, J.M., Hammond, V.E., Davies, P.J., Petrou, S., Faber, E.S., Sah, P., Tan, S.S., 2007. Sez-6 proteins affect dendritic arborization patterns and excitability of cortical pyramidal neurons. *Neuron* 56, 621–639.
- Håvik, B., Le Hellard, S., Rietschel, M., Lybæk, H., Djurovic, S., Mattheisen, M., Mühleisen, T.W., Degenhardt, F., Priebe, L., Maier, W., Breuer, R., Schulze, T.G., Agartz, I., Melle, I., Hansen, T., Bramham, C.R., Nöthen, M.M., Stevens, B., Werge, T., Andreassen, O.A., Cichon, S., Steen, V.M., 2011. The complement control-related genes CSMD1 and CSMD2 associate to schizophrenia. *Biol Psychiat* 70, 35–42.
- Hennekinne, L., Colasse, S., Triller, A., Renner, M., 2013. Differential control of thrombospondin over synaptic glycine and AMPA receptors in spinal cord neurons. *J Neurosci* 33, 11432–11439.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., 1995. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787–790.
- Hoshino, M., Suzuki, E., Nabeshima, Y., Hama, C., 1996. Hikaru genki protein is secreted into synaptic clefts from an early stage of synapse formation in *Drosophila*. *Development* 122, 589–597.

- Imaizumi, Y., Sakaguchi, M., Morishita, T., Ito, M., Poirier, F., Sawamoto, K., Okano, H., 2011. Galectin-1 is expressed in early-type neural progenitor cells and down-regulates neurogenesis in the adult hippocampus. *Mol Brain* 4, 7.
- Lin, J.C., Ho, W.H., Gurney, A., Rosenthal, A., 2003. The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons. *Nat Neurosci* 6, 1270–1276.
- Linhoff, M.W., Laurén, J., Cassidy, R.M., Dobie, F.A., Takahashi, H., Nygaard, H.B., Airaksinen, M.S., Strittmatter, S.M., Craig, A.M., 2009. An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron* 61, 734–49.
- Mah, W., Ko, J., Nam, J., Han, K., Chung, W. S., Kim, E., 2010. Selected SALM (Synaptic Adhesion-Like Molecule) Family Proteins Regulate Synapse Formation. *J Neurosci* 30, 5559–5568.
- Mody, M., Cao, Y., Cui, Z., Tay, K.Y., Shyong, A., Shimizu, E., Pham, K., Schultz, P., Welsh, D., Tsien, J.Z., 2001. Genome-wide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 8862–8867.
- Nakayama, M., Hama, C., 2011. Modulation of neurotransmitter receptors and synaptic differentiation by proteins containing complement-related domains. *Neurosci Res* 69, 87–92.
- Nam, J., Mah, W., Kim, E., 2011. The SALM/Lrfr family of leucine-rich repeat-containing cell adhesion molecules. *Semin Cell Dev Biol* 22, 492–8.
- Nonaka, M., Yoshizaki, F., 2004. Evolution of the complement system. *Mol Immunol* 40, 897–902.
- Redies, C., 2000. Cadherins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 61, 611–48.
- Redies, C., Hertel, N., Hübner, C.A., 2012. Cadherins and neuropsychiatric disorders. *Brain Res* 1470, 130–44.
- Restituito, S., Khatri, L., Ninan, I., Mathews, P.M., Liu, X., Weinberg, R.J., Ziff, E.B., 2011. Synaptic autoregulation by metalloproteases and γ -secretase. *J Neurosci* 31, 12083–93.
- Roll, P., Rudolf, G., Pereira, S., Royer, B., Scheffer, I.E., Massacrier, A., Valenti, M.P., Roeckel-Trevisiol, N., Jamali, S., et al., 2006. SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum Mol Genet* 15, 1195–1207.
- Royer-Zemmour, B., Ponsole-Lenfant, M., Gara, H., Roll, P., Lévêque, C., Massacrier, A., Ferracci, G., Cillario, J., Robaglia-Schlupp, A., Vincentelli R., Cau, P., Szepetowski, P., 2008. Epileptic and developmental disorders of the speech cortex: ligand/receptor interaction of wild-type and mutant SRPX2 with the plasminogen activator receptor uPAR. *Hum Mol Genet* 17, 3617–3630.
- Schaeren-Wiemers, N., Gerfin-Moser, A., 1993. A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* 100, 431–40.
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., Serafini, T., 2000. Neuroligin expressed in non neuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101, 657–69.

- Schmidt, C.Q, Herbert, A.P., Hocking, H.G., Uhrin, D., Barlow, P.N., 2008. Translational mini-review series on complement factor H: structural and functional correlations for factor H. *Clin Exp Immunol* 151, 14–24.
- Sia, G. M., Clem, R. L., Huganir, R. L., 2013. The Human Language–Associated Gene SRPX2 Regulates Synapse Formation and Vocalization in Mice. *Science* 342, 987–991.
- Sjöberg, A.P., Trouw, L.A., Blom, A.M., 2009. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol* 30, 83–90.
- Stead, J.D.H., Neal, C., Meng, F., Wang, Y., Evans, S., Vazquez, D.M., Watson, S.J., Akil, H., 2006. Transcriptional profiling of the developing rat brain reveals that the most dramatic regional differentiation in gene expression occurs postpartum. *J Neurosci* 26, 345–53.
- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K, Huberman, A.D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A.M., Lambris, J.D., Smith, S.J., John, S.W., Barres, B.A., 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131, 1164–1178.
- Sugahara, T., Yamashita, Y., Shinomi, M., Yamanoha, B., Iseki, H., Takeda, A., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., Kawai, K., Suemizu, H., Andoh, T., 2007. Isolation of a novel mouse gene, mSVS-1/SUSD2, reversing tumorigenic phenotypes of cancer cells in vitro. *Cancer Sci* 98, 900–908.
- Sutor, B., Luhmann, H.J., 1995. Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. *Persp Dev Neurobiol* 2, 409–19.
- Suzuki, K, Hayashi, Y., Nakahara, S., Kumazaki, H., Prox, J., Horiuchi, K., Zeng, M., Tanimura, S., Nishiyama, Y., Osawa, S., Sehara-Fujisawa, A., Saftig, P., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Matsuki, N., Koyama, R., Tomita, T., Iwatsubo, T., 2012. Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 76, 410–422.
- Tahirovic, S., Bradke, F., 2009. Neuronal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, 001644.
- Togashi, H., Sakisaka, T., Takai, Y., 2009. Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adh Migr* 3, 29–35.
- Trouw, L.A., Daha, M.R., 2011. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol. Lett.* 138, 35–7.
- Wang, C.Y., Chang, K., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Seabold, G.K., Wenthold, R.J., 2006. A novel family of adhesion-like molecules that interacts with the NMDA receptor. *J Neurosci* 26, 2174–83.
- Wang, P.Y., Seabold, G.K., Wenthold, R.J., 2008. Synaptic adhesion-like molecules (SALMs) promote neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 39, 83–94.
- Watson, A.P., Evans, R.L., Egland, K.A., 2013. Multiple functions of sushi domain containing 2 (SUSD2) in breast tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 11, 74–85.
- Williams, E.J., Williams, G., Howell, F.V., Skaper, S.D., Walsh, F.S., Doherty, P., 2001. Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J Biol Chem* 276, 43879–43886.

Woo, J., Kwon, S.-K., Kim, E., 2009. The NGL family of leucine-rich repeat-containing synaptic adhesion molecules. *Mol Cell Neurosci* 42, 1–10.

Ye, H., Liu, J., Wu, J.Y., 2010. Cell adhesion molecules and their involvement in autism spectrum disorder. *Neurosignals* 18, 62–71.

Yu, Z.L., Jiang, J.M., Wu, D.H., Xie, H.J., Jiang, J.J., Zhou, L., Peng, L., Bao, G.S., 2007. Febrile seizures are associated with mutation of seizure-related (SEZ) 6, a brain-specific gene. *J Neurosci Res* 85, 166–172.

Allen Brain Atlas, <http://mouse.brain-map.org>

PDZBase database, <http://icb.med.cornell.edu/services/pdz/start>

III. RESULTATS / MATERIEL ET METHODES : SUSD4

A. RESULTATS

1. Expression tissulaire de Susd4 (ARNm) dans le tissu

Dans différents tissus chez le rat adulte, Susd4 est fortement détecté par RT-PCR dans des structures du cerveau (hippocampe, cortex, cervelet), très peu exprimé dans la moelle épinière, le testicule et le poumon, et non détecté dans le muscle, le rein, le foie et la rate (Figure R-1A). En hybridation in situ sur des coupes de cerveau, Susd4 a une expression forte dans 3 structures : le bulbe olfactif (couche des cellules mitrales), le cervelet (marquage des cellules de Purkinje), et l'hippocampe (marquage des cornes d'Ammon et du gyrus dentelé) (Figure R-1, C à H). Ce profil d'expression est proche de celui observé sur le Allen Brain Atlas (<http://mouse.brain-map.org>), et en faveur d'une expression de Susd4 principalement neuronale.

Au cours du développement, l'expression de Susd4 a été étudiée par RT-PCR quantitative dans le télencéphale embryonnaire (E14, E16, E19 ; E : jour embryonnaire) et à différents stades du développement hippocampique post natal (P0, P9, P15, P23, P35 ; P : jour post natal), chez le rat (figure R-1B). J'ai utilisé le gène Pgk1, dont l'expression au cours du développement est stable, contrairement aux gènes GAPDH et Actine habituellement utilisés comme référence, pour normaliser les résultats obtenus avec Susd4 (Boda et al. 2009). Ainsi, la valeur donnée pour quantifier l'expression de Susd4 est un rapport d'expression entre Susd4 et Pgk1. Les résultats montrent que l'expression de Susd4 augmente fortement au cours du développement embryonnaire (d'un facteur 5 entre E14 et E19 : 43 vs. 217), alors qu'elle est globalement stable en post natal (P0=111, P9=134, P15=78, P23=117, P35=69). Le gène Susd4 est donc bien exprimé au niveau de l'hippocampe, et justifie la poursuite de l'étude.

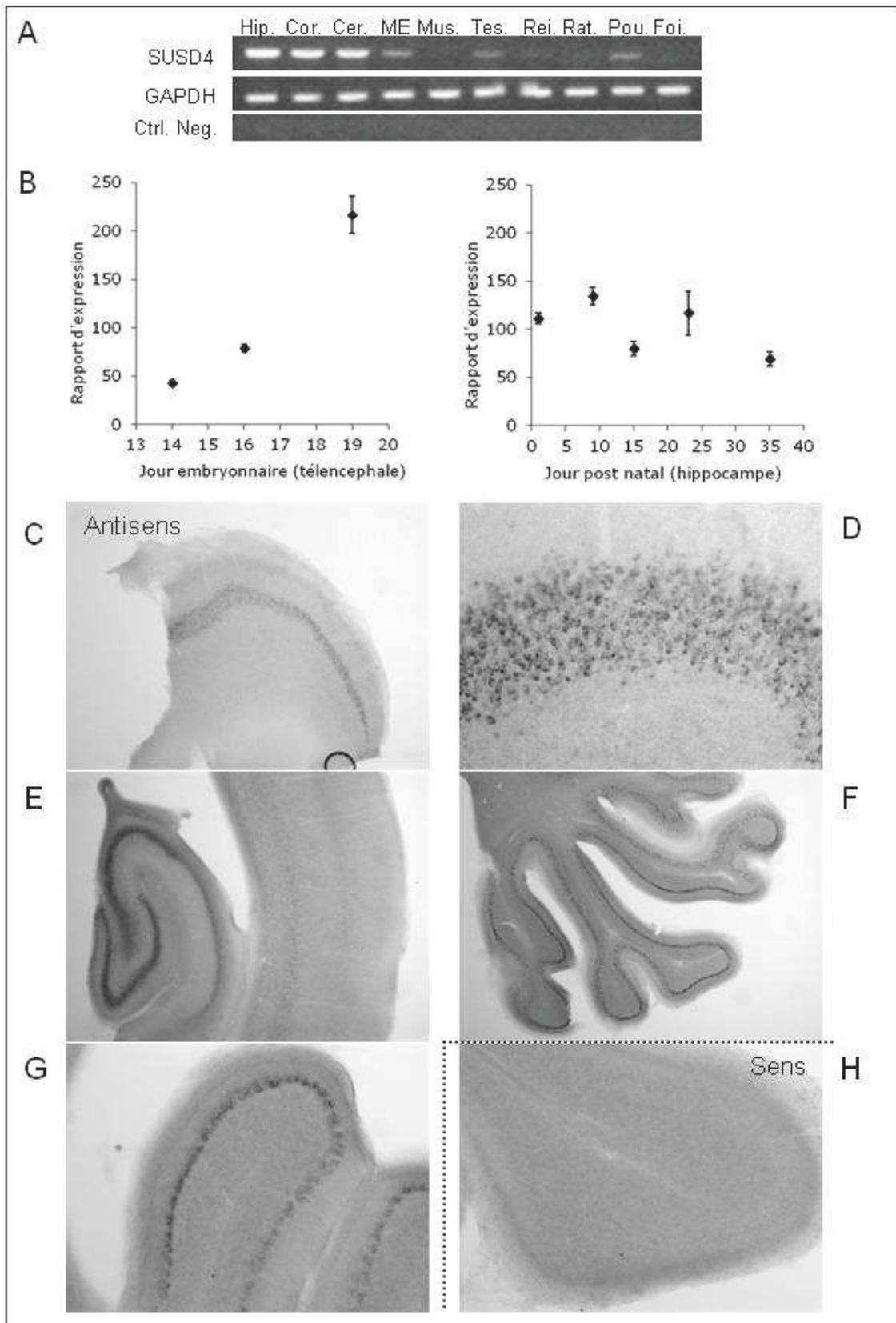


Figure R-1

Figure R-1. Expression de Susd4 (ARNm) dans le tissu. A : RT-PCR dans différents tissus de rat mâle adulte (Hip : hippocampe ; Cor : cortex ; Cer : cervelet ; ME : moelle épinière ; Mus : muscle ; Tes : testicule ; Rei : rein ; Rat : rate ; Pou : poumon ; Foi : foie). Susd4 est principalement exprimé dans le tissu nerveux. B : RT-PCR quantitative à différent temps du développement embryonnaire télencéphalique (E14, E16, E19) et du développement post natal hippocampique (P0, P9, P15, P23, P35). Le niveau d'expression est quantifié par un rapport d'expression entre Susd4 et le gène référence Pgc1. Pour chaque stade du développement, 3 expériences provenant de rats différents ont été réalisées. C à H : Hybridation in situ de Susd4 dans régions différentes du cerveau de rat adulte, montrant un marquage digoxygénine important : bulbe olfactif (C et D, grossissement de C), hippocampe (E), cervelet (F et G, grossissement de F). H : contrôle négatif (ribosonde sens).

2. Expression de Susd4 dans des cultures primaires de cellules hippocampiques

Sur des cultures primaires de cellules d'hippocampe composées majoritairement de neurones et d'astrocytes, Susd4 est exprimé en RT-PCR standard à tous les stades de développement de la culture (0, 7, 14, 21 et 28 jours in vitro), avec une intensité de bande similaire à chaque stade (Figure R-2A).

En hybridation in situ couplée à des marquages immunocytochimiques, en culture à 15 jours in vitro, toutes les cellules positives pour le marqueur NeuN (marqueur pan neuronal) expriment Susd4 (Figure R-2, B1 à B3), et ce aussi bien pour des neurones présentant un marquage GAD (neurones inhibiteurs) ou ne présentant pas de marquage GAD (neurones excitateurs). Aucune cellule négative pour NeuN n'exprime Susd4. Susd4 est donc exprimé uniquement dans les neurones, et dans tous les sous types de neurones.

Figure R-2. Expression de Susd4 (ARNm et protéine) in vitro (culture primaire de cellules hippocampiques). A : L'ARNm de Susd4 est exprimé dans les cultures hippocampiques de 0 à 28 jours in vitro (RT-PCR). B : Marquage mixte (HIS, immunocytochimie) de cellules hippocampiques en culture à 15 jours in vitro. L'HIS Susd4 révèle une expression dans les neurones uniquement (flèches en B1), identifiés par leur marquage NeuN (flèches en B2). Les cellules non marquées par NeuN sont probablement des cellules gliales (astérisques en B1 et B2). Les neurones inhibiteurs (marqués par GAD, flèche en B3) et les neurones excitateurs (non marqués en B3) expriment Susd4. C : Immunodétection de la protéine Susd4 recombinante dans des cellules HEK transfectées avec Susd4-GFP. Seules les cellules exprimant Susd4-GFP (flèches en C1, C2, C3) présentent un signal avec l'anticorps anti Susd4. D : Immunodétection de Susd4 sur cellules vivantes ; est montré un neurone hippocampique à 12 DIV exprimant Susd4-GFP. L'anticorps anti Susd4 marque la membrane cellulaire du soma et des neurites (flèche en D2), colocalisant avec la GFP (flèche en D1).

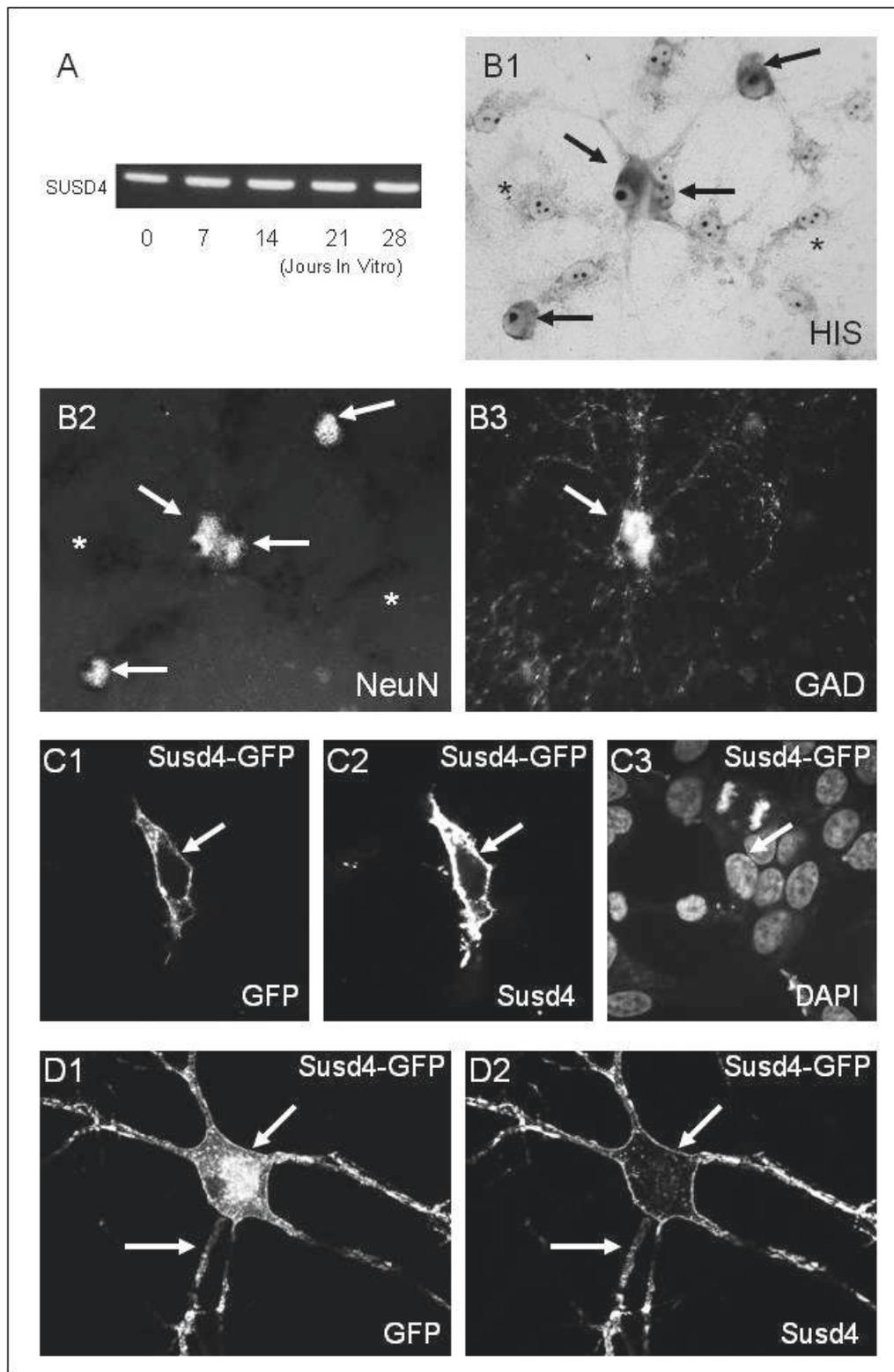


Figure R-2

J'ai ensuite testé plusieurs anticorps dirigés contre la protéine SUS4 : (1) un anticorps commercial polyclonal fait chez la souris (Abnova, #H00055061-B01P) dirigé contre les acides aminés 1 à 290 d'une isoforme « full length » de la protéine humaine, qui est une isoforme sécrétée n'existant pas chez le rat (référence de la séquence : NP_001032252.1) ; cette séquence cible est homologue aux acides aminés 1 à 243 de la protéine SUS4 du rat représentée en figure R-3 (référence NP_001099452) incluant les 3 premiers domaines CCP à partir de l'extrémité N-terminale ; le reste de la séquence cible, des acides aminés 244 à 290, est propre à l'espèce humaine; et (2) deux anticorps polyclonaux faits au laboratoire (S4931 et S4932), dirigés contre les 4 domaines CCP extra cellulaires de la protéine SUS4 de rat telle que représentée en figure R-3.

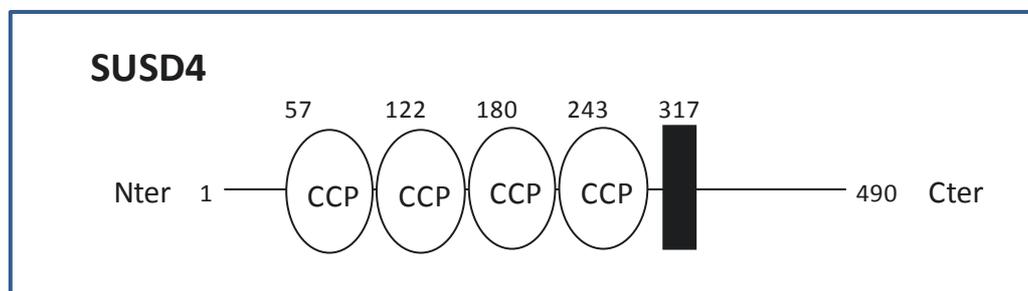


Figure R-3. Représentation schématique de la protéine de rat SUS4 selon sa composition en domaines protéiques. Les nombres correspondent à la position du début de chaque domaine sur la séquence primaire en acides aminés (en commençant en N-terminal). La barre noire correspond au domaine transmembranaire. CCP : Complement Control Protein.

Les anticorps ont été testés suivant trois procédures : en Western blot (extraits d'hippocampe de rat adulte), en immunohistochimie sur des coupes de cerveau de rat adulte, et en immunocytochimie sur les neurones d'hippocampe en culture. Malheureusement, aucun des anticorps n'a donné de résultat satisfaisant en Western blot. Dans les coupes de tissu, les 3 anticorps montrent un marquage similaire, avec une distribution uniforme sur le soma, dendrites et axone, de faible intensité. L'utilisation de pepsine en pré-traitement des coupes augmente le signal mais la distribution reste diffuse. Les structures les plus marquées sont le bulbe olfactif, l'hippocampe, le cervelet, le cortex et des noyaux de la partie dorsale du tronc cérébral. Enfin, sur les neurones en culture, le meilleur marquage a été obtenu avec l'anticorps commercial dans un protocole de marquage sur cellule vivante. L'immunomarquage sur cellules vivantes permet d'avoir uniquement accès aux épitopes extra cellulaires ; dans le cas de Susd4, la nature membranaire de la protéine est confirmée, et des

agrégats de faible taille (300 nm environ) sont observés sur le soma et les dendrites. La co-détection de Susd4 avec la synapsine montre une localisation non synaptique de SUSD4 (également observé dans les coupes de tissu), mais $36,66 \pm 3,24$ % ($n=4$ cultures) des agrégats de SUSD4 se trouvent au voisinage (300 nm ou moins) de clusters de synapsine, sans colocaliser exactement avec ceux-ci. Néanmoins, deux éléments mettent en doute la spécificité du marquage observé, au moins en partie : d'une part, l'incubation préalable de l'anticorps avec un excès de protéine SUSD4 purifiée ne diminue pas de façon significative le marquage obtenu ; et d'autre part la détection de SUSD4 par l'anticorps monoclonal sur des neurones préalablement transfectés avec un shARN contre Susd4 (cf. plus bas) montre une réduction d'environ 30% du nombre de clusters, au seuil de la significativité ($p=0.05$). Ces deux éléments, associés aux résultats précédents, rendent l'utilisation de l'ensemble des anticorps peu fiable pour la détection de la protéine endogène.

J'ai tout de même cherché à déterminer si les anticorps reconnaissent une protéine SUSD4 recombinante (en l'occurrence, portant une étiquette GFP à son extrémité C-terminale). Des cellules HEK ont été transfectées avec le plasmide et l'expression observée après 48h. Seules les cellules transfectées, exprimant la GFP, présentent un fort marquage membranaire après révélation des anticorps. La figure 2, C1 à C3, montre le résultat obtenu avec l'anticorps commercial, mais le même profil est observé pour les anticorps S4931 et S4932. Les trois anticorps reconnaissent donc la protéine recombinante. J'ai ensuite transfecté des neurones de 12 jours in vitro en culture avec Susd4-GFP et immunomarké la protéine dans des conditions de cellule vivante. Dans ce cas, SUSD4-GFP a une localisation membranaire diffuse dans le soma, les dendrites et l'axone (Figure R-2, D1 à D3, anticorps de chez Abnova). Le même type de marquage est trouvé pour les anticorps S4931 et S4932. L'ensemble de ces expériences d'immunocytochimie montre que les anticorps reconnaissent bien la protéine recombinante mais pas la protéine endogène. Cela pourrait s'expliquer par une distribution diffuse sur la membrane neuronale avec une concentration locale trop faible pour être détectée de façon significative par les anticorps.

3. Topologie de SUSD4

Selon différents logiciels de prédiction bio informatique sur la base de la séquence primaire en acides aminés, la topologie de Susd4 est équivoque. En effet, deux domaines fortement hydrophobiques sont repérés, l'un en N-terminal (domaine α), l'autre en C-terminal (domaine β) (figure R-4A). Le domaine β est systématiquement prédit comme un domaine transmembranaire, alors que le domaine α est prédit soit comme un signal peptide, soit comme un domaine transmembranaire. Le domaine α présente en effet comme atypie pour un signal peptide d'être précédé par une vingtaine d'acides aminés à partir du codon ATG. Il y a donc une ambivalence quant à la structure de la protéine au niveau de son insertion à la membrane (Figure R-4B, a et b). Pour répondre à la question de la topologie de Susd4, j'ai fait exprimer à des neurones de 5 jours in vitro une protéine recombinante HA-Susd4-GFP. Dans cette construction le tag HA se situe juste après le codon ATG (extracellulaire), et la GFP comme précédemment, en C-terminal (intracellulaire, Figure R-4C). Dans des conditions de cellules perméabilisées, la GFP est visible mais le marquage HA n'est quasiment pas détecté. La même expérience réalisée avec la protéine recombinante HA-Susd2-GFP, utilisée comme contrôle positif (tag HA présent en extra cellulaire), montre que le marquage HA et la GFP sont bien présents dans les neurones transfectés (figure R-4, C3 et C4). Ceci suggère que dans le cas de HA-Susd4-GFP le tag HA n'est plus présent; le domaine α serait donc un signal peptide clivé et SUSD4 posséderait un seul domaine transmembranaire (Figure R-4B, c).

Figure R-4. Topologie de la protéine Susd4. A : Schéma représentatif de la protéine Susd4 avec ses 4 domaines CCP (cercles). α et β sont deux domaines fortement hydrophobiques prédit par un logiciel d'analyse de la séquence primaire en acides aminés (TopPred, <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>). Le domaine β est prédit comme un domaine transmembranaire de manière invariante par plusieurs logiciels, alors que le domaine α est prédit comme un signal peptide ou comme un domaine transmembranaire. B : Topologies théoriquement possibles de la protéine recombinante Susd4 avec un tag HA en Nterminal inséré juste après le codon ATG et une GFP en Cterminal en intracellulaire. La partie Nterminale de Susd4 pourrait être soit extra cellulaire (a), soit intracellulaire (b), soit clivée comme un peptide signal (c). C : Neurones d'hippocampe en culture à 5DIV exprimant la protéine recombinante HA-Susd4-GFP (C1, C2) ou une protéine recombinante contrôle (HA-Susd2-GFP) exprimant une GFP intracellulaire et un tag HA extra cellulaire (C3, C4). C1, C3 : fluorescence GFP. C2, C4 : immunodétection de HA en condition perméabilisante. L'absence d'immunomarquage HA en C2 suggère que le domaine α a été clivé comme dans le modèle de topologie c en B.

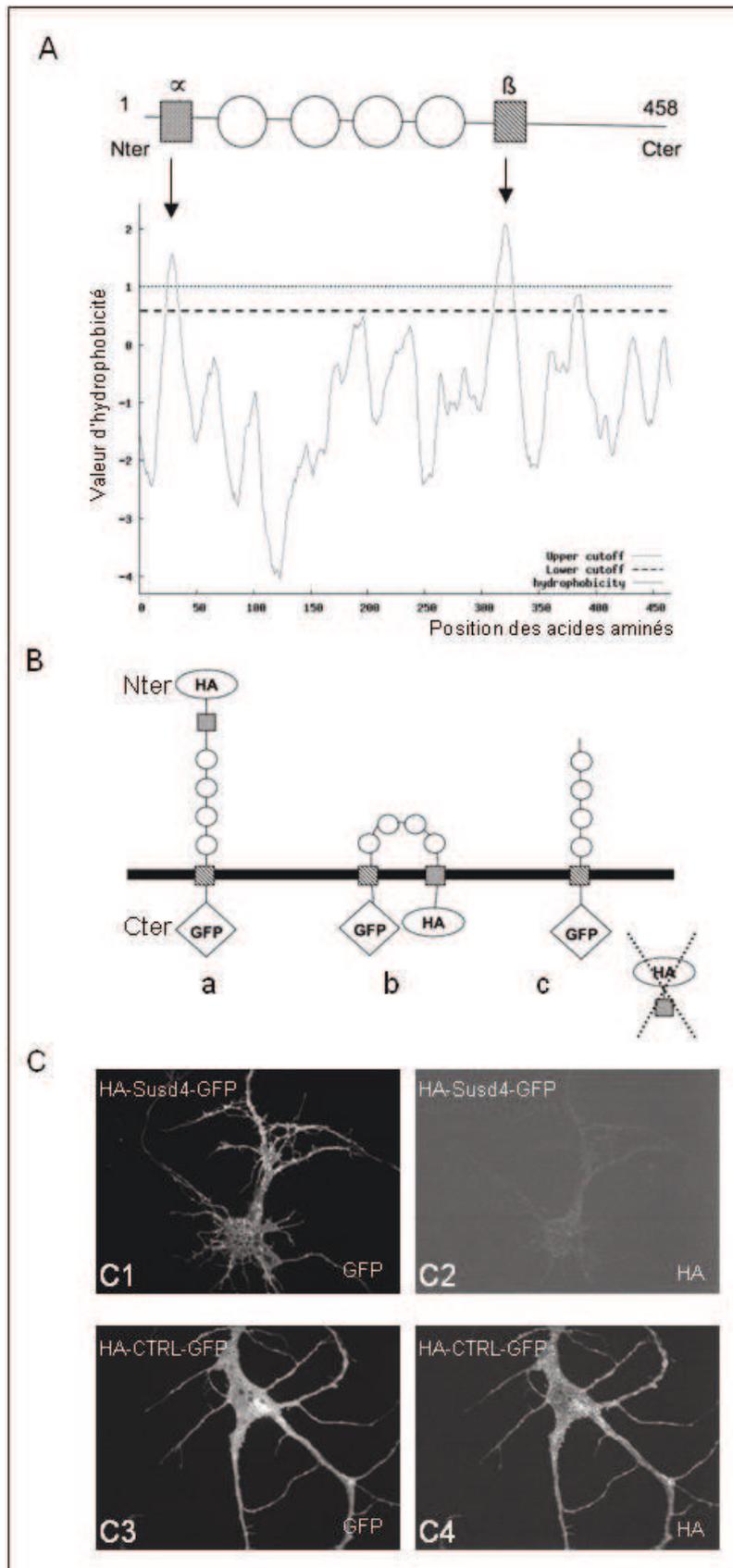


Figure R-4.

4. Effets des modifications d'expression de Susd4 sur le nombre de synapses

Dans un premier temps, j'ai surexprimé Susd4 dans les neurones en culture, en transfectant ceux-ci à 9 jours in vitro avec la construction Susd4-GFP ou avec un plasmide GFP ou GFP-gpi, utilisé comme contrôle de transfection. Un marquage réalisé sur les cultures à 21 jours in vitro avec un anticorps anti-synapsine révèle une diminution du nombre d'agrégats synaptiques sur les dendrites des neurones transfectés avec Susd4-GFP, à la limite de la significativité statistique ($67,34 \pm 9,78$ vs. $90,78 \pm 8,80$ pour le contrôle, en nombre de clusters pour $100 \mu\text{m}$ de dendrite, $p = 0.05$). Une observation plus fine a été réalisée sur les neurones ainsi transfectés à 9 jours in vitro après immunocytochimie avec des marqueurs présynaptique excitateur (VGLUT1) ou inhibiteur (VGAT). A 16 jours in vitro, les résultats (Figure R-5A) montrent une diminution significative dans le nombre de synapses détectées par VGLUT1 à la surface des neurones surexprimant Susd4 (en pourcentage, $90,97 \pm 2,75$ vs $100 \pm 3,33$, $p = 0.018$, $n = 4$) mais pas pour VGAT ($95,29 \pm 5,21$ vs $100 \pm 5,43$, $p = 0.26$, $n = 3$).

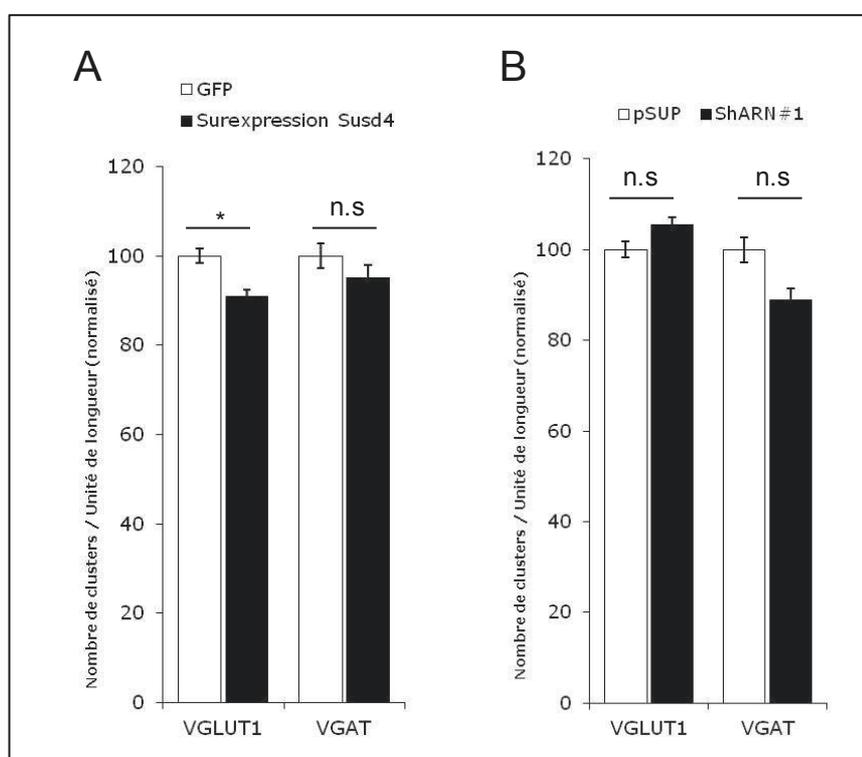


Figure R-5.

Figure R-5. Effet de la surexpression (A) et de la diminution d'expression (B) de Susd4 sur le nombre de synapses dans des neurones d'hippocampe en culture à 16 jours in vitro transfectés à 9 jours in vitro. Quantification dans les dendrites proximaux du nombre de synapses excitatrices (marquées par VGLUT1) et du nombre de synapses inhibitrices (marquées par VGAT). Les résultats sont présentés en pourcentage du nombre de synapses des cultures contrôles transfectées avec la GFP-gpi, après normalisation des valeurs par unité de longueur des dendrites. Cette normalisation est rendue nécessaire par la variabilité existant entre différentes cultures. n= 3 ou 4 cultures indépendantes, 15 neurones par condition et par culture.

L'expérience inverse a consisté à inhiber l'expression de Susd4. Deux vecteurs ont été construits, exprimant chacun un shARN différent dirigé contre l'ARNm de Susd4, shARN#1 et shARN#2. Pour tester leur efficacité, des cellules HEK ont été co transfectées avec Susd4-GFP et un des deux shARNs, ou avec Susd4-GFP et le vecteur vide (pSup) comme contrôle. Un western blot anti GFP avec le lysat des trois conditions a été réalisé (FigureR- 6). Le contrôle montre une bande à 115 Kda, attendue pour Susd4-GFP. L'intensité de la bande à 115 KDa est nettement diminuée (-90%) pour la condition shARN#1, alors qu'elle est diminuée de 20% seulement pour shARN#2. J'ai donc choisi shARN#1 pour la suite de cette étude, afin d'inhiber l'expression de Susd4 dans des neurones en culture.

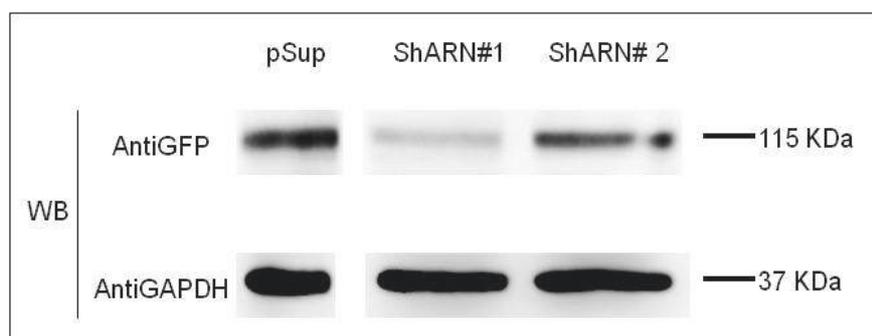


Figure R-6. Efficacité des constructions shARN contre Susd4. Western blot anti GFP de lysats protéiques à partir de cellules HEK exprimant Susd4-GFP + pSup (contrôle négatif), ou Susd4-GFP + shARN#1, ou Susd4-GFP + shARN#2. Le shARN#1 diminue l'expression protéique de Susd4-GFP d'environ 90%, alors que le shARN#2 ne diminue pas efficacement l'expression de Susd4-GFP (moins 20% seulement).

Ainsi, des neurones d'hippocampe en culture ont été transfectés à 9 DIV avec shARN#1, ou avec le vecteur vide (pSup), et fixés à 16 DIV. Afin de déterminer les modifications dans le nombre de synapses établies par les neurones transfectés, les cultures ont été immunomarquées avec les mêmes anticorps que précédemment. La quantification du nombre de clusters de VGLUT1 et de VGAT sur les dendrites proximales des neurones à 16 DIV (Figure R-5B) a montré une augmentation non significative dans le cas des synapses excitatrices (en pourcentage, $105,57 \pm 3,09$ vs $100 \pm 3,52$, $p=0.12$, $n=4$) mais une diminution dans le cas de marquage VGAT ($88,88 \pm 4,00$ vs $100 \pm 5,56$, $p=0.05$, $n=3$), à la limite de la significativité. En reprenant l'ensemble de ces résultats de cette partie, les conséquences des modifications de l'expression de *Susd4* sur le nombre de synapses dans mon modèle semblent porter davantage sur les synapses excitatrices, mais sont peu importantes ou à la limite des tests de significativité statistique. On peut en conclure que *Susd4* ne joue pas un rôle majeur dans le maintien et/ou la formation des synapses dans les neurones d'hippocampe.

Une deuxième approche a néanmoins été mise en œuvre afin de déterminer si *Susd4* pouvait intervenir dans la formation des synapses : le protocole de culture hétérotypique, ou co-culture. Cette procédure est classiquement utilisée pour mettre en évidence des capacités synaptogéniques éventuelles de protéines transmembranaires (Scheiffele et al. 2000). En effet, si une protéine exprimée par une cellule HEK a des propriétés synaptogéniques, elle induira la formation d'agrégats « présynaptiques-like » sur les axones qui sont à son contact, visibles par l'accumulation de synapsine (Figure R-7A). Ce modèle a été validé de façon préliminaire en utilisant une Neuroligin2-GFP (don de K. Gerrow) comme contrôle positif (Scheiffele et al. 2000). Le résultat montre un nombre d'agrégats de synapsine largement plus important que pour le témoin GFP-gpi (environ 10 fois plus importants, sur une expérience) (Figure R-7B).

Dans le cas de notre protéine d'intérêt, des cellules HEK transfectées avec *Susd4*-GFP ou GFP-gpi (contrôle négatif) 48h à l'avance ont étéensemencées dans des puits de culture de neurones d'hippocampe de 9 jours in vitro (Figure R-7, C et D). Deux jours plus tard, le nombre d'agrégats de synapsine localisés sur les cellules HEK exprimant *Susd4*-GFP a été quantifié par immunocytochimie. Dans ces conditions, les cellules HEK transfectées avec *Susd4*-GFP montraient un nombre d'agrégats de synapsine par cellule plus important que la condition contrôle ($12,40 \pm 1,10$ vs $7,66 \pm 0,80$, $p < 0.001$). Néanmoins, une observation plus détaillée grâce à l'utilisation du marqueur dendritique MAP2 a permis de montrer que le nombre accru de clusters de synapsine dans la condition *Susd4*-GFP n'était pas uniformément distribué. En effet, les clusters sont davantage associés à un marquage dendritique qu'axonal, et la distance parcourue par les dendrites à la surface de la cellule HEK,

significativement plus importante que chez le contrôle (32,11 +/-2,17 vs 26,39+/-1,78 μ m, respectivement, p=0.02, n= 4 co-cultures). Ainsi, l'augmentation du nombre de clusters de synapsine n'est pas une conséquence d'un effet synaptogénique de Susd4, mais d'un effet qui pourrait être lié à l'adhésion ou la croissance dendritique.

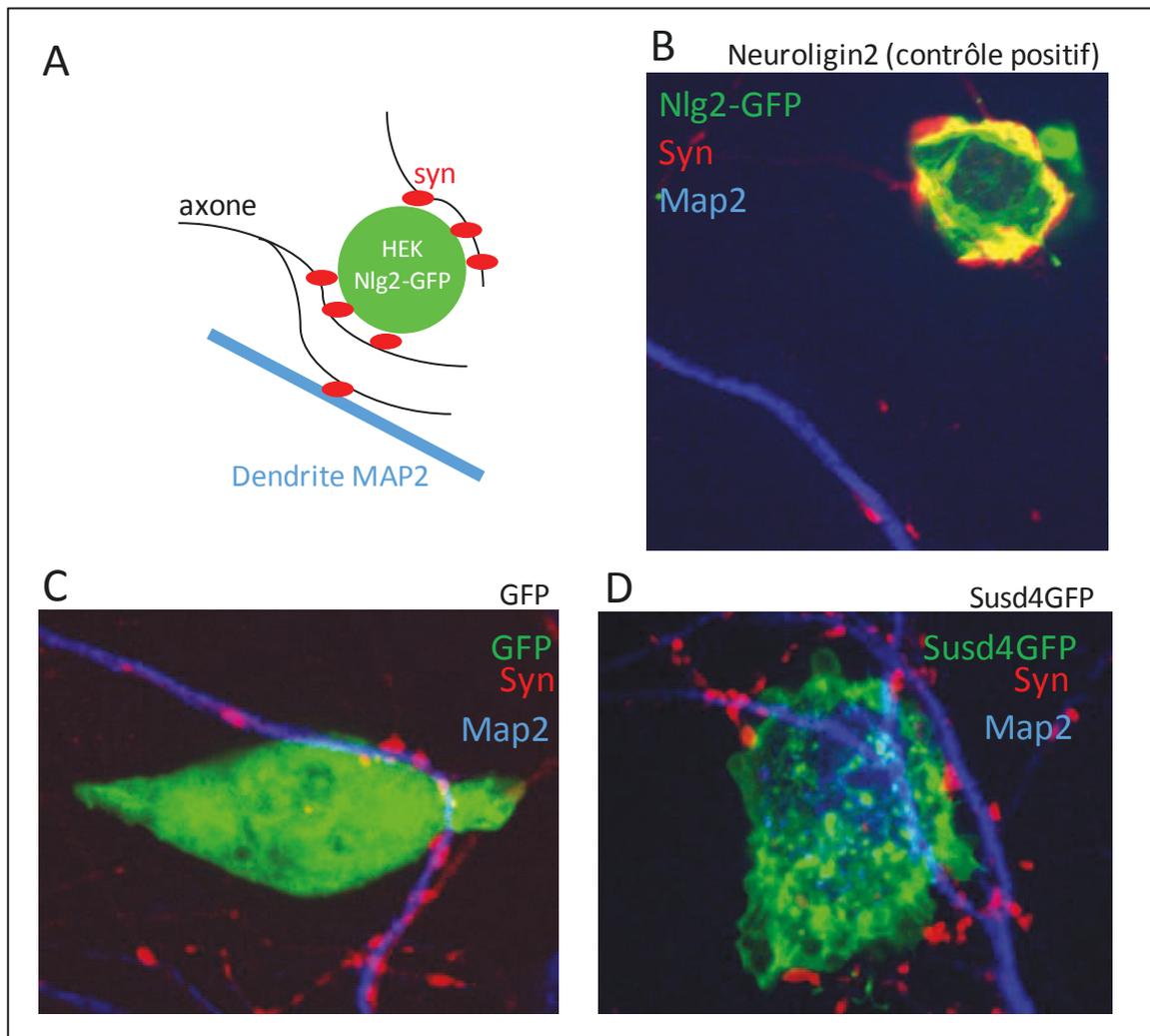


Figure R-7. A : Schéma illustrant l'activité « synaptogénique » de Neurologin2. B : Image d'une coculture avec cellules HEK exprimant Neurologin2-GFP et double immunomarquage (MAP2 : marqueur dendritique, et synapsine : marqueur pré synaptique). De nombreux agrégats de synapsine, particulièrement gros, entourent la cellule HEK exprimant Neurologin2-GFP, sans colocaliser avec MAP2, témoignant du caractère artificiel de ces hémiprésynapses. C et D : idem B, avec cellule HEK exprimant GFP (C) ou Susd4-GFP(D). Peu d'agrégats de synapsine sont accolés aux cellules HEK, et colocalisent le plus souvent avec MAP2. La longueur dendritique mesurée au contact des cellules HEK est plus importante lorsque la cellule HEK exprime Susd4-GFP en comparaison à la condition contrôle.

5. Effets des modifications d'expression de Susd4 sur la morphologie dendritique

Les effets des modifications d'expression de Susd4 sur la morphologie dendritique ont été étudiés sur des neurones en cultures plus jeunes que pour l'étude précédente. Des neurones d'hippocampe ont été transfectés à 2 jours in vitro, fixés à 5 jours in vitro, et immunomarqués avec MAP2. L'analyse des images a été réalisée à l'aide du logiciel d'acquisition d'image (ImageJ, plug-in NeuronJ). Trois informations sur la morphologie dendritique ont été extraites pour chaque neurone : longueur totale de dendrites, nombre de dendrites, et longueur moyenne des dendrites. Les neurones surexprimant Susd4 montrent une morphologie dendritique altérée (Figure R-8A et B) avec seulement 56,22% ($p < 0.001$) de la longueur dendritique totale par rapport au contrôle. Cette diminution est liée à la fois à une diminution du nombre de dendrites (77,49%, $p < 0.001$) et à une diminution de la longueur moyenne des dendrites (69,88%, $p < 0.001$) par rapport aux valeurs du contrôle (Figure R-8C). La courbe de distribution cumulative selon la longueur dendritique totale (Figure R-8D) a un profil identique dans la condition Susd4-GFP et contrôle, suggérant que l'effet trouvé est homogène sur l'ensemble des neurones en culture et n'affecte pas une sous-population de celle-ci. De façon surprenante, la diminution d'expression de Susd4 par transfection du shARN#1 a le même effet que la surexpression de Susd4, mais avec une intensité moindre puisque la longueur dendritique totale est seulement de 79,49% ($p < 0.001$) par rapport au contrôle (Figure R-8E et F). Ces résultats montrent que Susd4 a un effet modulateur sur la croissance dendritique, et qu'un déséquilibre de l'expression dans un sens ou dans l'autre a le même effet.

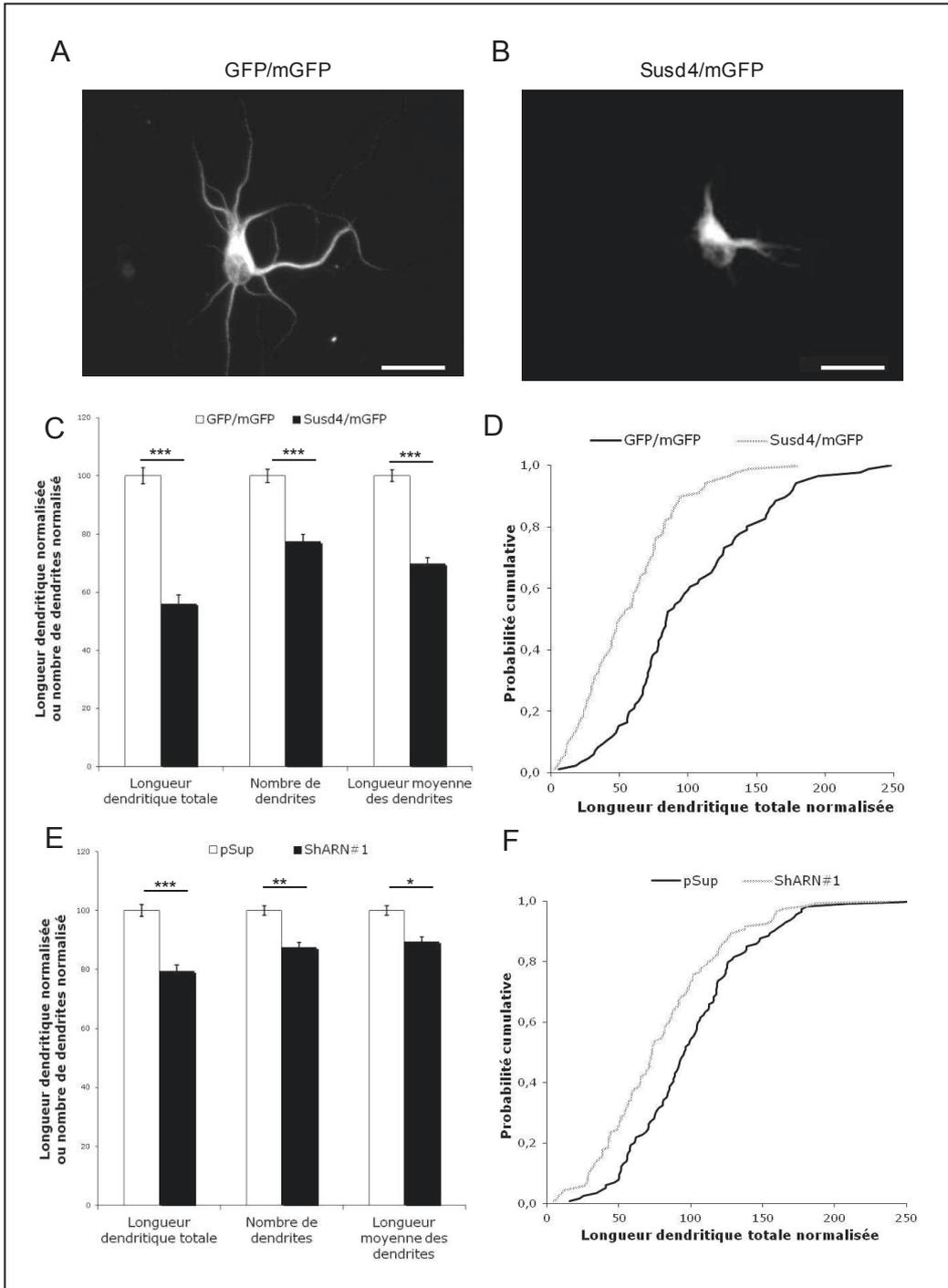


Figure R-8.

Figure R-8. Effet de la diminution d'expression et de la surexpression de Susd4 sur la morphologie dendritique dans des neurones d'hippocampe à 5DIV de culture, transfectés à 2DIV. A et B : images de neurones hippocampiques avec immunomarquage MAP2, en condition contrôle (expression d'une GFP cytosolique et d'une mGFP = GFP membranaire) et avec surexpression de la protéine recombinante Susd4 + mGFP. C : Quantification de trois paramètres de la morphologie dendritique: longueur totale dendritique par neurone, nombre de dendrites par neurone, et longueur moyenne des dendrites par neurone. Les valeurs ont été normalisés par rapport à la condition contrôle, pour laquelle la moyenne des valeurs pour les trois paramètres a été définie à 100%. D : Courbe de fréquence cumulée selon la longueur dendritique totale dans les conditions contrôle et surexpression de Susd4, montrant une distribution identique pour les deux conditions. E : Quantification de trois paramètres de la morphologie dendritique en condition contrôle versus shARN#1. F : Courbe de fréquence cumulée selon la longueur dendritique totale dans les conditions contrôle et surexpression de shARN#1, montrant une distribution identique pour les deux conditions.

B. MATERIEL ET METHODES

Le « Matériel et Méthodes » de l'article de Susd2 décrit toutes les expériences utilisées pour l'étude de Susd4. Est précisé ci-dessous le matériel spécifique aux expériences concernant Susd4.

Construction des vecteurs

Susd4 « full length » a pu être amplifié par PCR à partir d'hippocampe de rat adulte en utilisant ces primers :

Forward : GCCAGATCTATCATGGAATGAACCCGAG

Reverse : CGGAAGCTTCTAGGGATCCTCTCCATGA

Puis, comme pour Susd2, Susd4-GFP a été obtenu par clonage dans le vecteur d'expression commercial pEGFP-N1 (Clontech), la séquence de EGFP se situant à l'extrémité C-terminale de la séquence de Susd4. Susd4 avec insertion d'un tag HA à l'extrémité N-terminale a également été cloné dans pEGFP-N1.

Séquences utilisées pour la construction des shRNA#1 et shRNA#2

ShRNA#1 forward :

GATCCCCGTACAACATGGTTTCGTTATTCAAGAGATAACGAAACCATGTTGTACTTTTTGGAAA

ShRNA#1 reverse :

AGCTTTTCCAAAAGTACAACATGGTTTCGTTATCTCTTGAATAACGAAACCATGTTGTACGGG

ShRNA#2 forward

GATCCCCCTGTCATGCTCCCGACCTATTCAAGAGATAGGTCGGGAGCATGACAGTTTTTGGAAA

ShRNA#2 reverse

AGCTTTTCCAAAAGTACAACATGGTTTCGTTATCTCTTGAATAGGTCGGGAGCATGACAGGGG

RT-PCR et RT-PCR quantitative

Primers utilisés pour amplifier Susd4 :

Forward TGCTGGTGTACTGCTCGTC

Reverse GAAATCGTGTACAGGGGTGTC

Hybridation in situ

Le fragment amplifié par RT-PCR de Susd4, comme pour Susd2, a été cloné dans le vecteur pGEMT (Promega) en vue de la construction de la ribosonde anti Susd4.

Immunocytochimie

L'anticorps anti Susd4 est un anticorps polyclonal de souris disponible chez Abcam (référence : #H00055061-B01P), utilisé à la dilution de 1/100.

IV. DISCUSSION

Susd2 et Susd4 sont donc deux nouveaux gènes codant des protéines avec domaines CCP qui jouent un rôle dans le développement neuronal *in vitro* au sein de cultures primaires de cellules hippocampiques. Susd2 favorise la croissance axonale alors qu'il inhibe la croissance dendritique, et favorise la synaptogénèse excitatrice. Susd4 a un rôle de régulation de la morphologie dendritique, sans fonction synaptique mise en évidence.

A. Expression spatio temporelle de Susd2 et Susd4 dans le système nerveux central.

Je montre que Susd2 est exprimé tôt dans la vie embryonnaire du rat, au minimum dès E14 (E : jour embryonnaire). La RT-PCR quantitative m'a permis d'observer la cinétique d'expression de Susd2 au cours du développement. L'utilisation d'un gène référence (Pgk1) dont l'expression a été validée comme stable au cours du développement permet d'obtenir un résultat fiable et reproductible de rapport de quantité d'expression entre Susd2 et Pgk1 (Boda et al. 2009). L'expression en ARNm de Susd2 augmente progressivement dans le télencéphale pendant la période embryonnaire entre E14 et E19 chez le rat (augmentation d'un facteur 2 entre E14 et E19), et fait de même en post natal dans l'hippocampe avec une très nette augmentation de son expression entre P1 et P15 (augmentation d'un facteur 5 ; P : jour post natal), puis une expression stable entre P15 et P35. En RT PCR non quantitative sur des cultures primaires de cellules d'hippocampe, il existe de même une augmentation de l'expression de 0 à 14 jours *in vitro*, puis une stabilité de 14 à 28 jours *in vitro* (sachant que les hippocampes sont prélevés puis dissociés pour la culture à E19, soit 2 jours avant P0). L'expression de Susd2 en culture est principalement de localisation neuronale, selon les résultats de l'hybridation *in situ* à 15 jours *in vitro*. En western blot sur des cultures, il existe également une nette majoration de l'intensité de la bande entre 8 et 15 jours *in vitro*, avec cependant à 22 jours *in vitro* une intensité moindre de la bande, identique à 8 jours *in vitro*. Il existe donc probablement un mécanisme de régulation d'expression de Susd2, possiblement par microRNA ou modification de la stabilité de la protéine, qui aboutit à une diminution d'expression de Susd2 au delà de 15 jours *in vitro*.

Finalement, Susd2 a donc une expression majoritairement neuronale avec une expression à la fois en ARNm et protéine qui augmente progressivement au cours du développement embryonnaire et post natal précoce, avec une augmentation plus nette entre P1 et P15 in vivo dans l'hippocampe. Ces données descriptives sont en faveur d'un rôle de Susd2 dans le développement neuronal. Dans des études de RT-PCR quantitative ou de microarray sur des structures cérébrales en développement, plusieurs profils de cinétique d'expression ont été identifiés. Le groupes de gènes ayant le même profil cinétique que Susd2 est le plus enrichi en gènes ayant une fonction synaptique (voir figure D-1) (Mody et al. 2001; Stead et al. 2006). En effet, la période post natale précoce est une étape du développement neuronale où la formation des synapses est la plus intense, et cela a été décrit à la fois in vivo et in vitro dans des cultures de cellules d'hippocampe (Grabrucker et al. 2009; Sutor and Luhmann 1995). Le fait qu'au niveau protéique, l'expression de SUSD2 diminue après un pic à 15 jours in vitro en culture, pourrait être en faveur d'un rôle spécifique dans la formation des synapses plutôt que dans la maintenance ou la plasticité. La protéine recombinante SUSD2 exprimée dans des neurones d'hippocampe en culture s'organise en agrégats membranaires au niveau somato dendritique alors qu'elle a une localisation diffuse au niveau axonal. Ces agrégats somato dendritiques sont enrichis au niveau des marqueurs synaptiques excitateurs. Cependant, la localisation de la protéine SUSD2 endogène n'a pu être obtenue du fait d'une absence d'immunomarquage, alors que ce même anticorps anti SUSD2 reconnaît la protéine recombinante. Il est possible que l'affinité de l'anticorps anti SUSD2 ne soit pas assez importante pour détecter en immunofluorescence la protéine SUSD2 en faible quantité. L'autre hypothèse est que les épitopes de la protéine SUSD2 endogène soient difficilement accessibles pour l'anticorps, mais la procédure habituelle pour démasquer les épitopes par la chaleur n'a pas permis non plus d'obtenir un marquage. La production d'un anticorps plus performant est nécessaire à l'élucidation de la localisation sub cellulaire de la protéine SUD2 endogène. Malgré tout, le recueil de toutes ces données descriptives m'ont incité à rechercher une fonction synaptique pour Susd2.

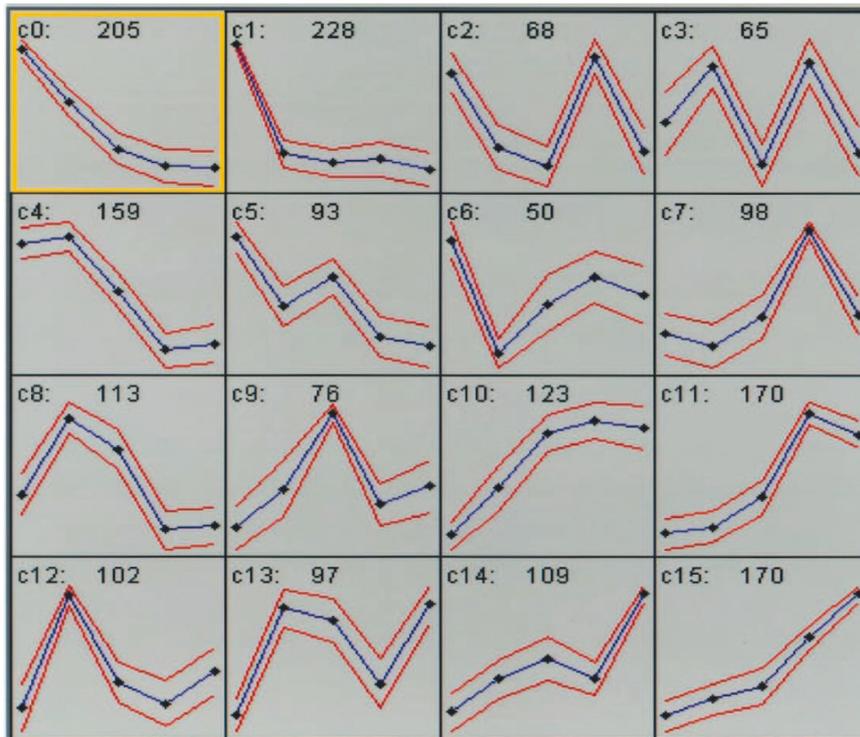


Figure D-1, tirée de (Mody et al. 2001). 11000 gènes, étudiés par microarray au cours du développement hippocampique de souris, ont été classés en 16 groupes (de c0 à c15) selon leur cinétique d'expression. Dans chaque groupe, les points successifs correspondent aux différents stades du développement : E16, puis P1, P7, P16, P30. Les groupes c11 et c15, avec une augmentation d'expression en post natal tardif à P16, sont les plus enrichis en gènes à fonction synaptique (synapsine, synaptophysine, GluR1, ...).

Susd4 a une cinétique d'expression différente de Susd2, avec une expression télencéphalique fortement augmentée de E16 à E19 (d'un facteur 5), et une expression stable hippocampique en post natal. De même, en culture de cellules d'hippocampe, de 0 à 28 jours in vitro, il n'y a pas de différence évidente d'intensité de bande en RT-PCR, suggérant là aussi une stabilité d'expression en post natal. Comme Susd2, Susd4 a une localisation pan neuronale, à la fois en hybridation in situ (HIS) sur cellules d'hippocampe en culture, et en HIS sur coupe de cerveau adulte où les structures neuronales sont les plus fortement marquées (couche des cellules mitrales dans le bulbe olfactif, cellules de Purkinje du cervelet, cornes d'Amon et gyrus dentelé dans l'hippocampe). La cinétique d'expression de Susd4 et sa localisation neuronale orienterait plutôt vers une fonction dans la migration neuronale ou le développement neuritique. La localisation sub cellulaire de la protéine

recombinante Susd4-GFP, diffuse à la membrane plasmique et présente à la fois dans le soma, les dendrites et l'axone, est compatible avec ces fonctions.

B. Clivage de la protéine Susd2

Je montre que la partie extra cellulaire de la protéine SUSD2 est majoritairement clivée. Cela est vrai pour la protéine recombinante exprimée dans des cellules HEK : le western blot sur lysat protéique avec anticorps anti GFP (GFP localisée en C terminal en intra cellulaire) révèle une bande de 80 KDa largement majoritaire, correspondant à environ 50 Kda de protéine SUSD2 non taguée en soustrayant le poids moléculaire de la GFP; le western blot réalisé avec l'anticorps anti HA (HA localisé en N terminal en extra cellulaire) révèle une bande très majoritaire à 55 Kda, ce qui approximativement correspond à de la protéine SUSD2 non taguée, le poids moléculaire du tag HA étant négligeable. Le clivage de SUSD2 recombinante se fait donc approximativement au milieu de la séquence protéique primaire, possiblement entre les deux domaines AMOP (coté N terminal, de la position 282 à 430 pour une longueur totale de 820 acides aminés) et VWD (coté C terminal, de la position 433 à 614). Le Western blot de cellules d'hippocampe en culture non transfectées révèle une bande 55 Kda majoritaire et intense surtout à 15 jours in vitro. L'anticorps ciblant la partie extracellulaire de SUSD2 proche du domaine transmembranaire (région antigénique de la position 545 à 775 incluant une partie du domaine VWD et le domaine CCP), cette bande correspond probablement au fragment C terminal clivé de SUSD2. La protéine SUSD2 endogène est donc également clivée de la même façon que la protéine recombinante dans les cultures primaires de neurones hippocampiques. L'expérience d'immunoprécipitation (IP) montre que les deux fragments clivés de Susd2 interagissent physiquement.

Le clivage extra cellulaire des protéines d'adhésion a été décrit chez plusieurs protéines ayant un rôle développemental dans le SNC. Le clivage peut théoriquement modifier la fonction du fragment protéique ancré à la membrane par exemple par modification des affinités d'interaction avec d'autres protéines, et déterminer une nouvelle fonction liée à la diffusion extra cellulaire du fragment protéique libéré de la membrane plasmique.

Le clivage de NCAM favorise la migration de cellules de neuroblastome B35 à travers une matrice extra cellulaire de fibronectine, via un mécanisme dépendant des intégrines $\beta 1$ (Diestel et al. 2005).

Dans des neurones corticaux en culture, NCAM est clivé par une metalloprotéase ADAM libérant un fragment soluble de 115 kDa. L'inhibition de la metalloprotéase augmente l'effet favorisant de NCAM sur la croissance et l'arborisation neuritique, suggérant que le clivage de NCAM est un mode de régulation du développement neuronal (Hinkle et al. 2006). Dans des cultures primaires d'hippocampe, à l'inverse, le clivage de NCAM favorise la neuritogénèse (Kalus et al. 2006). Le clivage de NCAM par ADAM10 est également un effecteur de la répulsion du cône de croissance dans le néocortex de souris médié par l'interaction ephrinA5/EphA3 (Leann H Brennaman, Moss, and Maness 2014). In vivo, la souris transgénique surexprimant le fragment clivé soluble de NCAM a une diminution nette du nombre de synapses surtout inhibitrices dans le cortex pré frontal probablement en lien avec une arborisation dendritique et axonale défectueuse, et présente des anomalies comportementales (Leann Hinkle Brennaman and Maness 2008; Pillai-Nair et al. 2005). Ces données sont en faveur d'un rôle majeur et multiple dans le développement de la connectivité cérébrale du clivage de NCAM. En clinique, l'augmentation de NCAM soluble dans le LCR et certaines structures cérébrales de patients schizophrènes suggère que le clivage de NCAM pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de la schizophrénie (Vawter et al. 2001). L1CAM, une autre protéine d'adhésion avec domaines Ig, a également des propriétés adhésives régulées par son clivage par ADAM10 et ADAM17, avec des conséquences fonctionnelles sur la migration neuronale et la croissance neuritique (Maretzky et al. 2005).

La fonction synaptique est également modulée par le clivage des protéines d'adhésion synaptiques. L'expression de mutants de Nectin1 dans les cultures primaires d'hippocampe inhibant son clivage diminue la formation des épines dendritiques (Lim et al. 2012). De même, le clivage de EphA4 et de Neuroligin1 sont aussi impliqués dans la régulation de la formation des épines dendritiques de manière dépendante de l'activité synaptique : EphA4 est clivé par γ -secrétase lors de l'activité synaptique, ce qui libère un fragment intra cellulaire qui rentre dans une voie de signalisation favorisant la formation des épines dendritiques (Inoue et al. 2009) ; Le clivage de Neuroligin1 par ADAM10 est augmenté par l'activation des récepteurs NMDA, et son inhibition augmente le nombre des épines dendritiques dans des cultures primaires de neurones (Suzuki et al. 2012). En fait, les metalloprotéases (dont les ADAM) et γ -secrétase ont une localisation synaptique, et ont une activité protéolytique dépendante de l'activité synaptique qui peut diminuer la quantité de certaines protéines d'adhésion synaptique, avec pour conséquence une diminution de la transmission synaptique (Restituito et al. 2011). Le système protéolytique synaptique est donc probablement en lien avec les phénomènes de plasticité synaptique dont la LTP (Jinsook Kim et al. 2011).

Susd2, qui joue un rôle à la fois dans la synaptogénèse excitatrice et dans la croissance neuritique, est donc susceptible d'avoir une activité régulée par un ou plusieurs des systèmes protéolytiques impliqués dans le développement neuronal. Les deux fragments de Susd2 pouvant interagir entre eux de manière non covalente, l'affinité de cette liaison peut également faire l'objet d'une régulation permettant de moduler les propriétés fonctionnelles de Susd2. Il serait intéressant d'observer si le clivage de Susd2 est modifié par des manipulations pharmacologiques et/ou génétiques des systèmes protéolytiques connus, et si cela affecterait les fonctions multiples de Susd2. Il serait également utile, afin d'identifier les fonctions différentielles des fragments N et C terminaux de Susd2, d'observer si l'ajout dans le milieu de culture du fragment N terminal de Susd2 a un effet sur le nombre de synapses excitatrices et/ou la croissance neuritique.

C. Fonction synaptique de Susd2

Pour une approche fonctionnelle, j'ai créé plusieurs outils pour manipuler l'expression de Susd2 et Susd4. Les shARN sont des petits ARN double brins qui utilisent la machinerie physiologique du phénomène d'ARN interférence pour détruire spécifiquement l'ARNm cible (Taxman et al. 2006). J'ai donc construit deux shARN ciblant de manière spécifique l'ARNm de Susd2, chaque shARN ayant une cible différente au sein de l'ARNm de Susd2, de même pour Susd4. J'ai montré que les deux shARN anti Susd2 sont capables de réduire fortement l'expression de la protéine Susd2 recombinante dans des cellules HEK (Papier Susd2 : figure 4, A1), alors que seul le shARN#1 anti Susd4 s'est avéré efficace. Etant donné que les anticorps anti SUSD2 et anti SUSD4 ne montre pas d'immunomarquage spécifique des protéines SUSD2 et SUSD4 endogène, il ne m'a pas été possible de vérifier l'efficacité des shARN sur les protéines endogènes dans des cultures de cellules d'hippocampe. Pour Susd2, dont l'anticorps fonctionne en Western Blot, le taux de transfection des neurones par les shARN est trop faible pour qu'un effet puisse être observé en Western blot sur des lysats protéiques de culture. J'ai également construit un plasmide exprimant un ARNm de Susd2 différent de la séquence consensus dans le but de rendre l'ARNm résistant à l'action du shRNA#1 anti Susd2, sans modifier la séquence protéique de SUSD2 après traduction en jouant sur la redondance du code génétique. J'ai montré qu'effectivement ce plasmide exprimé dans des cellules HEK exprime correctement la protéine SUSD2 recombinante malgré une co transfection avec le shRNA#1. L'utilisation de ce plasmide a permis de réaliser une expérience de sauvetage du phénotype induit par le shRNA#1. L'intérêt de ce type d'expérience est de s'assurer que l'effet du shRNA est bien spécifique, c'est-à-dire du à la

diminution de l'expression de *Susd2*. Les shRNA peuvent en effet avoir des effets non spécifiques responsables d'obtention de phénotypes sans lien avec la perte de fonction de la protéine d'intérêt (Taxman et al. 2006).

J'ai donc montré que la diminution de l'expression de *Susd2* par shARN dans des neurones d'hippocampe en culture à une période de synaptogénèse intensive (entre 10 et 15 jours in vitro) diminue de manière significative le nombre de synapses excitatrices localisées dans les dendrites de ces neurones. Les deux shARNs utilisés aboutissent au même résultat soit 30% de synapses excitatrices en moins, sans effet sur le nombre de synapses inhibitrices. L'expérience de sauvetage avec co transfection du shARN#1 et d'un plasmide exprimant l'ARNm de *Susd2* résistant au shARN montre un sauvetage partiel du phénotype (la diminution passe de moins 33% à moins 20%) qui n'est pas significatif. La question de la spécificité du phénotype induit par le shRNA se pose donc. Il existe plusieurs arguments pour penser que ce phénotype est spécifique : 1/morphologiquement les neurones étaient semblables dans les deux conditions, sans effet notable du shARN sur la viabilité des neurones 2/Alors que les deux shARNs utilisés ont une cible différente de l'ARNm de *Susd2* et donc une séquence complètement différente, il y a peu de probabilité théorique qu'ils aient un effet non spécifique identique à la fois en nature (diminution du nombre des synapses excitatrices) et en intensité (moins 30%) 3/ Enfin lors de l'analyse plus fine des résultats des expériences de sauvetage, il semble qu'une sous population neuronale minoritaire ait un phénotype restauré, ce qui semble peu explicable dans l'hypothèse d'un effet non spécifique des shARN, même si l'interprétation de ce phénomène de sauvetage partiel est difficile. Habituellement, les expériences de sauvetage sont la clé de la démonstration de la spécificité d'un effet d'un shARN. Cependant, son échec peut être dû à plusieurs causes en dehors d'une non spécificité de l'effet du shARN, car la protéine censée sauver le phénotype ne remplace pas stricto sensu la protéine déficiente : 1/son niveau d'expression n'est pas physiologique et peut impacter sa fonction 2 / Elle n'est qu'une isoforme, alors que le shRNA peut potentiellement cibler plusieurs isoformes du gène d'intérêt. Contrairement à *Susd2*, la manipulation de l'expression de *Susd4* dans les neurones en culture (diminution par shARN, augmentation par surexpression de la protéine recombinante *Susd4*) n'a aucun effet notable sur le nombre de synapses excitatrices ou inhibitrices.

Plusieurs gènes codant des protéines d'adhésion sont connus pour avoir le même effet que *Susd2*, c'est-à-dire promouvoir la synaptogénèse excitatrice dans différents modèles d'étude. Ci-dessous (Tableau D-1) sont répertoriées les protéines d'adhésion pour lesquelles la diminution de leur expression en culture de neurones d'hippocampe diminue le nombre de synapses excitatrices,

comme pour *Susd2*. Il s'avère qu'*in vitro*, certaines de ces protéines peuvent avoir d'autres propriétés que n'a pas *Susd2* : augmentation du nombre de synapses excitatrices avec la surexpression de la protéine, modification du nombre de synapses inhibitrices avec la modulation d'expression, fonction « synaptogénique » dans le modèle de co culture neurone-cellule non neuronale. Ces protéines ont aussi des fonctions synaptiques que je n'ai pas testé pour *Susd2* : recrutement de protéines post synaptiques spécifiques et notamment des récepteurs ionotropiques (AMPA ou NMDA), maturation de la transmission pré synaptique en électrophysiologie, rôle dans la plasticité synaptique. Ces aspects du fonctionnement synaptique seraient également intéressants à tester chez *Susd2*. Ces protéines d'adhésion jouant un rôle dans la synapse excitatrice interagissent avec des partenaires trans synaptiques (Neurologin/Neurexin, NGL/netrinG, Eph/ephrin, Ncadherin/Ncadherin,...) qui peuvent être multiples, augmentant la complexité de la transduction de signal via ces interactions en trans. Par exemple, LRRTM2 interagit avec Neurexin1 (de Wit et al. 2009). Il se pourrait que les systèmes d'adhésion de ces protéines soient interconnectés de manière directe ou indirecte, pour réguler de manière fine dans le temps et l'espace une même voie de signalisation favorisant la mise en place d'une synapse excitatrice (Krueger et al. 2012). Ces protéines ont aussi plusieurs ligands intra cellulaires, et beaucoup d'entre elle interagissent avec PSD95, une protéine d'échafaudage de la synapse excitatrice. *SUSD2* est aussi susceptible d'interagir avec des protéines d'échafaudage de la synapse excitatrice, malgré l'absence de domaine de liaison au domaine PDZ présent chez PSD95. *SUSD2* est donc la 3eme protéine d'adhésion avec domaine CCP, après SEZ6 et SRPX2, qui promeut la synaptogénèse excitatrice.

Neurologin1	<ul style="list-style-type: none"> -Diminution des synapses excitatrices et inhibitrices en culture par ARNi -Augmentation des synapses excitatrices avec la surexpression -Fonction « synaptogénique » excitatrice -Recrutement de protéines post synaptiques (PSD95, NMDA, AMPA) -Maturation présynaptique -KO in vivo : absence de modification du nombre de synapse mais défaut de maturation synaptique et modification du ratio synapses excitatrices vs inhibitrices (KO de 3 Neurologins)
SALM2	<ul style="list-style-type: none"> -Diminution des synapses excitatrices en culture par ARNi -Augmentation des synapses excitatrices avec la surexpression -Pas de fonction « synaptogénique » -Recrutement des récepteurs AMPA -Rôle dans la croissance neuritique
EphB2	<ul style="list-style-type: none"> -Diminution des synapses excitatrices en culture par ARNi et dominant négatif -Fonction « synaptogénique » -Recrutement des récepteurs NMDA -KO in vivo : absence de modification du nombre de synapse mais diminution des courants médiés par les récepteurs NMDA et diminution LTP et LTD
NGL2	<ul style="list-style-type: none"> -Diminution des synapses excitatrices en culture par ARNi -Augmentation des synapses excitatrices avec la surexpression -Fonction « synaptogénique »
Ncadherine	<ul style="list-style-type: none"> -Diminution des synapses excitatrices en culture par dominant négatif -Pas d'augmentation des synapses excitatrices avec la surexpression -Pas de fonction « synaptogénique »
NARP	<ul style="list-style-type: none"> -Diminution des synapses excitatrices en culture par dominant négatif -Augmentation des synapses excitatrices avec la surexpression -Recrutement des récepteurs AMPA et NMDA dans les interneurons hippocampe en culture

Tableau D-1. Phénotypes multiples des protéines d'adhésion dont la diminution d'expression en culture diminue le nombre de synapses excitatrices, comme Susd2.

D. Fonction de régulation de croissance neuritique de Susd2 et Susd4

Plusieurs des gènes qui ont un phénotype synaptique similaire à Susd2 ont aussi d'autres fonctions dans le développement neuronal. SALM2 par exemple, en plus de l'effet de sa diminution d'expression sur la synaptogénèse excitatrice, et qui comme Susd2 n'a pas de fonction « synaptogénique » dans un système de co culture, est aussi impliqué dans la croissance neuritique (Ko et al. 2006; P. Y. Wang, Seabold, and Wenthold 2008). Comme SUSD2, SALM2 est à la fois localisé à la synapse excitatrice, dans les dendrites et l'axone. La surexpression de SALM2 dans des neurones d'hippocampe en culture augmente le nombre de dendrites primaires et l'arborisation axonale. Cependant, sa diminution d'expression par RNAi est sans effet sur la croissance neuritique, probablement en raison de la redondance partielle de fonction des SALMS, puisque la diminution d'expression des 5 SALMs a elle un impact négatif. Du fait de la pléiotropie des protéines d'adhésion ayant une fonction synaptique, j'ai donc recherché une implication de SUSD2 dans la croissance axonale et dendritique. Les résultats sur la cinétique d'expression de Susd4 m'ont également amené à rechercher une fonction pour Susd4 à un stade développemental plus précoce que la synaptogénèse. Mon modèle d'étude ne donnant pas accès à l'étude de la migration neuronale, j'ai tenté d'observer si Susd4 pouvait influencer sur la croissance dendritique.

1. Rôle de Susd2 dans la croissance axonale

Dans des cultures de neurones d'hippocampe au stade précoce, Susd2 a un effet sur la croissance et l'arborisation axonale : la surexpression de Susd2 recombinant augmente la longueur de l'axone et le nombre de branches secondaires et tertiaires, alors que la diminution d'expression par transfection d'un shARN a l'effet inverse sur les deux paramètres. Susd2 régule aussi l'arborisation dendritique car sa diminution d'expression par shARN augmente la longueur dendritique totale par neurone par une augmentation à la fois du nombre de dendrites et de la longueur individuelle des dendrites. Cependant, la surexpression de Susd2 n'a pas d'effet sur la croissance dendritique. Au final, on peut conclure que Susd2 promeut la croissance axonale et inhibe la croissance dendritique des neurones d'hippocampe, sans qu'il semble y avoir d'effet différentiel sur les différentes populations de neurones.

La croissance axonale (ou élongation axonale) est une facette du développement du neurone qui se distingue de l'initiation axonale et du guidage axonal. Les mécanismes moléculaires régulant la croissance axonale jouent sur la dynamique du cytosquelette, principalement via la polymérisation des microtubules, alors que le cytosquelette constitué d'actine joue surtout un rôle dans le guidage plutôt que l'élongation axonale. Les facteurs modifiant la croissance axonale impactent tous les molécules de régulation de la dynamique des microtubules, qu'on appelle MAPs pour microtubule associated proteins. Ces facteurs ont plusieurs niveaux d'action : molécules de signalisation qui interfèrent avec les MAPs comme les MARK kinases qui régulent la croissance et le transport axonal par la phosphorylation de Tau, ou comme les GTPases (familles Ras et Rho) ; facteurs de transcription ; et enfin signaux extra cellulaires. Les facteurs intrinsèques sont suffisants aux neurones pour qu'il y ait une croissance axonale, mais les facteurs extra cellulaires sont nécessaires pour une croissance rapide (Polleux and Snider 2010).

Les 3 protéines d'adhésion les plus étudiées dans la croissance neuritique sont L1CAM, NCAM et Ncadhérine. Elles favorisent à la fois la croissance axonale et dendritique, dite croissance neuritique, ce qui a été suggéré par différents types d'expériences. Les neurones cultivés sur des substrats physiologiques tels que des astrocytes ont une croissance neuritique diminuée en présence d'anticorps bloquants les CAMs (Tomaselli, Reichardt, and Bixby 1986). La croissance neuritique est favorisée lorsque les neurones sont cultivés sur substrat artificiel recouvert de L1CAM ou Ncadhérine, de même sur des cellules non neuronales exprimant les 3 CAMs (Bixby and Zhang 1990; P Doherty and Walsh 1994; Lagenaur and Lemmon 1987). Enfin l'application d'anticorps avec fragment Fc humain fusionné à la partie extra cellulaire des CAMs (pour L1 et NCAM) favorise la croissance neuritique de neurones en culture, suggérant que cet effet est lié à une interaction homophile entre CAMs (Patrick Doherty and Walsh 1996). La propriété de promotion de la neuritogénèse par les CAMs est en effet principalement liée à leur interaction homophile, bien que des interactions hétérophiles y jouent un également un rôle.

En faveur de son rôle dans la croissance neuritique, NCAM est fortement exprimé au niveau du bout des neurites en croissance (van den Pol and Kim 1993). NCAM interagit avec les protéines du cytosquelette α tubuline et β tubuline, les deux principaux composants des microtubules, suggérant un rôle plus particulièrement dans l'élongation neuritique (Büttner et al. 2003). Une étude a identifié plusieurs ligands cytosoliques de la partie intracellulaire de NCAM, dont la grande majorité sont reliés à la dynamique du cytosquelette, appuyant l'idée que NCAM puisse faire le lien entre les

facteurs extracellulaires et les modifications de cytosquelette lors de la croissance neuritique (Büttner et al. 2005). Les deux principales voies de signalisation de NCAM se font par la kinase Fyn et le récepteur au FGF qui interagit directement avec NCAM (Beggs et al. 1997; Kiselyov et al. 2003). Plus récemment il a été montré que GDNF promeut la croissance neuritique dans des neurones d'hippocampe et de cortex en culture de manière dépendante à NCAM, via les deux voies de signalisation FGFR et Fyn (Nielsen et al. 2009). La souris KO NCAM est viable, et a des anomalies morphologiques qui impliquent NCAM dans d'autres fonctions que la croissance neuritique : le bulbe olfactif a une taille fortement réduite, témoignant du rôle de NCAM dans la migration des neurones olfactifs (Tomasiewicz , 1993 ; Ono 1994) (Ono et al. 1994; Tomasiewicz et al. 1993); cette souris présente une réduction des fasciculations axonales aboutissant à un déficit de synaptogénèse en CA3 (Cremer et al. 1997).

L1CAM est fortement exprimée dans les neurones en développement chez la souris à E18, dans le cortex cérébral, l'hippocampe, et le corps calleux, puis son expression va en diminuant avec la maturation du SNC (Demyanenko, Tsai, and Maness 1999). L1CAM est concentré dans les axones et le cône de croissance dans le SNC en développement (Joosten and Gribnau 1989). La souris KO présente des anomalies morphologiques sévères qui reflète l'importance des différentes fonctions de L1CAM : croissance neuritique altérée (les dendrites apicales neurones pyramidaux de la couche 5 n'atteignent pas la couche 1), développement hippocampique anormal avec une densité moindre de neurones, corps calleux atrophié du fait de l'échec de beaucoup d'axones à traverser la ligne médiane (Demyanenko, Tsai, and Maness 1999).

Chez la souris KO pour Ncadherine, l'étude de la croissance axonale est difficile du fait de la létalité du phénotype. Chez la drosophile, l'absence d'expression de Ncadherine n'a pas d'effet sur le développement axonal (Iwai et al. 1997). Chez le poisson zèbre, avec la diminution d'expression de Ncadherine, les axones des cellules ganglionnaires de la rétine ont des défauts de fasciculations, et adoptent des trajectoires incorrectes (Masai et al. 2003). L'expression d'une Ncadherine dominant négatif qui empêche l'interaction de Ncadherin avec Catenine et donc sa signalisation vers le cytosquelette, inhibe la croissance axonale in vivo des cellules ganglionnaires chez le xenope (Riehl, 1996)(Riehl et al. 1996). D'autres cadherines, Celsr2 et Celsr3, qui ont sept domaines transmembranaires et des séquences primaires très proches, ont des fonctions opposées dans des cultures d'hippocampe de rat, Celsr2 favorisant la croissance axonale et neuritique (Shima et al. 2007).

Les 5 SALMs, d'abord identifiées comme des protéines à fonction synaptique, favorisent la croissance neuritique dans des cultures de neurones d'hippocampe (P. Y. Wang, Seabold, and Wenthold 2008). NGL-1, qui promeut la synaptogénèse excitatrice, favorise aussi la croissance axonale des neurones thalamiques en culture de manière dépendant à sa liaison avec netrinG1, une protéine ancrée à la membrane (Lin et al. 2003).

Susd2, comme Ncadherine, favorise la synaptogénèse excitatrice et la croissance axonale. Cependant, toutes les protéines décrites ci-dessus favorisent également la croissance dendritique, contrairement à Susd2. L'analogie entre Susd2 et ces protéines sont donc à considérer avec précaution. Il est toutefois intéressant de noter que la distinction entre les différents aspects de la croissance axonale (initiation, élongation, guidage) est en partie artificielle, et tire son origine des paradigmes expérimentaux qui n'observent qu'une des facettes du développement axonal. Ainsi, les CAMs ont aussi été impliquées dans le guidage axonal, et la difficulté des axones à passer la ligne médiane par le corps calleux dans la souris KO L1CAM en est sûrement le meilleur exemple. Ainsi, il serait intéressant pour Susd2 de tester sa capacité de guidage axonal, ce qui nécessiterait de passer à un modèle d'étude in vivo.

2. Rôle de Susd2 et Susd4 dans la croissance dendritique

La structure dendritique a un profond impact sur l'intégration de l'information reçu par le neurone (Arikkath, Cox, and Mason 2012). Par exemple, les neurones corticaux pyramidaux sont organisés en 6 couches, chaque couche ayant sa propre arborisation dendritique en relation avec son rôle fonctionnel (Spruston 2008). Il existe des compartiments dendritiques qui se distinguent par une origine différente des afférences synaptiques : pour les neurones CA1, les dendrites apicales reçoivent des afférences du cortex entorhinal alors que les dendrites basales reçoivent des afférences des neurones hippocampiques CA3. Des mécanismes moléculaires à la fois extrinsèques et intrinsèques sont mis en jeu pour permettre le développement correct des dendrites. Ces mécanismes incluent des molécules sécrétées, des récepteurs de surface cellulaire, des protéines d'adhésion, des molécules de signalisation, des molécules qui régulent l'activité du cytosquelette, le trafic du Golgi, et les facteurs de transcription.

La diminution d'expression de *Susd2* par shARN dans des neurones d'hippocampe à 5 jours in vitro augmente la croissance dendritique avec une augmentation de la longueur totale dendritique résultant d'une augmentation du nombre de dendrites et de leur longueur moyenne. La surexpression de *Susd2* n'a pas d'effet sur le phénotype dendritique. Plusieurs protéines (récepteurs ou protéines d'adhésion) chez les vertébrés ont une fonction de promotion de la croissance dendritique (voir ci-dessous), mais celles l'inhibant sont plus rares : à ma connaissance, seules SEZ6 et le récepteur aux neurotrophines p75 possèdent cette propriété (Gunnarsen et al. 2007; Zagrebelsky et al. 2005). De manière très intéressante, SEZ6 a déjà été discuté en introduction puisque c'est une protéine qui possède plusieurs domaines CCP. Comme *Susd2*, *Sez6* favorise la synaptogénèse excitatrice et a un rôle complexe dans la régulation de la croissance dendritique puisque ses différentes isoformes ont des effets opposés principalement sur la capacité de branchement des dendrites. La morphologie dendritique est aussi plus complexe dans des neurones pyramidaux d'hippocampe ex vivo en culture organotypique chez la souris KO pour p75, alors que la surexpression de p75 diminue la complexité de l'arborisation dendritique (Zagrebelsky et al. 2005).

La diminution d'expression de *Susd4* par shARN a l'effet opposé de *Susd2* en diminuant la croissance dendritique dans les neurones d'hippocampe à 5 jours in vitro. Cependant, le même effet, en plus intense, est présent lors de la surexpression de *Susd4*. Quelques hypothèses peuvent expliquer ce résultat : 1/ La surexpression de *Susd4* n'est pas physiologique et peut aboutir à un phénotype artefactuel, parce que *Susd4* peut exercer une toxicité non spécifique à un haut niveau d'expression, ou plus spécifiquement peut déstructurer l'organisation de protéines qui interagissent avec *Susd4* et participent à sa fonction. Par exemple, c'est probablement ce phénomène qui explique dans certaines conditions expérimentales la diminution paradoxale du nombre de synapses excitatrices lors de la surexpression de *Neuroigin1* en culture, qui altère la fonction de PSD95. 2/ Il se peut également que *Susd4* exerce des actions opposées de manière physiologique en fonction de son niveau d'expression 3/ Enfin, *Susd4* pourrait avoir un rôle complexe de régulation de la croissance dendritique faisant intervenir plusieurs isoformes protéiques avec des rôles distincts, comme pour *Sez6*, ce qui limite l'interprétation des expériences de shARN et de surexpression susceptibles de ne pas concerner toutes les isoformes du gène.

Les protéines d'adhésion, qui comme *SUSD4* favorisent le développement dendritique chez les mammifères ne sont pas légion. Les neurones hippocampiques en culture issus d'une souris triple KO pour les *EphB1*, 2 et 3 ont un développement dendritique altéré, avec une diminution de la longueur dendritique totale et du nombre de dendrites primaires (Hoogenraad et al. 2005). La diminution

d'expression de Grip1 aboutit au même phénotype, lié à l'absence d'EphB2 à la membrane du fait d'un défaut de transport, la surexpression de EphB2 sauvant le phénotype. NCadherine est également impliqué dans le développement dendritique : en culture, l'interaction homophile de Ncadherine en trans entre neurones est nécessaire pour le développement de l'arborisation dendritique induit par l'activité électrique du réseau neuronal (Tan et al. 2010). Cette fonction de Ncadherine nécessite l'intégrité du complexe liant Ncadherine, caténine et le cytosquelette d'actine. Semaphorin4D (Sema4D), une protéine sécrétée, module les arborisation dendritiques et axonales dans des cellules d'hippocampe de rat en culture : Sema4D augmente la complexité de l'arborisation dendritique avec une augmentation du nombre de dendrites secondaires, et complexifie également l'arborisation axonale sans jouer sur l'élongation axonale (Vodrazka et al. 2009). Cet effet est médié par l'interaction entre sema4D et plexinB1 (son récepteur membranaire), avec un rôle de PI3K dans la signalisation intra cellulaire. Enfin, l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de NFkB, connu pour avoir de multiples rôles notamment dans la survie neuronale, est responsable dans le cortex de souris d'une diminution de la complexité de l'arborisation dendritique (Gutierrez et al. 2005). Cette fonction semble être médiée par une voie de signalisation induite par le récepteur membranaire Notch activé par son ligand jagged1 (Bonini et al. 2011).

3. Rôle de Susd2 dans la régulation différentielle entre croissance axonale et dendritique.

Peu de molécules ont été décrit comme régulant de manière différentielle le développement dendritique et axonal (X. Wang, Sterne, and Ye 2014). Le seul exemple de facteur extrinsèque ayant ce type de fonction est la semaphorine 3A (Sema3A), qui dans des cultures de neurones d'hippocampe et de cortex favorise le développement dendritique alors qu'il inhibe la croissance axonale (Shelly et al. 2011). Sema3a inhibe l'activité de cAMP et augmente l'activité de cGMP, alors qu'il a été montré que ces deux molécules de signalisation ont un effet inverse, cAMP favorisant la croissance axonale et inhibant la formation des dendrites (Shelly et al. 2010). En aval de cAMP et cGMP, la voie de signalisation de Sema3a implique la PKG, dont l'inhibition bloque l'effet de Sema3a sur les croissances axonales et dendritiques. Sema3a a donc l'effet inverse de Susd2, qui pourrait agir sur la même voie de signalisation de manière inverse à Sema3a en augmentant l'activité de cAMP et inhibant l'activité de cGMP. De manière intéressante, Galectin1 (Gal1), le seul ligand connu de Susd2 (voir ci-dessous), est capable d'inhiber l'effet de Sema3a par liaison à son récepteur pour favoriser la

croissance axonale dans un modèle de moelle épinière traumatique (Quintá et al. 2014). Gal1, connu dans un autre contexte comme un régulateur de l'adhésion cellulaire, pourrait ici réguler les effets différentiels de *Susd2* et *Sema3a* en modulant les affinités ligand récepteur, *Sema3a*/Complexe *Neuropilin1* et *PlexinA4* d'une part, et *Susd2* et un ligand extracellulaire non encore identifié d'autre part.

D'autres molécules faisant partie de voies de signalisation intra cellulaire ont également un effet bimodal. *CLASP2* a le même effet que *Sema3a* : sa diminution d'expression dans des cultures de neurones corticaux induit une complexification de l'arborisation axonale tout en inhibant la croissance dendritique (Hur et al. 2011). *CLASP2* est une protéine qui se lie aux microtubules, et régule la dynamique des microtubules dans différents types cellulaires (Galjart 2005). *CLASP2* pourrait jouer un rôle dans l'organisation différentielle des microtubules dendritiques et axonaux, ce qui pourrait expliquer son effet bi modal (Conde and Cáceres 2009).

Un seul gène a un effet identique à *Susd2* : *Rit*. *Rit* est une GTPase de la famille des Ras fortement exprimée dans le SNC. Sa fonction a été étudiée dans des neurones d'hippocampe en culture : son inhibition par l'expression d'une forme dominante négative et sa surexpression ont un effet inverse, l'inhibition diminuant la longueur axonale et augmentant la longueur des dendrites (Lein et al. 2007). En aval de *Rit*, la voie de signalisation implique *ERK1/2* kinase. En amont, *Rit* est activé par *BMP7* dont l'effet est modifié par *NGF*. La voie de signalisation *Rit* / *ERK1/2* kinase est donc également une voie de signalisation susceptible d'être empruntée par *Susd2* pour exercer ses effets sur la croissance neuritique.

E. Interacteurs de *Susd2*

Une étude visant à évaluer l'intérêt d'une approche à grande échelle pour rechercher les ligands de protéines d'intérêt par spectrométrie de masse a identifié *Galectin1* (*Gal1*) comme interagissant avec *SUSD2* (Ewing et al. 2007). Cette interaction a été confirmée par co-IP dans une étude s'intéressant à *Susd2* comme cible thérapeutique potentielle dans le cancer du sein (Watson, Evans, and Eglund 2013). *SUSD2* n'est pas présent dans les cellules épithéliales de sein normal, mais est très exprimé dans les lésions cancéreuses, de même que *Gal1*. La localisation de *Gal1* à la surface cellulaire est dépendante de la présence de *SUSD2*. De manière très intéressante, les patrons d'expression en HIS

de Gal1 et Susd2 donnés par l'Allen Brain Atlas montrent une forte expression dans plusieurs noyaux du tronc cérébral qui sont tous des noyaux moteurs, de même qu'une forte expression dans les motoneurones de la moelle épinière de souris adulte.

Les Galectines sont des petites protéines, au nombre de quinze chez les mammifères, qui ont la propriété de se lier au β -galactosides qui peuvent faire partie de certaines glycoprotéines (Elola et al. 2007). Elles ont de multiples fonctions dans la régulation de l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire, la croissance cellulaire, l'apoptose, l'épissage de l'ARNm. Concernant l'adhésion cellulaire, les galectines, qui peuvent être sécrétées dans l'espace extra cellulaire, sont des régulateurs des interactions entre cellules et entre cellules et matrice extra cellulaire, avec une fonction pro ou anti adhésive selon le contexte.

Dans le contexte du SNC, quelques études ont élucidé plusieurs propriétés de Galectin1. Dans un modèle de lésion traumatique de moelle épinière, Gal1 promeut la croissance axonale en inhibant l'inhibition de Sema3A. La Galectin1 se lie au complexe Neuropilin1/PlexinA4 qui est le récepteur de Sema3A, bloquant ainsi la voie de signalisation de Sema3A (Quintá et al. 2014). Dans des cultures de neurones provenant du ganglion dorsal postérieur, GDNF promeut la croissance neuritique et augmente l'expression de Galectin1 par la même voie de signalisation RET-PI3K (Takaku et al. 2013). Gal1 est exprimée dans l'hippocampe de souris adulte, probablement dans les cellules souches neuronales adultes (Sakaguchi et al. 2011). Les souris KO pour Gal1 présentent une altération des capacités de mémoire attribuable à une dysfonction hippocampique. Enfin dans un modèle de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) chez la souris, Gal1 s'accumule dans les axones moteurs avant l'apparition des symptômes de la maladie (Kobayakawa et al. 2014). La souris SLA KO pour Gal1 présente moins de signes de souffrance axonale que la souris Wild Type pour Gal1, suggérant un rôle de Gal1 dans la souffrance axonale dans ce modèle. Là encore cela suggère un lien fonctionnel indirect entre Gal1 et Susd2, qui comme Gal1 est fortement exprimé dans les motoneurones de la moelle épinière de souris, et qui a été identifié comme un gène de susceptibilité dans la SLA (Deng et al. 2013).

V. CONCLUSION

Ce travail de thèse a donc montré que deux nouveaux gènes, *Susd2* et *Susd4*, codant des protéines avec domaines CCP ont une expression neuronale avec une cinétique évoquant une fonction développementale, et sont impliqués dans la synaptogénèse excitatrice et la croissance neuritique. Ces fonctions sont réminiscentes de celles récemment décrites chez deux autres gènes codant des protéines à domaines CCP, *Sez6* et *Srpx2*. Les protéines à domaines CCP constituent donc une nouvelle famille de protéines d'adhésion ayant de multiples fonctions neuro développementales. L'implication des domaines CCP dans l'effet de régulation de la croissance dendritique chez *Susd4* fait peu de doute, les domaines CCP étant les seuls présents dans cette protéine. *Susd2* ne possède qu'un seul domaine CCP, de localisation extra cellulaire proche du domaine transmembranaire, qui est associé à 2 autres domaines extra cellulaires impliqués dans des fonctions d'adhésion : AMOP et VWD. Cependant, aucun de ces deux domaines n'est présent dans des protéines d'adhésion jouant un rôle dans le développement du SNC. Il serait intéressant d'observer si le phénotype associé à la surexpression de *Susd2* (augmentation de longueur et d'arborisation axonale) est modifié avec la surexpression d'une protéine recombinante *Susd2* délétée sans domaine CCP. Quoiqu'il en soit, l'existence de cette nouvelle famille de protéines à domaines CCP pose la question du lien mécanistique entre les fonctions attribuées à ces protéines et le système du complément, par ailleurs impliqué dans la fonction d'élimination synaptique de C1q, qui est une protéine du complément mais ne possédant pas de domaine CCP. L'absence du système du complément chez les protostomes exclut sa participation aux fonctions synaptique de LEV-9 et Hikaru Genki, deux protéines à domaines CCP respectivement décrites chez *C. elegans* et la drosophile (Nonaka and Yoshizaki 2004). Cela suggère que les domaines CCP ont un rôle ancestral dévolu au développement du système nerveux, se traduisant par l'identification récente d'un nombre croissant de protéines à domaines CCP ayant des fonctions neuronales chez les mammifères.

VI. RESUME

Le développement cérébral est une succession de plusieurs étapes aboutissant à l'établissement d'un réseau neuronal. Ce réseau, composé de plusieurs milliards de neurones, est extrêmement complexe du fait des multiples variables qui le caractérise. Citons quelques variables clés pour un neurone donné : sa place exacte au sein du réseau, la morphologie de ses extensions dendritiques, le lieu de projection de son axone, la localisation précise sub cellulaire des contacts (synapses) avec les autres neurones du réseau, la composition moléculaire individuelle de chaque synapse. La précision de la mise en œuvre des étapes du développement cérébral (migration neuronale, dendritogénèse, croissance axonale, synaptogénèse) permet d'aboutir à un réseau fonctionnel. L'orchestration de cette mise en œuvre fait intervenir de nombreux acteurs, notamment des protéines, qui agissent chacun en interaction avec d'autres, en un temps et un lieu déterminé. De nombreux gènes ont été identifiés qui jouent un rôle dans le développement cérébral. Certains codent pour des protéines d'adhésion localisées à la membrane cellulaire qui permettent l'interaction des neurones avec l'environnement extra cellulaire (matrice extra cellulaire et autres cellules). L'identification de ces protéines d'adhésion, et l'étude de leur fonction, tient une place majeure dans la compréhension des mécanismes du développement cérébral. Cela est souligné par la description de mutations ou de variants de ces gènes codant pour des protéines d'adhésion au sein de populations de patients souffrant de diverses maladies neuro psychiatriques : le retard mental, l'autisme, la schizophrénie, les troubles de l'humeur (maladie bipolaire), l'épilepsie. Souvent, ces patients n'ont pas d'anomalies évidentes cérébrales à l'imagerie voire même en histologie, suggérant que des anomalies subtiles de l'architecture structurale et/ou moléculaire du cerveau peuvent avoir des conséquences fonctionnelles majeures.

Le temps que j'ai consacré à cette thèse de Biologie m'a permis de caractériser deux nouveaux gènes, *Susd2* et *Susd4*, qui jouent un rôle dans plusieurs aspects du développement neuronal *in vitro*. Ces gènes codent pour des protéines contenant des domaines CCP (Complement Control Protein), connus depuis longtemps car présents dans de nombreuses protéines participant au système immunitaire du complément et en particulier à sa régulation. Très récemment, des protéines à domaines CCP ont été décrites chez les invertébrés puis chez la souris comme ayant une fonction dans le développement neuronal (*Srpx2* et *Sez6* chez la souris). Les protéines d'adhésion connues pour participer au développement cérébral sont majoritairement organisées en familles qui partagent un même domaine protéique dominant leur composition structurale, laissant à penser

que de nouvelles protéines à domaines CCP sont susceptibles d'y jouer également un rôle. L'existence de nombreuses protéines prédites avec domaines CCP n'appartenant pas au système du complément, et sans fonction connue, m'ont conduit à tenter de caractériser Susd2 et Susd4 qui en font partie.

Susd2 est principalement exprimé dans les neurones au sein de cultures de cellules d'hippocampe de rat. Son expression atteint un pic à un stade post natal précoce, suggérant une fonction développementale. La protéine Susd2 recombinante exprimée dans des neurones en culture a une localisation diffuse, mais est particulièrement enrichie dans les synapses excitatrices. La diminution de l'expression de Susd2 a pour conséquences un défaut de croissance axonale, une augmentation de la croissance dendritique, et une inhibition spécifique de la synaptogénèse excitatrice. Susd4 est également exprimé dans les neurones principalement, avec un pic d'expression au stade embryonnaire, et semble jouer un rôle complexe dans le développement dendritique à la fois sa surexpression et son inhibition impactent négativement la croissance dendritique.

VII. BIBLIOGRAPHIE

- Arikkath, Jyothi, Daniel N Cox, and George Mason. 2012. "Molecular Mechanisms of Dendrite Morphogenesis." *Frontiers in cellular neuroscience* 6(December): 61.
- Banker, G A, and W M Cowan. 1977. "Rat Hippocampal Neurons in Dispersed Cell Culture." *Brain research* 126(3): 397–42.
- Bartlett, W P, and G A Banker. 1984. "An Electron Microscopic Study of the Development of Axons and Dendrites by Hippocampal Neurons in Culture. II. Synaptic Relationships." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4(8): 1954–65.
- Beggs, H E, S C Baragona, J J Hemperly, and P F Maness. 1997. "NCAM140 Interacts with the Focal Adhesion Kinase p125(fak) and the SRC-Related Tyrosine Kinase p59(fyn)." *The Journal of biological chemistry* 272(13): 8310–19.
- Biederer, T, and T C Sudhof. 2001. "CASK and Protein 4.1 Support F-Actin Nucleation on Neurexins." *The Journal of biological chemistry* 276(51): 47869–76.
- Bixby, J L, and R Zhang. 1990. "Purified N-Cadherin Is a Potent Substrate for the Rapid Induction of Neurite Outgrowth." *The Journal of cell biology* 110(4): 1253–60.
- Blundell, Jacqueline et al. 2010. "Neuroigin-1 Deletion Results in Impaired Spatial Memory and Increased Repetitive Behavior." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(6): 2115–29.
- Boda, Enrica et al. 2009. "Selection of Reference Genes for Quantitative Real-Time RT-PCR Studies in Mouse Brain." *Journal of molecular neuroscience : MN* 37(3): 238–53.
- Bolliger, M F, K Frej, K H Winterhalter, and S M Gloor. 2001. "Identification of a Novel Neuroigin in Humans Which Binds to PSD-95 and Has a Widespread Expression." *The Biochemical journal* 356(Pt 2): 581–88.
- Bonini, Sara Anna et al. 2011. "Nuclear Factor κ B-Dependent Neurite Remodeling Is Mediated by Notch Pathway." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(32): 11697–705.
- Borg, J P et al. 1999. "Molecular Analysis of the X11-mLin-2/CASK Complex in Brain." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(4): 1307–16.
- Boucard, Antony A et al. 2005. "A Splice Code for Trans-Synaptic Cell Adhesion Mediated by Binding of Neuroigin 1 to Alpha- and Beta-Neurexins." *Neuron* 48(2): 229–36.
- Boulanger, Lisa M. 2009. "Immune Proteins in Brain Development and Synaptic Plasticity." *Neuron* 64(1): 93–109.

- Bozdagi, Ozlem et al. 2010. "Persistence of Coordinated Long-Term Potentiation and Dendritic Spine Enlargement at Mature Hippocampal CA1 Synapses Requires N-Cadherin." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(30): 9984–89.
- Brennaman, Leann H, Marcia L Moss, and Patricia F Maness. 2014. "EphrinA/EphA-Induced Ectodomain Shedding of Neural Cell Adhesion Molecule Regulates Growth Cone Repulsion through ADAM10 Metalloprotease." *Journal of neurochemistry* 128(2): 267–79.
- Brennaman, Leann Hinkle, and Patricia F Maness. 2008. "Developmental Regulation of GABAergic Interneuron Branching and Synaptic Development in the Prefrontal Cortex by Soluble Neural Cell Adhesion Molecule." *Molecular and cellular neurosciences* 37(4): 781–93.
- Briseño-Roa, Luis, and Jean-Louis Bessereau. 2014. "Proteolytic Processing of the Extracellular Scaffolding Protein LEV-9 Is Required for Clustering Acetylcholine Receptors." *The Journal of biological chemistry* 289(16): 10967–74.
- Buhusi, Mona et al. 2008. "L1 Interaction with Ankyrin Regulates Mediolateral Topography in the Retinocollicular Projection." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(1): 177–88.
- Büttner, Bettina, Christoph Kannicht, Werner Reutter, and Rüdiger Horstkorte. 2003. "The Neural Cell Adhesion Molecule Is Associated with Major Components of the Cytoskeleton." *Biochemical and biophysical research communications* 310(3): 967–71.
- . 2005. "Novel Cytosolic Binding Partners of the Neural Cell Adhesion Molecule: Mapping the Binding Domains of PLC Gamma, LANP, TOAD-64, Syndapin, PP1, and PP2A." *Biochemistry* 44(18): 6938–47.
- Carroll, Maria V, and Robert B Sim. 2011. "Complement in Health and Disease." *Advanced drug delivery reviews* 63(12): 965–75.
- Chavis, P, and G Westbrook. 2001. "Integrins Mediate Functional Pre- and Postsynaptic Maturation at a Hippocampal Synapse." *Nature* 411(6835): 317–21.
- Chidsey, Brandalyn a et al. 2014. "L1CAM Whole Gene Deletion in a Child with L1 Syndrome." *American journal of medical genetics. Part A* 164A(6): 1555–58.
- Chih, Ben, Holly Engelman, and Peter Scheiffele. 2005. "Control of Excitatory and Inhibitory Synapse Formation by Neuroligins." *Science (New York, N.Y.)* 307(5713): 1324–28.
- Chih, Ben, Leora Gollan, and Peter Scheiffele. 2006. "Alternative Splicing Controls Selective Trans-Synaptic Interactions of the Neuroligin-Neurexin Complex." *Neuron* 51(2): 171–78.
- Chu, Yunxiang et al. 2010. "Enhanced Synaptic Connectivity and Epilepsy in C1q Knockout Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(17): 7975–80.
- Comoletti, Davide et al. 2003. "Characterization of the Interaction of a Recombinant Soluble Neuroligin-1 with Neurexin-1beta." *The Journal of biological chemistry* 278(50): 50497–505.

- Conde, Cecilia, and Alfredo Cáceres. 2009. "Microtubule Assembly, Organization and Dynamics in Axons and Dendrites." *Nature reviews. Neuroscience* 10(5): 319–32.
- Craig, Ann Marie, Ethan R Graf, and Michael W Linhoff. 2006. "How to Build a Central Synapse: Clues from Cell Culture." *Trends in neurosciences* 29(1): 8–20.
- Cremer, H, G Chazal, C Goridis, and A Represa. 1997. "NCAM Is Essential for Axonal Growth and Fasciculation in the Hippocampus." *Molecular and cellular neurosciences* 8(5): 323–35.
- Cukier, Holly N et al. 2014. "Exome Sequencing of Extended Families with Autism Reveals Genes Shared across Neurodevelopmental and Neuropsychiatric Disorders." *Molecular autism* 5(1): 1.
- Cuscó, Ivon et al. 2009. "Autism-Specific Copy Number Variants Further Implicate the Phosphatidylinositol Signaling Pathway and the Glutamatergic Synapse in the Etiology of the Disorder." *Human molecular genetics* 18(10): 1795–1804.
- Dahlhaus, Regina et al. 2010. "Overexpression of the Cell Adhesion Protein Neuroligin-1 Induces Learning Deficits and Impairs Synaptic Plasticity by Altering the Ratio of Excitation to Inhibition in the Hippocampus." *Hippocampus* 20(2): 305–22.
- Dalva, Matthew B, Andrew C McClelland, and Matthew S Kayser. 2007. "Cell Adhesion Molecules: Signalling Functions at the Synapse." *Nature reviews. Neuroscience* 8(3): 206–20.
- Davis, J Q, T McLaughlin, and V Bennett. 1993. "Ankyrin-Binding Proteins Related to Nervous System Cell Adhesion Molecules: Candidates to Provide Transmembrane and Intercellular Connections in Adult Brain." *The Journal of cell biology* 121(1): 121–33.
- Dean, Camin et al. 2003. "Neurexin Mediates the Assembly of Presynaptic Terminals." *Nature neuroscience* 6(7): 708–16.
- Deitch, J S, and G A Banker. 1993. "An Electron Microscopic Analysis of Hippocampal Neurons Developing in Culture: Early Stages in the Emergence of Polarity." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13(10): 4301–15.
- Demyanenko, G P, A Y Tsai, and P F Maness. 1999. "Abnormalities in Neuronal Process Extension, Hippocampal Development, and the Ventricular System of L1 Knockout Mice." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(12): 4907–20.
- Deng, Min et al. 2013. "Genome-Wide Association Analyses in Han Chinese Identify Two New Susceptibility Loci for Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Nature genetics* 45(6): 697–700.
- Depienne, Christel et al. 2011. "Mutations and Deletions in PCDH19 Account for Various Familial or Isolated Epilepsies in Females." *Human mutation* 32(1): E1959–75.
- Diestel, Simone, C Leann Hinkle, Brigitte Schmitz, and Patricia F Maness. 2005. "NCAM140 Stimulates Integrin-Dependent Cell Migration by Ectodomain Shedding." *Journal of neurochemistry* 95(6): 1777–84.
- Doherty, P, and F S Walsh. 1994. "Signal Transduction Events Underlying Neurite Outgrowth Stimulated by Cell Adhesion Molecules." *Current opinion in neurobiology* 4(1): 49–55.

- Doherty, P, G Williams, and E J Williams. 2000. "CAMs and Axonal Growth: A Critical Evaluation of the Role of Calcium and the MAPK Cascade." *Molecular and cellular neurosciences* 16(4): 283–95.
- Doherty, Patrick, and Frank S Walsh. 1996. "CAM-FGF Receptor Interactions :." 111(0049): 99–111.
- Donohoe, G et al. 2013. "Neuropsychological Effects of the CSMD1 Genome-Wide Associated Schizophrenia Risk Variant rs10503253." *Genes, brain, and behavior* 12(2): 203–9.
- Dotti, C G, C A Sullivan, and G A Banker. 1988. "The Establishment of Polarity by Hippocampal Neurons in Culture." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8(4): 1454–68.
- Elola, M T et al. 2007. "Galectins: Matricellular Glycan-Binding Proteins Linking Cell Adhesion, Migration, and Survival." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64(13): 1679–1700.
- Ewing, Rob M et al. 2007. "Large-Scale Mapping of Human Protein-Protein Interactions by Mass Spectrometry." *Molecular systems biology* 3(89): 89.
- Feng, Jinong et al. 2006. "High Frequency of Neurexin 1beta Signal Peptide Structural Variants in Patients with Autism." *Neuroscience letters* 409(1): 10–13.
- Floris, Chiara et al. 2008. "Two Patients with Balanced Translocations and Autistic Disorder: CSMD3 as a Candidate Gene for Autism Found in Their Common 8q23 Breakpoint Area." *European journal of human genetics : EJHG* 16(6): 696–704.
- Friedman, J M et al. 2006. "Oligonucleotide Microarray Analysis of Genomic Imbalance in Children with Mental Retardation." *American journal of human genetics* 79(3): 500–513.
- Fu, Yu, and Z Josh Huang. 2010. "Differential Dynamics and Activity-Dependent Regulation of Alpha- and Beta-Neurexins at Developing GABAergic Synapses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(52): 22699–704.
- Fujita, Eriko et al. 2006. "Oligo-Asthenozoospermia in Mice Cell Adhesion Molecule in the Immunoglobulin Superfamily Oligo-Asthenozoospermia in Mice Lacking RA175 / TSLC1 / SynCAM / IGSF4A , a Cell Adhesion Molecule in the Immunoglobulin Superfamily."
- Galjart, Niels. 2005. "CLIPs and CLASPs and Cellular Dynamics." *Nature reviews. Molecular cell biology* 6(6): 487–98.
- Garner, Craig C, Clarissa L Waites, and Noam E Ziv. 2006. "Synapse Development: Still Looking for the Forest, Still Lost in the Trees." *Cell and tissue research* 326(2): 249–62.
- Gautam, M et al. 1996. "Defective Neuromuscular Synaptogenesis in Agrin-Deficient Mutant Mice." *Cell* 85(4): 525–35.
- Gendrel, Marie, Georgia Rapti, Janet E Richmond, and Jean-Louis Bessereau. 2009. "A Secreted Complement-Control-Related Protein Ensures Acetylcholine Receptor Clustering." *Nature* 461(7266): 992–96.

- "Genome-Wide Association Study Identifies Five New Schizophrenia Loci." 2011. *Nature genetics* 43(10): 969–76.
- Gibson, Nicholas J. "Cell Adhesion Molecules in Context: CAM Function Depends on the Neighborhood." *Cell adhesion & migration* 5(1): 48–51.
- Gilbert, M, J Smith, A J Roskams, and V J Auld. 2001. "Neurologin 3 Is a Vertebrate Gliotactin Expressed in the Olfactory Ensheathing Glia, a Growth-Promoting Class of Macroglia." *Glia* 34(3): 151–64.
- Grabrucker, Andreas, Bianca Vaida, Jürgen Bockmann, and Tobias M Boeckers. 2009. "Synaptogenesis of Hippocampal Neurons in Primary Cell Culture." *Cell and tissue research* 338(3): 333–41.
- Graf, Ethan R et al. 2004. "Neurexins Induce Differentiation of GABA and Glutamate Postsynaptic Specializations via Neuroligins." *Cell* 119(7): 1013–26.
- Graus-Porta, D et al. 2001. "Beta1-Class Integrins Regulate the Development of Laminae and Folia in the Cerebral and Cerebellar Cortex." *Neuron* 31(3): 367–79.
- Gunnarsen, Jenny M et al. 2007. "Sez-6 Proteins Affect Dendritic Arborization Patterns and Excitability of Cortical Pyramidal Neurons." *Neuron* 56(4): 621–39.
- Gutierrez, Humberto, Valerie a Hale, Xavier Dolcet, and Alun Davies. 2005. "NF-kappaB Signalling Regulates the Growth of Neural Processes in the Developing PNS and CNS." *Development (Cambridge, England)* 132(7): 1713–26.
- Hertel, Nicole, and Christoph Redies. 2011. "Absence of Layer-Specific Cadherin Expression Profiles in the Neocortex of the Reeler Mutant Mouse." *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 21(5): 1105–17.
- Hinkle, C Leann, Simone Diestel, Jeffrey Lieberman, and Patricia F Maness. 2006. "Metalloprotease-Induced Ectodomain Shedding of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)." *Journal of neurobiology* 66(12): 1378–95.
- Holmquist, Emelie et al. 2013. "Sushi Domain-Containing Protein 4 (SUSD4) Inhibits Complement by Disrupting the Formation of the Classical C3 Convertase." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27(6): 2355–66.
- Hoogenraad, Casper C et al. 2005. "GRIP1 Controls Dendrite Morphogenesis by Regulating EphB Receptor Trafficking." *Nature neuroscience* 8(7): 906–15.
- Hortsch, Michael, Kakanahalli Nagaraj, and Tanja A Godenschwege. 2009. "The Interaction between L1-Type Proteins and Ankyrins--a Master Switch for L1-Type CAM Function." *Cellular & molecular biology letters* 14(1): 57–69.
- Hosak, Ladislav. 2013. "New Findings in the Genetics of Schizophrenia." *World journal of psychiatry* 3(3): 57–61.

- Hoshino, M, E Suzuki, Y Nabeshima, and C Hama. 1996. "Hikaru Genki Protein Is Secreted into Synaptic Clefts from an Early Stage of Synapse Formation in *Drosophila*." *Development (Cambridge, England)* 122(2): 589–97.
- Hur, Eun-Mi et al. 2011. "GSK3 Controls Axon Growth via CLASP-Mediated Regulation of Growth Cone Microtubules." *Genes & development* 25(18): 1968–81.
- Ichtchenko, K et al. 1995. "Neuroigin 1: A Splice Site-Specific Ligand for Beta-Neurexins." *Cell* 81(3): 435–43.
- Ichtchenko, K, T Nguyen, and T C Südhof. 1996. "Structures, Alternative Splicing, and Neurexin Binding of Multiple Neuroligins." *The Journal of biological chemistry* 271(5): 2676–82.
- Iijima, Takatoshi et al. 2011. "SAM68 Regulates Neuronal Activity-Dependent Alternative Splicing of Neurexin-1." *Cell* 147(7): 1601–14.
- Inoue, Eiji et al. 2009. "Synaptic Activity Prompts Gamma-Secretase-Mediated Cleavage of EphA4 and Dendritic Spine Formation." *The Journal of cell biology* 185(3): 551–64.
- Irie, M et al. 1997. "Binding of Neuroligins to PSD-95." *Science (New York, N.Y.)* 277(5331): 1511–15.
- Iwai, Y et al. 1997. "Axon Patterning Requires DN-Cadherin, a Novel Neuronal Adhesion Receptor, in the *Drosophila* Embryonic CNS." *Neuron* 19(1): 77–89.
- Jamain, Stéphane et al. 2003. "Mutations of the X-Linked Genes Encoding Neuroligins NLGN3 and NLGN4 Are Associated with Autism." *Nature genetics* 34(1): 27–29.
- Jones, Allan R, Caroline C Overly, and Susan M Sunkin. 2009. "The Allen Brain Atlas: 5 Years and Beyond." *Nature reviews. Neuroscience* 10(11): 821–28.
- Joosten, E A, and A A Gribnau. 1989. "Immunocytochemical Localization of Cell Adhesion Molecule L1 in Developing Rat Pyramidal Tract." *Neuroscience letters* 100(1-3): 94–98.
- Jung, Sang-Yong et al. 2010. "Input-Specific Synaptic Plasticity in the Amygdala Is Regulated by Neuroigin-1 via Postsynaptic NMDA Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(10): 4710–15.
- Kalus, Ina et al. 2006. "Proteolytic Cleavage of the Neural Cell Adhesion Molecule by ADAM17/TACE Is Involved in Neurite Outgrowth." *Journal of neurochemistry* 98(1): 78–88.
- Kang, Yunhee et al. 2008. "Induction of GABAergic Postsynaptic Differentiation by Alpha-Neurexins." *The Journal of biological chemistry* 283(4): 2323–34.
- Kattenstroth, Gunnar et al. 2004. "Postsynaptic N-Methyl-D-Aspartate Receptor Function Requires Alpha-Neurexins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(8): 2607–12.
- Kim, Jinsook et al. 2011. "Characterization of Nectin Processing Mediated by Presenilin-Dependent Γ -Secretase." *Journal of neurochemistry* 119(5): 945–56.

- Kim, Juhyun et al. 2008. "Neuroigin-1 Is Required for Normal Expression of LTP and Associative Fear Memory in the Amygdala of Adult Animals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(26): 9087–92.
- Kim, Mary H, Jenny M Gunnarsen, and Seong-Seng Tan. 2002. "Localized Expression of the Seizure-Related Gene SEZ-6 in Developing and Adult Forebrains." *Mechanisms of development* 118(1-2): 171–74.
- Kim, Seho et al. 2006. "NGL Family PSD-95-Interacting Adhesion Molecules Regulate Excitatory Synapse Formation." *Nature neuroscience* 9(10): 1294–1301.
- Kirkitadze, M D, and P N Barlow. 2001. "Structure and Flexibility of the Multiple Domain Proteins That Regulate Complement Activation." *Immunological reviews* 180: 146–61.
- Kiselyov, Vladislav V et al. 2003. "Structural Basis for a Direct Interaction between FGFR1 and NCAM and Evidence for a Regulatory Role of ATP." *Structure (London, England : 1993)* 11(6): 691–701.
- Ko, Jaewon et al. 2006. "SALM Synaptic Cell Adhesion-like Molecules Regulate the Differentiation of Excitatory Synapses." *Neuron* 50(2): 233–45.
- . 2011. "Neuroligins/LRRTMs Prevent Activity- and Ca²⁺/calmodulin-Dependent Synapse Elimination in Cultured Neurons." *The Journal of cell biology* 194(2): 323–34.
- . 2012. "The Leucine-Rich Repeat Superfamily of Synaptic Adhesion Molecules: LRRTMs and Slitrks." *Molecules and cells* 34(4): 335–40.
- Ko, Jaewon, Marc V Fuccillo, Robert C Malenka, and Thomas C Südhof. 2009. "LRRTM2 Functions as a Neurexin Ligand in Promoting Excitatory Synapse Formation." *Neuron* 64(6): 791–98.
- Kobayakawa, Yuko et al. 2014. "Galectin-1 Deficiency Improves Axonal Swelling of Motor Neurons in SOD1(G93A) Transgenic Mice." *Neuropathology and applied neurobiology*.
- Kobe, B, and J Deisenhofer. "Crystal Structure of Porcine Ribonuclease Inhibitor, a Protein with Leucine-Rich Repeats." *Nature* 366(6457): 751–56.
- Koiliari, Erasmia et al. 2014. "The CSMD1 Genome-Wide Associated Schizophrenia Risk Variant rs10503253 Affects General Cognitive Ability and Executive Function in Healthy Males." *Schizophrenia research* 154(1-3): 42–47.
- Kraus, Damian M et al. 2006. "CSMD1 Is a Novel Multiple Domain Complement-Regulatory Protein Highly Expressed in the Central Nervous System and Epithelial Tissues." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176(7): 4419–30.
- Krueger, Dilja D, Liam P Tuffy, Theofilos Papadopoulos, and Nils Brose. 2012. "The Role of Neurexins and Neuroligins in the Formation, Maturation, and Function of Vertebrate Synapses." *Current Opinion in Neurobiology* 22(3): 412–22.
- Kwon, Hyung-Bae et al. 2012. "Neuroigin-1-Dependent Competition Regulates Cortical Synaptogenesis and Synapse Number." *Nature neuroscience* 15(12): 1667–74.

- Kwon, Jae Young et al. 2004. "Ethanol-Response Genes and Their Regulation Analyzed by a Microarray and Comparative Genomic Approach in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Genomics* 83(4): 600–614.
- Lagenaur, C, and V Lemmon. 1987. "An L1-like Molecule, the 8D9 Antigen, Is a Potent Substrate for Neurite Extension." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(21): 7753–57.
- Lee, Hanson, Camin Dean, and Ehud Isacoff. 2010. "Alternative Splicing of Neuroligin Regulates the Rate of Presynaptic Differentiation." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(34): 11435–46.
- Lee, Sung-Jin, Takeshi Uemura, Tomoyuki Yoshida, and Masayoshi Mishina. 2012. "GluR62 Assembles Four Neurexins into Trans-Synaptic Triad to Trigger Synapse Formation." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32(13): 4688–4701.
- Lein, Pamela J et al. 2007. "The Novel GTPase Rit Differentially Regulates Axonal and Dendritic Growth." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(17): 4725–36.
- Levinson, Joshua N et al. 2005. "Neuroligins Mediate Excitatory and Inhibitory Synapse Formation: Involvement of PSD-95 and Neurexin-1beta in Neuroligin-Induced Synaptic Specificity." *The Journal of biological chemistry* 280(17): 17312–19.
- Lim, Seung T, Allison Chang, Rita E Giuliano, and Howard J Federoff. 2012. "Ectodomain Shedding of Nectin-1 Regulates the Maintenance of Dendritic Spine Density." *Journal of neurochemistry* 120(5): 741–51.
- Lin, John C, Wei-Hsien Ho, Austin Gurney, and Arnon Rosenthal. 2003. "The Netrin-G1 Ligand NGL-1 Promotes the Outgrowth of Thalamocortical Axons." *Nature neuroscience* 6(12): 1270–76.
- Linhoff, Michael W et al. 2009. "An Unbiased Expression Screen for Synaptogenic Proteins Identifies the LRRTM Protein Family as Synaptic Organizers." *Neuron* 61(5): 734–49.
- Lisé, M-F, and a El-Husseini. 2006. "The Neuroligin and Neurexin Families: From Structure to Function at the Synapse." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63(16): 1833–49.
- Maccarrone, Giuseppina et al. 2013. "Psychiatric Patient Stratification Using Biosignatures Based on Cerebrospinal Fluid Protein Expression Clusters." *Journal of psychiatric research* 47(11): 1572–80.
- Mah, Won et al. 2010. "Selected SALM (synaptic Adhesion-like Molecule) Family Proteins Regulate Synapse Formation." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(16): 5559–68.
- Maretzky, Thorsten et al. 2005. "L1 Is Sequentially Processed by Two Differently Activated Metalloproteases and Presenilin/gamma-Secretase and Regulates Neural Cell Adhesion, Cell Migration, and Neurite Outgrowth." *Molecular and cellular biology* 25(20): 9040–53.

- Masai, Ichiro et al. 2003. "N-Cadherin Mediates Retinal Lamination, Maintenance of Forebrain Compartments and Patterning of Retinal Neurites." *Development (Cambridge, England)* 130(11): 2479–94.
- Matsushima, N et al. 2005. "Structural Analysis of Leucine-Rich-Repeat Variants in Proteins Associated with Human Diseases." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62(23): 2771–91.
- Mazzeu, J F et al. 2010. "Deletions Encompassing 1q41q42.1 and Clinical Features of Autosomal Dominant Robinow Syndrome." *Clinical genetics* 77(4): 404–7.
- Mendez, Pablo et al. 2010. "N-Cadherin Mediates Plasticity-Induced Long-Term Spine Stabilization." *The Journal of cell biology* 189(3): 589–600.
- Milner, Richard, and Iain L Campbell. 2002. "The Integrin Family of Cell Adhesion Molecules Has Multiple Functions within the CNS." *Journal of neuroscience research* 69(3): 286–91.
- Missler, M, R Fernandez-Chacon, and T C Südhof. 1998. "The Making of Neurexins." *Journal of neurochemistry* 71(4): 1339–47.
- Missler, M, and T C Südhof. 1998. "Neurexins: Three Genes and 1001 Products." *Trends in genetics : TIG* 14(1): 20–26.
- Missler, Markus et al. 2003. "Alpha-Neurexins Couple Ca²⁺ Channels to Synaptic Vesicle Exocytosis." *Nature* 423(6943): 939–48.
- Mitsui, Shinichi et al. 2013. "A Mental Retardation Gene, motopsin/prss12, Modulates Cell Morphology by Interaction with Seizure-Related Gene 6." *Biochemical and biophysical research communications* 436(4): 638–44.
- Mody, M et al. 2001. "Genome-Wide Gene Expression Profiles of the Developing Mouse Hippocampus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(15): 8862–67.
- Molinari, Florence, Marlène Rio, Arnold Munnich, and Laurence Colleaux. 2003. "[Neurotrypsin Mutations and Mental Retardation]." *Médecine sciences : M/S* 19(5): 525–27.
- Mulley, John C et al. 2011. "The Role of Seizure-Related SEZ6 as a Susceptibility Gene in Febrile Seizures." *Neurology research international* 2011: 917565.
- Nam, Christine I, and Lu Chen. 2005. "Postsynaptic Assembly Induced by Neurexin-Neuroigin Interaction and Neurotransmitter." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(17): 6137–42.
- Nam, Jungyong, Won Mah, and Eunjoon Kim. 2011. "The SALM/Lrfrn Family of Leucine-Rich Repeat-Containing Cell Adhesion Molecules." *Seminars in cell & developmental biology* 22(5): 492–98.
- Nielsen, Janne et al. 2009. "Role of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)-Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Interactions in Induction of Neurite Outgrowth and Identification of a Binding Site for NCAM in the Heel Region of GDNF." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(36): 11360–76.

- Nishimura, Kazunari et al. 2003. "L1-Dependent Neuritogenesis Involves ankyrinB That Mediates L1-CAM Coupling with Retrograde Actin Flow." *The Journal of cell biology* 163(5): 1077–88.
- Nishimura-Akiyoshi, Sachiko, Kimie Niimi, Toshiaki Nakashiba, and Shigeyoshi Itohara. 2007. "Axonal Netrin-Gs Transneuronally Determine Lamina-Specific Subdendritic Segments." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(37): 14801–6.
- Nonaka, Masaru, and Fumiko Yoshizaki. 2004. "Evolution of the Complement System." *Molecular immunology* 40(12): 897–902.
- O'Brien, R J et al. 1999. "Synaptic Clustering of AMPA Receptors by the Extracellular Immediate-Early Gene Product Narp." *Neuron* 23(2): 309–23.
- O'Brien, Richard et al. 2002. "Synaptically Targeted Narp Plays an Essential Role in the Aggregation of AMPA Receptors at Excitatory Synapses in Cultured Spinal Neurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(11): 4487–98.
- Occhi, Gianluca, Alessandra Rampazzo, Giorgia Beffagna, and Gian Antonio Danieli. 2002. "Identification and Characterization of Heart-Specific Splicing of Human Neurexin 3 mRNA (NRXN3)." *Biochemical and biophysical research communications* 298(1): 151–55.
- Ono, K, H Tomaszewicz, T Magnuson, and U Rutishauser. 1994. "N-CAM Mutation Inhibits Tangential Neuronal Migration and Is Phenocopied by Enzymatic Removal of Polysialic Acid." *Neuron* 13(3): 595–609.
- Osaki, George, Shinichi Mitsui, and Kazunari Yuri. 2011. "The Distribution of the Seizure-Related Gene 6 (Sez-6) Protein during Postnatal Development of the Mouse Forebrain Suggests Multiple Functions for This Protein: An Analysis Using a New Antibody." *Brain research* 1386: 58–69.
- Pandolfo, Massimo. 2013. "Pediatric Epilepsy Genetics." *Current opinion in neurology* 26(2): 137–45.
- Paraoanu, Laura Elena, Michaela Becker-Roeck, Elmar Christ, and Paul Gottlob Layer. 2006. "Expression Patterns of Neurexin-1 and Neuroligins in Brain and Retina of the Chick Embryo: Neuroligin-3 Is Absent in Retina." *Neuroscience letters* 395(2): 114–17.
- Petralia, Ronald S, Nathalie Sans, Ya-Xian Wang, and Robert J Wenthold. 2005. "Ontogeny of Postsynaptic Density Proteins at Glutamatergic Synapses." *Molecular and cellular neurosciences* 29(3): 436–52.
- Piechotta, Kerstin, Irina Dudanova, and Markus Missler. 2006. "The Resilient Synapse: Insights from Genetic Interference of Synaptic Cell Adhesion Molecules." *Cell and tissue research* 326(2): 617–42.
- Pillai-Nair, Neeta et al. 2005. "Neural Cell Adhesion Molecule-Secreting Transgenic Mice Display Abnormalities in GABAergic Interneurons and Alterations in Behavior." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(18): 4659–71.
- Van den Pol, A N, and W T Kim. 1993. "NILE/L1 and NCAM-Polysialic Acid Expression on Growing Axons of Isolated Neurons." *The Journal of comparative neurology* 332(2): 237–57.

- Polleux, F, and William Snider. 2010. "Initiating and Growing an Axon." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(4): a001925.
- Poulopoulos, Alexandros et al. 2009. "Neurologin 2 Drives Postsynaptic Assembly at Perisomatic Inhibitory Synapses through Gephyrin and Collybistin." *Neuron* 63(5): 628–42.
- Prange, Oliver et al. 2004. "A Balance between Excitatory and Inhibitory Synapses Is Controlled by PSD-95 and Neurologin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(38): 13915–20.
- Püsichel, A W, and H Betz. 1995. "Neurexins Are Differentially Expressed in the Embryonic Nervous System of Mice." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15(4): 2849–56.
- Quintá, H R, J M Pasquini, G A Rabinovich, and L A Pasquini. 2014. "Glycan-Dependent Binding of Galectin-1 to Neuropilin-1 Promotes Axonal Regeneration after Spinal Cord Injury." *Cell death and differentiation* 21(6): 941–55.
- Raymond, F Lucy, and Patrick Tarpey. 2006. "The Genetics of Mental Retardation." *Human molecular genetics* 15 Spec No(2): R110–6.
- Redies, Christoph, Nicole Hertel, and Christian A Hübner. 2012. "Cadherins and Neuropsychiatric Disorders." *Brain research* 1470: 130–44.
- Reinthal, Eva M et al. 2014. "Analysis of ELP4, SRPX2, and Interacting Genes in Typical and Atypical Rolandic Epilepsy." *Epilepsia* 55(8): e89–93.
- Restituto, Sophie et al. 2011. "Synaptic Autoregulation by Metalloproteases and Γ -Secretase." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(34): 12083–93.
- Riehl, R et al. 1996. "Cadherin Function Is Required for Axon Outgrowth in Retinal Ganglion Cells in Vivo." *Neuron* 17(5): 837–48.
- Roll, Patrice et al. 2006. "SRPX2 Mutations in Disorders of Language Cortex and Cognition." *Human molecular genetics* 15(7): 1195–1207.
- . 2010. "Molecular Networks Implicated in Speech-Related Disorders: FOXP2 Regulates the SRPX2/uPAR Complex." *Human molecular genetics* 19(24): 4848–60.
- Rose, Emma J et al. 2013. "Neural Effects of the CSMD1 Genome-Wide Associated Schizophrenia Risk Variant rs10503253." *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 162B(6): 530–37.
- Royer-Zemmour, Barbara et al. 2008. "Epileptic and Developmental Disorders of the Speech Cortex: Ligand/receptor Interaction of Wild-Type and Mutant SRPX2 with the Plasminogen Activator Receptor uPAR." *Human molecular genetics* 17(23): 3617–30.
- Rujescu, Dan et al. 2009. "Disruption of the Neurexin 1 Gene Is Associated with Schizophrenia." *Human molecular genetics* 18(5): 988–96.

- Sakaguchi, Masanori et al. 2011. "Impaired Spatial and Contextual Memory Formation in Galectin-1 Deficient Mice." *Molecular brain* 4(1): 33.
- Salmi, Manal et al. 2013. "Tubacin Prevents Neuronal Migration Defects and Epileptic Activity Caused by Rat SrpX2 Silencing in Utero." *Brain : a journal of neurology* 136(Pt 8): 2457–73.
- Sara, Yildirim et al. 2005. "Selective Capability of SynCAM and Neuroligin for Functional Synapse Assembly." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(1): 260–70.
- Scheiffele, P et al. 2000. "Neuroligin Expressed in Nonneuronal Cells Triggers Presynaptic Development in Contacting Axons." *Cell* 101(6): 657–69.
- Schultz, J, F Milpetz, P Bork, and C P Ponting. 1998. "SMART, a Simple Modular Architecture Research Tool: Identification of Signaling Domains." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(11): 5857–64.
- Seabold, Gail K et al. 2008. "The SALM Family of Adhesion-like Molecules Forms Heteromeric and Homomeric Complexes." *The Journal of biological chemistry* 283(13): 8395–8405.
- Senkov, Oleg et al. 2006. "Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule Is Involved in Induction of Long-Term Potentiation and Memory Acquisition and Consolidation in a Fear-Conditioning Paradigm." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(42): 10888–898.
- Shaffer, Lisa G et al. 2007. "The Discovery of Microdeletion Syndromes in the Post-Genomic Era: Review of the Methodology and Characterization of a New 1q41q42 Microdeletion Syndrome." *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 9(9): 607–16.
- Shelly, Maya et al. 2010. "Local and Long-Range Reciprocal Regulation of cAMP and cGMP in Axon/dendrite Formation." *Science (New York, N.Y.)* 327(5965): 547–52.
- . 2011. "Semaphorin3A Regulates Neuronal Polarization by Suppressing Axon Formation and Promoting Dendrite Growth." *Neuron* 71(3): 433–46.
- Shima, Yasuyuki et al. 2007. "Opposing Roles in Neurite Growth Control by Two Seven-Pass Transmembrane Cadherins." *Nature neuroscience* 10(8): 963–69.
- Shimizu, Atsushi et al. 2003. "A Novel Giant Gene CSMD3 Encoding a Protein with CUB and Sushi Multiple Domains: A Candidate Gene for Benign Adult Familial Myoclonic Epilepsy on Human Chromosome 8q23.3-q24.1." *Biochemical and biophysical research communications* 309(1): 143–54.
- Shimizu-Nishikawa, K et al. 1995. "Cloning and Expression of SEZ-6, a Brain-Specific and Seizure-Related cDNA." *Brain research. Molecular brain research* 28(2): 201–10.
- Sia, G M, R L Clem, and R L Haganir. 2013. "The Human Language-Associated Gene SRPX2 Regulates Synapse Formation and Vocalization in Mice." *Science (New York, N.Y.)* 342(6161): 987–91.

- Soler-Llavina, Gilberto J et al. 2011. "The Neurexin Ligands, Neuroligins and Leucine-Rich Repeat Transmembrane Proteins, Perform Convergent and Divergent Synaptic Functions in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(40): 16502–9.
- Song, J Y, K Ichtchenko, T C Südhof, and N Brose. 1999. "Neuroligin 1 Is a Postsynaptic Cell-Adhesion Molecule of Excitatory Synapses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(3): 1100–1105.
- Spruston, Nelson. 2008. "Pyramidal Neurons: Dendritic Structure and Synaptic Integration." *Nature reviews. Neuroscience* 9(3): 206–21.
- Srivastava, Nishi et al. 2013. "EphB2 Receptor Forward Signaling Controls Cortical Growth Cone Collapse via Nck and Pak." *Molecular and cellular neurosciences* 52: 106–16.
- Stäubli, U, D Chun, and G Lynch. 1998. "Time-Dependent Reversal of Long-Term Potentiation by an Integrin Antagonist." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(9): 3460–69.
- Stead, John D H et al. 2006. "Transcriptional Profiling of the Developing Rat Brain Reveals That the Most Dramatic Regional Differentiation in Gene Expression Occurs Postpartum." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(1): 345–53.
- Steen, Vidar M et al. 2013. "Neuropsychological Deficits in Mice Depleted of the Schizophrenia Susceptibility Gene CSMD1." *PloS one* 8(11): e79501.
- Südhof, Thomas C. 2008. "Neuroligins and Neurexins Link Synaptic Function to Cognitive Disease." *Nature* 455(7215): 903–11.
- Sugahara, Tetsuo et al. 2007. "Isolation of a Novel Mouse Gene, mSVS-1/SUSD2, Reversing Tumorigenic Phenotypes of Cancer Cells in Vitro." *Cancer science* 98(6): 900–908.
- Sutor, B, and H J Luhmann. 1995. "Development of Excitatory and Inhibitory Postsynaptic Potentials in the Rat Neocortex." *Perspectives on developmental neurobiology* 2(4): 409–19.
- Suzuki, Kunimichi et al. 2012. "Activity-Dependent Proteolytic Cleavage of Neuroligin-1." *Neuron* 76(2): 410–22.
- Takaku, Shizuka et al. 2013. "GDNF Promotes Neurite Outgrowth and Upregulates Galectin-1 through the RET/PI3K Signaling in Cultured Adult Rat Dorsal Root Ganglion Neurons." *Neurochemistry international* 62(3): 330–39.
- Tan, Zhu-Jun et al. 2010. "N-Cadherin-Dependent Neuron-Neuron Interaction Is Required for the Maintenance of Activity-Induced Dendrite Growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(21): 9873–78.
- Tanaka, Hiroki et al. 2011. "Structural Basis for Variant-Specific Neuroligin-Binding by A-Neurexin." *PloS one* 6(4): e19411.

- Taniguchi, Hiroki, Daisuke Kawauchi, Kazuhiko Nishida, and Fujio Murakami. 2006. "Classic Cadherins Regulate Tangential Migration of Precerebellar Neurons in the Caudal Hindbrain." *Development (Cambridge, England)* 133(10): 1923–31.
- Taxman, Debra J et al. 2006. "Criteria for Effective Design, Construction, and Gene Knockdown by shRNA Vectors." *BMC biotechnology* 6: 7.
- Togashi, Hideru et al. 2002. "Cadherin Regulates Dendritic Spine Morphogenesis." *Neuron* 35(1): 77–89.
- Tomaselli, K J, L F Reichardt, and J L Bixby. 1986. "Distinct Molecular Interactions Mediate Neuronal Process Outgrowth on Non-Neuronal Cell Surfaces and Extracellular Matrices." *The Journal of cell biology* 103(6 Pt 2): 2659–72.
- Tomasiewicz, H et al. 1993. "Genetic Deletion of a Neural Cell Adhesion Molecule Variant (N-CAM-180) Produces Distinct Defects in the Central Nervous System." *Neuron* 11(6): 1163–74.
- Tu, Zhidan, Mark Cohen, Hong Bu, and Feng Lin. 2010. "Tissue Distribution and Functional Analysis of Sushi Domain-Containing Protein 4." *The American journal of pathology* 176(5): 2378–84.
- Ullrich, B, Y A Ushkaryov, and T C Südhof. 1995. "Cartography of Neurexins: More than 1000 Isoforms Generated by Alternative Splicing and Expressed in Distinct Subsets of Neurons." *Neuron* 14(3): 497–507.
- Ushkaryov, Y A et al. 1994. "Conserved Domain Structure of Beta-Neurexins. Unusual Cleaved Signal Sequences in Receptor-like Neuronal Cell-Surface Proteins." *The Journal of biological chemistry* 269(16): 11987–92.
- Ushkaryov, Y A, A G Petrenko, M Geppert, and T C Südhof. 1992. "Neurexins: Synaptic Cell Surface Proteins Related to the Alpha-Latrotoxin Receptor and Laminin." *Science (New York, N.Y.)* 257(5066): 50–56.
- Varoqueaux, Frédérique et al. 2006. "Neuroligins Determine Synapse Maturation and Function." *Neuron* 51(6): 741–54.
- Vawter, M P et al. 2001. "Characterization of Human Cleaved N-CAM and Association with Schizophrenia." *Experimental neurology* 172(1): 29–46.
- Vodrazka, Peter et al. 2009. "The Semaphorin 4D-Plexin-B Signalling Complex Regulates Dendritic and Axonal Complexity in Developing Neurons via Diverse Pathways." *The European journal of neuroscience* 30(7): 1193–1208.
- Wang, Chang-Yu et al. 2006. "A Novel Family of Adhesion-like Molecules That Interacts with the NMDA Receptor." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(8): 2174–83.
- Wang, Philip Y, Gail K Seabold, and Robert J Wenthold. 2008. "Synaptic Adhesion-like Molecules (SALMs) Promote Neurite Outgrowth." *Molecular and cellular neurosciences* 39(1): 83–94.

- Wang, Xin, Gabriella R Sterne, and Bing Ye. 2014. "Regulatory Mechanisms Underlying the Differential Growth of Dendrites and Axons." 30(4): 557–68.
- Watson, Allison P, Rick L Evans, and Kristi A Eglund. 2013. "Multiple Functions of Sushi Domain Containing 2 (SUSD2) in Breast Tumorigenesis." *Molecular cancer research : MCR* 11(1): 74–85.
- Weber, Silvio, and Paul Saftig. 2012. "Ectodomain Shedding and ADAMs in Development." *Development (Cambridge, England)* 139(20): 3693–3709.
- De Wit, Joris et al. 2009. "LRRTM2 Interacts with Neurexin1 and Regulates Excitatory Synapse Formation." *Neuron* 64(6): 799–806.
- De Wit, Joris, Weizhe Hong, Liqun Luo, and Anirvan Ghosh. 2011. "Role of Leucine-Rich Repeat Proteins in the Development and Function of Neural Circuits." *Annual review of cell and developmental biology* 27: 697–729.
- Woo, Jooyeon et al. 2009. "Trans-Synaptic Adhesion between NGL-3 and LAR Regulates the Formation of Excitatory Synapses." *Nature neuroscience* 12(4): 428–37.
- Woo, Jooyeon, Seok-Kyu Kwon, and Eunjoon Kim. 2009. "The NGL Family of Leucine-Rich Repeat-Containing Synaptic Adhesion Molecules." *Molecular and cellular neurosciences* 42(1): 1–10.
- Xu, Chun et al. 2013. "Polymorphisms in Seizure 6-like Gene Are Associated with Bipolar Disorder I: Evidence of Gene × Gender Interaction." *Journal of affective disorders* 145(1): 95–99.
- Yaguchi, Hiroaki et al. 2014. "Identification of Anti-Sez6l2 Antibody in a Patient with Cerebellar Ataxia and Retinopathy." *Journal of neurology* 261(1): 224–26.
- Yamagata, M, and J R Sanes. 1995. "Lamina-Specific Cues Guide Outgrowth and Arborization of Retinal Axons in the Optic Tectum." *Development (Cambridge, England)* 121(1): 189–200.
- Yang, Tao et al. 2005. "Identification of an Ectodomain within the LAR Protein Tyrosine Phosphatase Receptor That Binds Homophilically and Activates Signalling Pathways Promoting Neurite Outgrowth." *The European journal of neuroscience* 22(9): 2159–70.
- Ye, Haihong, Jianghong Liu, and Jane Y Wu. 2010. "Cell Adhesion Molecules and Their Involvement in Autism Spectrum Disorder." *Neuro-Signals* 18(2): 62–71.
- Zagrebelsky, Marta et al. 2005. "The p75 Neurotrophin Receptor Negatively Modulates Dendrite Complexity and Spine Density in Hippocampal Neurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(43): 9989–99.