

Université de Montréal

**Récepteur EphA7: expression régionale dans le cerveau
et localisation ultrastructurale dans l'hippocampe chez le
rat et la souris adultes**

Par

Wafaa Jammow

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pathologie et biologie cellulaire
option système nerveux

Avril 2012

© Wafaa Jammow, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Récepteur EphA7: expression régionale dans le cerveau et localisation ultrastructurale dans
l'hippocampe chez le rat et la souris adultes

Présenté par :
Wafaa Jammow

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pre Nicole Leclerc, présidente-rapporteuse
Pr Guy Doucet, directeur de recherche
Pr Karl Fernandes, co-directeur
Pr Louis-Éric Trudeau, membre du jury

Résumé

EphA7 est un membre de la famille des récepteurs à tyrosine kinase Eph, qui régulent l'adhérence et la motilité cellulaires. EphA7 est hautement conservé chez les vertébrés et largement exprimé durant l'embryogenèse, en particulier pendant le développement du SNC. Dans le cerveau adulte, EphA7 est transcrit principalement dans l'hippocampe, avec de faibles niveaux d'expression ailleurs. Nous avons cartographié sa distribution dans le cerveau du rat et de la souris adultes, par hybridation *in situ* et immunohistochimie en microscopie photonique et électronique. Les deux méthodes montrent une distribution de marquage très cohérente. Le signal le plus fort a été observé dans l'hippocampe, avec des niveaux moins élevés dans l'habénula, le striatum, l'amygdale, les cortex cingulaire, piriforme et entorhinal, ainsi que le cervelet. Au niveau ultrastructural, dans l'hippocampe, l'immunoréactivité d'EphA7 a été localisée dans le cytoplasme des cellules granulaires (gyrus dentelé) et pyramidales (CA1 et CA3) en ordre décroissant d'intensité. Dans le neuropile de CA1, des épines dendritiques et des prolongements astrocytaires, souvent pérисynaptiques, ont été les éléments le plus fréquemment marqués. Plus rarement, nous avons aussi rencontré des dendrites et des terminaisons axonales immunopositives. La localisation préférentielle d'EphA7 dans les épines dendritiques et les prolongements astrocytaires pérисynaptiques est conséquence avec un rôle de ce récepteur dans la plasticité synaptique.

Mots-clés : Système nerveux, Hippocampe, Récepteurs à tyrosine kinase, Récepteurs Eph, Efn, Neuroanatomie, Hybridation *in situ*, Immunocytochimie, Microscopie électronique.

Abstract

EphA7 is a member of the family of Eph receptor tyrosine kinases, which regulate cell adhesion and motility. EphA7 is highly conserved in vertebrates and widely expressed during embryogenesis, especially during the development of the CNS. In the adult brain, EphA7 is transcribed mainly in the hippocampus, with low expression levels elsewhere. We have mapped its distribution in the adult brain of rat and mice by in situ hybridization and by immunohistochemistry in light and electron microscopy. Both methods show very consistent labelling distribution. The strongest signal was observed in the hippocampus, but modest levels were detected in the habenula, striatum, amygdala, the cingulate, piriform and entorhinal cortex, and the cerebellum. At the ultrastructural level, in the hippocampus, EphA7 immunoreactivity was localized in the cytoplasm of granule (dentate gyrus) and pyramidal cells (CA1 and CA3) in descending order of intensity. In the neuropil of CA1, dendritic spines and astrocytic processes, often perisynaptic were the most frequently labelled. More rarely, we also observed immunopositive dendrites and axon terminals. The preferential localization of EphA7 in dendritic spines and perisynaptic astrocytic processes is consistent with a role of this receptor in synaptic plasticity.

Keywords : Nervous system, Hippocampus, Receptor tyrosine kinase, Eph receptors, Ephrins, Neuroanatomy, In situ hybridization, Immunocytochemistry, Electron microscopy.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	vi
Liste des abréviations.....	viii
Dédicace.....	ix
Remerciements	x
Introduction.....	1
1. Mise en contexte	1
2. Récepteurs Eph et Efn	2
2.1. Classement et sélectivité de liaison	2
2.2. Structure moléculaire et signalisation	4
2.3. Rôles des Eph et Efn	7
2.4. Localisation des Eph et des Efn dans le SNC	7
2.5. Principales fonctions des Eph/Efn dans le SNC.....	9
2.6. Eph et Efn dans l'hippocampe.....	10
2.7. EphA7	13
2.7.1. Historique et isoformes.....	13
2.7.2. Rôles d'EphA7 pendant le développement.....	17

2.7.2.1. Fermeture du tube neural.....	17
2.7.2.2. Contrôle de la taille du cerveau	18
2.7.2.3. Guidage axonal.....	20
2.7.3. Rôles d'EphA7 chez l'adulte	24
2.7.3.1. Régulation de la prolifération des cellules souches neurales.....	24
2.7.3.2 Inhibition de la régénération axonale dans la moelle épinière.....	25
2.7.4 Distribution d'EphA7 dans le SNC en développement.....	26
2.7.5 Distribution d'EphA7 dans le SNC adulte.....	26
3. Hypothèses et objectifs	29
Matériel et méthode.....	30
1. Animaux.....	30
2. Immunocytochimie.....	31
2.1. Anticorps.....	31
2.2. Traitement immunocytochimique des coupes	32
3. Hybridation in situ.....	34
3.1. Construction des plasmides contenant les insertions d'EphA7	34
3.2. Synthèse des ribosondes sens et antisens	37
3.3. Traitement des coupes.....	37
Résultats.....	41
1. Expression régionale du récepteur EphA7 détectée par hybridation <i>in situ</i> dans le cerveau adulte	41

2. Distribution du récepteur EphA7 détectée par immunohistochimie dans le cerveau murin adulte.....	45
2.1. Distribution d'EphA7 dans l'hippocampe adulte	49
2.2. Localisation ultrastructurale d'EphA7 dans la région CA1 de l'hippocampe adulte	51
Discussion.....	57
Conclusions et directions futures.....	62
Références.....	63

Liste des figures

Figure 1. Sélectivité de liaison des récepteurs Eph et des Efn.....	3
Figure 2. Structure moléculaire et signalisation des Eph et des Efn.....	5
Figure 3. Localisation et direction de signalisation des Efn et Eph dans différentes régions de l'hippocampe chez les mammifères.	11
Figure 4. Isoformes du récepteur EphA7	16
Figure 5. Rôle d'EphA7 dans le contrôle de la taille du cerveau	19
Figure 6. Modèle représentant le contrôle de l'organisation mutuelle des projections cortico-thalamiques et thalamo-corticales par les gènes EphA7 et Efn-A5	20
Figure 7. Défauts de ciblage topographique des axones naso-rétiniens chez la souris EphA7 ^{-/-} ..	23
Figure 8. Détection immunohistochimique de la protéine EphA7 avec le kit EXPOSE de Abcam.	32
Figure 9. Séquence partielle d'EphA7 utilisée pour l'insertion dans les plasmides pBluescript II SK+/-	36
Figure 10. Détection de l'hybridation in situ d'EphA7 par autoradiographie à haute résolution.	39
Figure 11. Spécificité des ribosondes EphA7	41
Figure 12. Distribution d'EphA7 selon l'hybridation in situ dans le cerveau du rat.....	43
Figure 13. Distribution d'EphA7 selon l'hybridation in situ dans le cerveau de souris.....	44
Figure 14. Cohérence de distribution d'EphA7 entre l'immunocytochimie et le hybridation in situ.....	46
Figure 15. EphA7 dans le cervelet du rat adulte.....	48
Figure 16. Distribution immunohistochimique du récepteur EphA7 dans l'hippocampe adulte .	50
Figure 17. EphA7 dans la région CA1 de l'hippocampe en immunofluorescence	51
Figure 18. Immunomarquage anti-EphA7 dans des corps cellulaires neuronaux (c. pyramidales) et astrocytaires	52
Figure 19. Immunomarquage anti-EphA7 dans des épines dendritiques.....	53
Figure 20. Immunomarquage anti-EphA7 dans des prolongements astrocytaires	54
Figure 21. Immunomarquage anti-EphA7 dans des dendrites	55
Figure 22. Immunomarquage anti-EphA7 dans des terminaisons axonales	56

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BrdU : 5-bromo-2-désoxyuridine

CA (CA1, CA2, CA3) : cornu ammonis

DAB : 3,3'-tétrahydrochlorure de diaminobenzidine

DEPC : Di-éthyl-pyro-carbonate

E : jour embryonnaire

Eph : dérivé de cellules de carcinome hépatocellulaire productrices d'érythropoïétine

(Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma cell-derived)

Efn : Éphrine ou protéines interagtrices des récepteurs Eph *(Eph receptor interacting proteins)*

HRP : Peroxydase du raifort *(horseradish peroxydase)*

GABA : acide γ -aminobutyrique

GAPs : protéines activatrices des GTPases *(GTPase activating protein)*

GEFs : facteurs d'échange de nucléotides guanine *(guanine nucleotide exchange factors)*

GFP : protéine fluorescente verte *(green fluorescent protein)*

GST: glutathion S-transférase

LTD : dépression à long terme *(long-term depression)*

LTP : potentialisation à long terme *(long-term potentiation)*

MDK1: mouse developmental kinase 1

P75NTR : récepteur à basse affinité des neurotrophines p75

PCR : réaction de polymérase en chaîne (polymerase chain reaction)

PDZ : PSD-95/ disc-large/ zonula occludens-1

PLC γ 1 : phospholipase C γ

QRT-PCR: PCR quantitative en temps réel

SAM : motif α -stérile (*sterile α motif*)

SH2 : domaine d'homologie Src (*Src homology 2*)

SKF : famille des kinases de type Src

SNC : système nerveux central

ZSG : zone sous-granulaire

ZSV : zone sous-ventriculaire

Dédicace

À mes parents

À ma famille

À mes amis

...

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, le Pr Guy Doucet, pour m'avoir donné la possibilité de travailler au sein de son laboratoire dans une ambiance conviviale, pour le temps qu'il m'a généreusement accordé, ainsi que pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité, patience, compréhension, et ses précieux conseils.

Je tiens à exprimer mes remerciements à mon codirecteur, Dr Karl Fernández, pour sa collaboration, soutien et son encouragement tout au long de mes travaux.

Je tiens également à remercier Dre Nicole Leclerc, pour sa collaboration et grande compréhension et pour avoir lu mes travaux et avoir accepté de présider le jury de mon mémoire.

Je suis très reconnaissante envers Diane Gingras, qui m'a encadrée depuis mon arrivée au laboratoire, avec sa simplicité, mais toujours avec responsabilité, enthousiasme et grande disponibilité, son savoir-faire en immunocytochimie, microscopie électronique et ultrastructure du système nerveux.

Je remercie vivement Michel Lauzon, avec son expertise reconnue, pour les judicieux conseils qu'il m'a donnés, le soutien et l'encouragement tout au long de ma maîtrise.

Je remercie chaleureusement ma collègue, Dre Daniëlla Isacu, pour son accueil, les échanges et les bons moments que nous avons passés ensemble dans le laboratoire, et je lui souhaite la meilleure chance et tout le succès qu'elle mérite.

Je remercie Dr Louis-Éric Trudeau, pour avoir accepté de lire et critiquer mon mémoire.

Je tiens à témoigner ma gratitude à mes parrains, Dre Adriana Di Polo et Dr Louis St-Amant, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux, et pour les discussions enrichissantes lors de nos réunions.

J'adresse tous mes remerciements aux membres du Département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal, pour leur amicale collaboration durant ces trois années d'études que j'ai passées avec eux.

Wafaa Jammow

Introduction

1. Mise en contexte

Dans de nombreux processus fondamentaux du développement et du maintien du fonctionnement d'un organisme, les cellules doivent communiquer des informations cruciales pour répondre adéquatement à l'évolution de leur environnement. Dans un tel contexte, les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) sont des protéines transmembranaires qui ont un rôle fondamental dès le stade embryonnaire et au cours de la vie adulte dans de nombreux tissus et organes. Ils contrôlent, avec leurs ligands regroupés sous le terme de facteurs de croissance, des processus fondamentaux tels que la prolifération et différenciation cellulaires (ex. FGF, VEGF), le cycle cellulaire, la migration cellulaire, la survie cellulaire (ex., neurotrophines) et le métabolisme (ex., IGF1). Ayant un domaine de liaison extracellulaire et un domaine catalytique intracellulaire activé par la liaison du ligand, les RTK recrutent l'activité kinase des protéines intracellulaires à la membrane plasmique, et activent leur propre tyrosine kinase intrinsèque (Romanelli & Wood, 2008).

Les récepteurs Eph constituent la plus grande famille de récepteurs à tyrosine kinase, chez les vertébrés (Araujo & Nieto, 1997; Klein, 2004). Avec leurs ligands, les éphrines (Efn), ils sont reconnus pour leurs fonctions de communication par contact entre les cellules. Durant le développement, le système de communication Eph / Efn semble influencer les comportements cellulaires tels que l'attraction ou la répulsion, l'adhérence ou la migration, qui influencent le destin cellulaire. Ce système influence ainsi la morphogenèse et l'organogenèse dans plusieurs régions de l'organisme. À l'âge adulte, le système Eph / Efn continue à jouer un rôle dans la plasticité cellulaire, par exemple dans la

formation des épines dendritiques au cours de la plasticité synaptique (Palmer & Klein, 2003).

2. Récepteurs Eph et Efn

2.1. Classement et sélectivité de liaison

Les récepteurs Eph sont subdivisés sur la base de leur similarité de séquence et de leur affinité pour les différentes Efn. En effet, à la différence des ligands habituels des autres RTK, les Efn, ou protéines d'interaction avec les récepteurs Eph (« *Eph receptor interacting proteins* »), sont des protéines membranaires de la surface cellulaire. Elles se distinguent entre elles par leur mode d'insertion à la membrane cellulaire. D'autre part, il existe une grande promiscuité de reconnaissance entre les Efn et les Eph, de telle sorte que les Eph de type A (EphA1-10), reconnaissent l'ensemble des Efn A (Efn A1-5) qui sont ancrées à la membrane plasmique par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) et que les Eph de type B (EphB1-6) se lient aux Efn B (Efn B1-3) qui sont transmembranaires et possèdent un domaine cytoplasmique. Deux exceptions majeures à ce schéma concernent EphA4, qui reconnaît, quoique avec des affinités diverses, les Efn B en plus des Efn A (Kullander & Klein, 2002), ainsi que l'Efn-A5 qui peut se lier et activer EphB2 (en plus des récepteurs EphA) (Himanen *et al.*, 2004) (Figure 1).

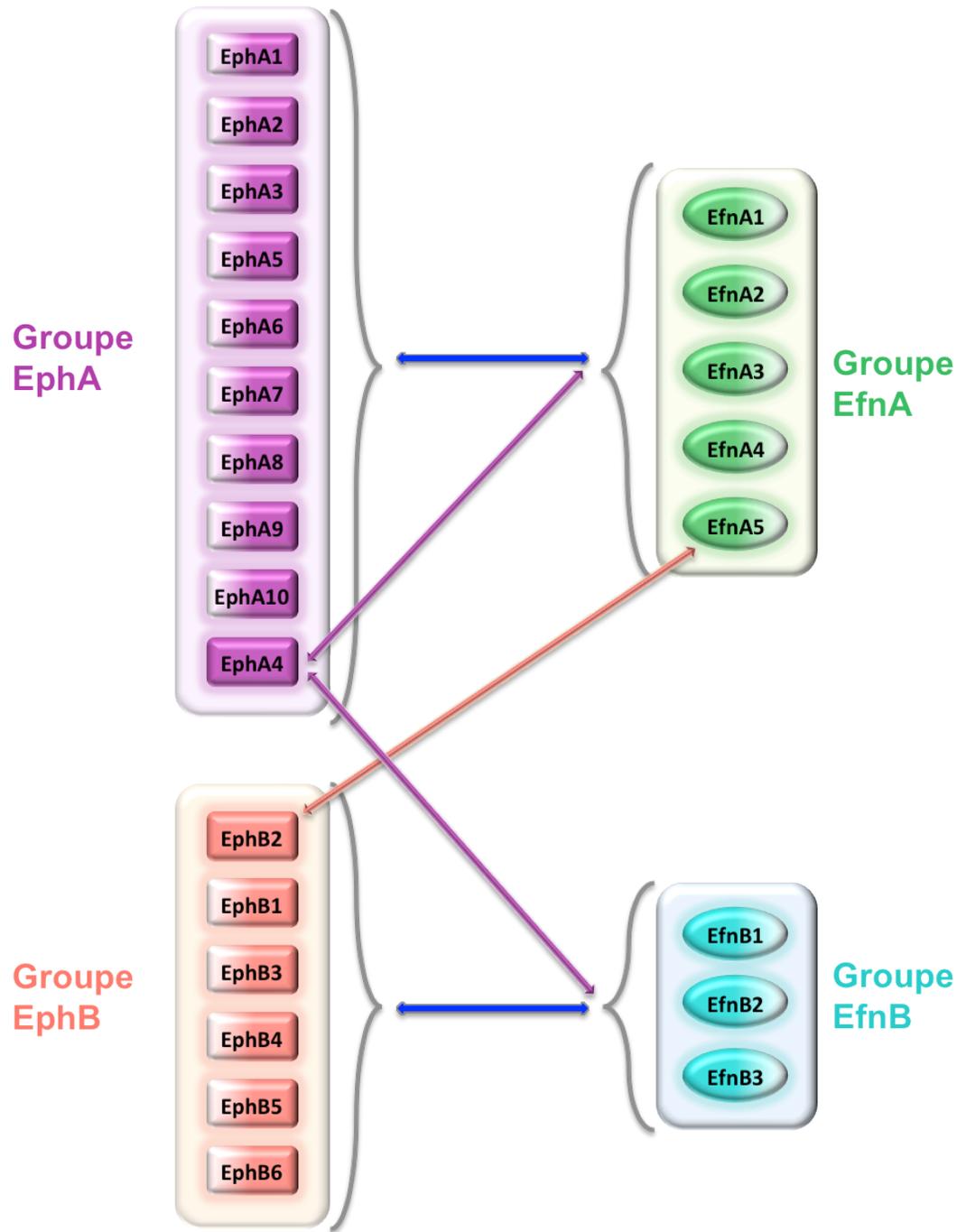


Figure 1. Sélectivité de liaison des récepteurs Eph et des Efn

Description dans le texte.

2.2. Structure moléculaire et signalisation

Les deux types de récepteurs EphA et EphB sont composés d'un domaine globulaire extracellulaire, servant à la reconnaissance et à la liaison des Efn, suivi d'une région riche en résidus cystéine formant des ponts disulfures requis pour stabiliser la structure protéique, puis de deux domaines à séquences répétées de fibronectine de type III servant aux interactions latérales entre les Eph avec d'autres protéines membranaires, comme les NMDAR (Dalva *et al.*, 2000) - ce qui élargit les mécanismes d'action des Efn / Eph. La portion intracellulaire comprend un domaine juxta membranaire, un domaine tyrosine kinase, un domaine de motifs alpha stériles (SAM pour « *sterile alpha motifs* ») et enfin un domaine de liaison aux protéines PDZ (pour « *Postsynaptic density, Disk large, Zonula occludens* ») (Figure 2). La liaison des Efn au domaine extracellulaire des Eph induit une oligomérisation de ces récepteurs et des changements allostériques qui activent le domaine kinase intracellulaire, produisant une autophosphorylation du récepteur sur ses résidus tyrosine. Les résidus tyrosine phosphorylés des Eph représentent des sites de liaison pour une multitude de molécules de signalisation cytoplasmique, activant ainsi différentes voies de transduction du signal (Klein, 2004), notamment des facteurs d'échange de nucléotides guanine (GEF, pour « *Guanine nucleotide Exchange Factor* ») qui activent les voies de signalisation des petites GTPases de type Rho (Egea & Klein, 2007). Le domaine SAM permettrait l'agrégation des récepteurs en dimères ou oligomères (Qiao & Bowie, 2005) tandis que le domaine c-terminal de liaison PDZ sert au recrutement de protéines intracellulaires à motifs PDZ (Pasquale, 2005; Himanen *et al.*, 2007) (Figure 2).

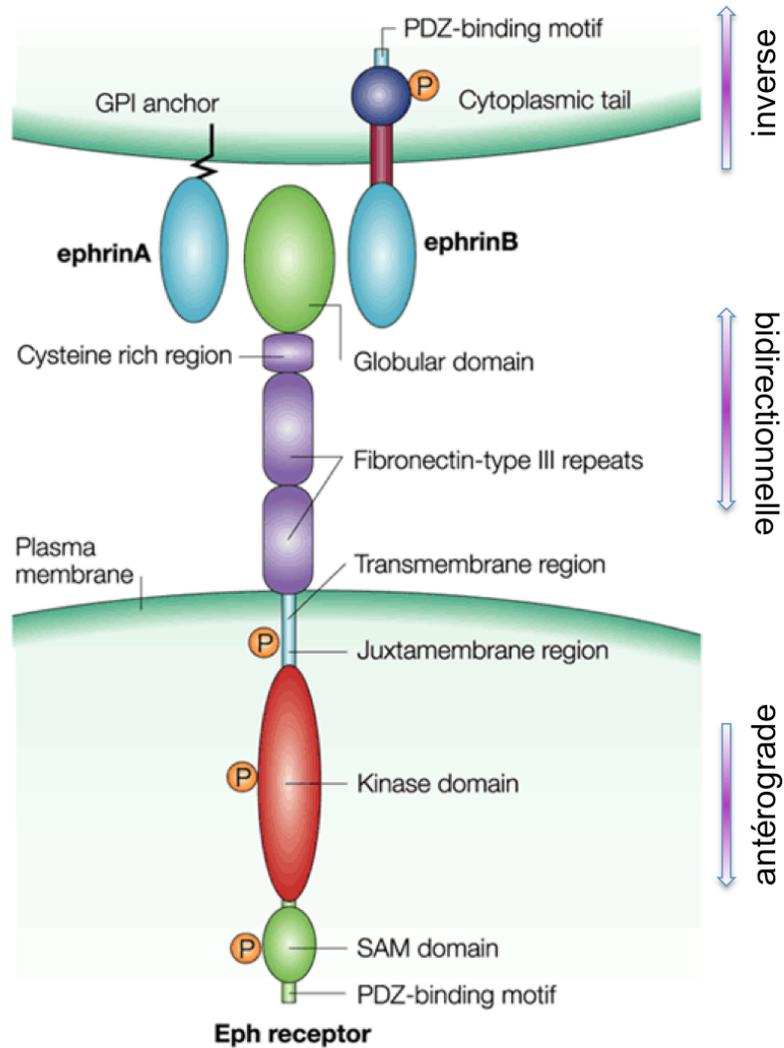


Figure 2. Structure moléculaire et signalisation des Eph et des Efn

Schéma représentant une cellule exprimant des Efn A et B (en haut) interagissant avec une cellule exprimant un récepteur Eph (A ou B, en bas). GPI, glycosyl-phosphatidyl-inositol; SAM, Motif alpha-stérile; PDZ, PSD-95/ disc-large/ zonula occludens-1; P, phosphotyrosine. Modifié avec permission de Kullander and Klein (2002).

Concernant les Efn, leur domaine extracellulaire est constitué d'un domaine de liaison aux récepteurs Eph et d'un domaine de liaison à la membrane.

Les Efn A sont composées d'un court domaine carboxy-terminal, suivi d'une ancre GPI qui les attache à la membrane. Les Efn B possèdent un domaine transmembranaire qui se termine en carboxy-terminal par un motif intracellulaire de liaison aux domaines PDZ (Figure 2).

Une particularité des Eph et Efn est leur signalisation bidirectionnelle (Pasquale, 2008), c'est à dire que les deux éléments peuvent agir simultanément à la fois comme ligand et comme récepteur, de sorte qu'une signalisation est induite tant dans la cellule exprimant l'Efn (signalisation inverse) que dans celle exprimant l'Eph (signalisation antérograde) (Figure 2).

L'une des voies de signalisation activées par les Eph (signalisation antérograde) est la voie des petites GTPases de la famille Rho (RhoA, Rac et Cdc42) (Himanen *et al.*, 2007), qui influencent la morphologie et la réponse cellulaires en régulant le remodelage du cytosquelette d'actine. Aussi, les Eph recrutent diverses protéines à motif SH2 (« *Src-homologue 2* ») comme la phospholipase-C γ -1 (PLC γ 1) en aval d'EphA4 dans les cellules COS-7 et les neurones de l'hippocampe en culture primaire (Zhou *et al.*, 2007). Cette interaction est notamment requise pour la régulation du remodelage morphologique des épines dendritiques.

Un certain nombre de protéines ont été identifiées qui contiennent des domaines SH2 ou PDZ et peuvent se lier aux Efn B phosphorylées et transmettre le signal inverse (Cowan & Henkemeyer, 2001). La protéine adaptatrice, Grb4, contient un domaine SH2 lié à

l'activité des Efn B et influençant la morphologie cellulaire (Cowan & Henkemeyer, 2001; Lu *et al.*, 2001). Le mécanisme de signalisation des Efn A n'est pas encore bien connu, mais celles-ci sont capables d'activer les membres de la famille des kinases Src (SKF pour « *Src Kinase Family* ») et de participer à la signalisation des intégrines (Davy *et al.*, 1999; Davy & Robbins, 2000; Huai & Drescher, 2001). Elles peuvent aussi s'associer à des corécepteurs, comme la protéine p75^{NTR} (Lim *et al.*, 2008).

2.3. Rôles des Eph et Efn

Les Efn et Eph sont impliqués dans le contrôle de plusieurs processus développementaux en modifiant l'organisation du cytosquelette d'actine et en modulant l'adhésion cellulaire (Murai & Pasquale, 2003; Himanen *et al.*, 2007). Ainsi, ces récepteurs et leurs ligands régulent par leur signalisation bidirectionnelle la migration cellulaire (Kuriyama & Mayor, 2008), la structuration vasculaire (Adams & Eichmann, 2010) et le développement de l'oreille interne (Saeger *et al.*, 2011).

Les récepteurs Eph et les Efn coordonnent aussi des fonctions physiologiques normales dans de nombreux organes adultes comme le pancréas et les vaisseaux sanguins. Un déficit dans le fonctionnement des systèmes Eph/Efn peut contribuer à une variété de maladies incluant plusieurs types de cancer, des infections virales et des troubles neurologiques (Pasquale, 2008).

2.4. Localisation des Eph et des Efn dans le SNC

Par hybridation *in situ*, les Eph et les Efn sont exprimés au plus haut niveau dans le système nerveux embryonnaire, alors que leurs niveaux d'expression sont constamment

atténués pendant le développement postnatal, dans la plupart des régions du SNC (Liebl *et al.*, 2003). Cependant, de nombreux Eph et Efn maintiennent une présence considérable chez l'adulte. L'expression des Eph et Efn a été révélée dans plusieurs populations de neurones, de cellules gliales et de cellules souches ou progénitrices (Liebl *et al.*, 2003).

Cette expression se produit principalement dans des régions du SNC reconnues comme étant plus plastiques, où les connexions neuronales continuent à se former et à se remodeler, tels le système olfactif, l'hippocampe, le cortex et le cervelet. (Martone *et al.*, 1997; Liebl *et al.*, 2003).

Quant à immunocytochimie, qui demeure la principale méthode permettant de documenter la localisation subcellulaire des Eph ou Efn, la rareté des anticorps spécifiques pour ces molécules explique pourquoi la localisation subcellulaire des Eph et des Efn reste actuellement moins connue. Cela dit, certaines études de localisation subcellulaire ont rapporté une localisation postsynaptique de EphA4, EphA7, EphB2, EphB3, et l'Efn B2 (Martone *et al.*, 1997; Buchert *et al.*, 1999; Grunwald *et al.*, 2004), une localisation soit disant conforme à leur liaison au domaine PDZ des protéines (Torres *et al.*, 1998).

Mais l'étude de Tremblay et collaborateurs (2007) a démontré la présence d'EphA4 autant dans les éléments présynaptiques que postsynaptiques, de même que dans les prolongements astrocytaires pérисynaptiques des synapses excitatrices de l'hippocampe de rat adulte. Parfois, la localisation des Eph dépend du type de synapse, puisque quelques études (Henderson *et al.*, 2001; Contractor *et al.*, 2002; Grunwald *et al.*, 2004) suggèrent que les Efn B sont présynaptiques dans la région CA3 de l'hippocampe, mais

postsynaptiques dans la zone CA1. Cette localisation est compatible avec des rôles des systèmes Eph/Efn dans la plasticité synaptique et la LTP.

2.5. Principales fonctions des Eph/Efn dans le SNC

L'influence des Eph/Efn dans la régulation de la motilité et de la morphologie cellulaires est conséquent avec notre conception actuelle de leurs divers rôles dans le SNC en développement et adulte.

Les Eph et les Efn sont impliqués dans la migration et la ségrégation cellulaires, requises pour générer des motifs cellulaires complexes (Kullander & Klein, 2002).

L'interaction entre les récepteurs Eph et les Efn joue un rôle très important dans le guidage axonal et la formation de cartes de projection grâce à l'établissement de gradients complémentaires d'expression des Eph et des Efn dans les structures de projection et leurs cibles (Cheng *et al.*, 1995; Drescher *et al.*, 1995; Flanagan & Vanderhaeghen, 1998).

Ces molécules de guidage axonal auraient souvent un effet inhibiteur sur la régénération axonale (Goldshmit *et al.*, 2006; Harel & Strittmatter, 2006). Notamment, l'expression de nombreux Eph et Efn est augmentée après une lésion de la moelle épinière chez l'adulte, surtout dans les astrocytes réactifs et les axones corticospinaux lésés, comme c'est le cas d'EphA4 dans les études de Fabes et collaborateurs (2006; 2007). Plusieurs études ont montré des rôles importants pour les Eph et les Efn dans la plasticité synaptique, la mémoire et l'apprentissage. Des déficits dans l'induction de la LTP et de la LTD ont été rapportés chez des souris knockouts pour EphA4, l'Efn B2 ou l'Efn B3, au niveau des

synapses des collatérales de Schaffer dans le CA1, Grunwald et al. (2001; Grunwald *et al.*, 2004).

Enfin, leur rôle dans la neurogenèse adulte a été mis en évidence par Jiao et collaborateurs (2008) en montrant l'implication des EfnA2 et Efn A3 dans la régulation négative de la prolifération des cellules progénitrices.

2.6. Eph et Efn dans l'hippocampe

On sait que plusieurs Eph et Efn sont exprimés dans l'hippocampe, une structure cérébrale largement utilisée comme modèle dans l'étude des mécanismes cellulaires de la mémoire et de l'apprentissage, notamment dans les mécanismes synaptiques de la potentialisation à long terme (LTP) et de la dépression à long terme (LTD). En effet, l'hippocampe se prête particulièrement bien à l'analyse de la transmission synaptique, grâce à son organisation laminaire et sa circuiterie neuronale relativement simples. Ainsi, l'information qui traverse cette structure passe successivement par trois régions distinctes : le gyrus dentelé, et les régions CA3 et CA1; qu'on désigne sous le vocable de circuit tri-synaptique de l'hippocampe (Figure 3).

L'entrée de l'information dans ce circuit unidirectionnel se fait par les axones du cortex entorhinal, ou voie perforante. Ces axones forment un premier relais avec les neurones du gyrus dentelé. À partir des cellules granulaires du gyrus dentelé partent les fibres moussues qui établissent le deuxième relais avec les dendrites des cellules pyramidales de l'aire CA3. Les axones des cellules pyramidales du CA3 se ramifient en deux voies : une partie constitue les fibres commissurales se dirigeant vers l'hippocampe

controlatéral via le corps calleux et l'autre partie formant les collatérales de Schaffer qui font le troisième relais du circuit avec les cellules pyramidales de l'aire CA1. Finalement, les axones des cellules de CA1 se dirigent vers les neurones du subiculum et du cortex entorhinal.

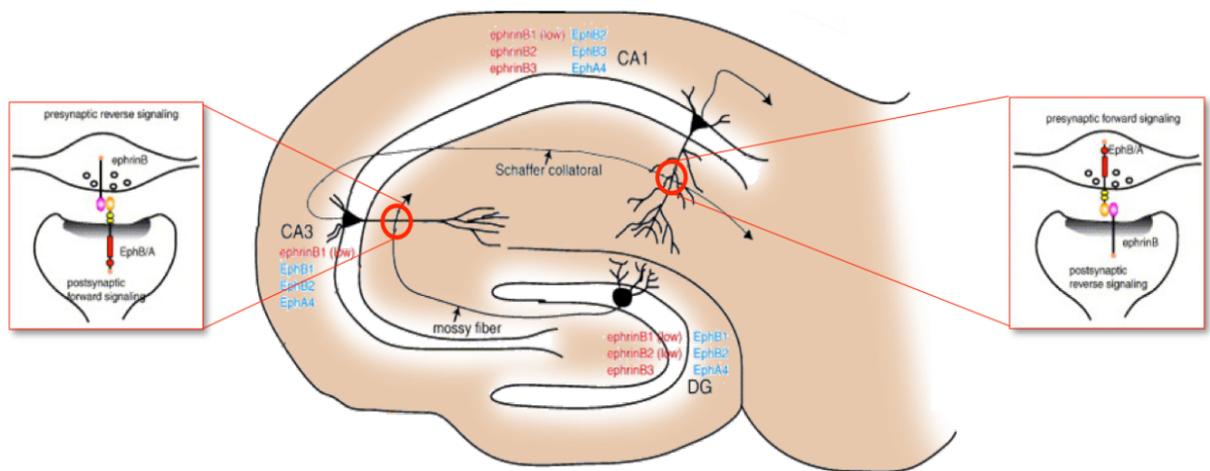


Figure 3. Localisation et direction de signalisation des Efn et Eph dans différentes régions de l'hippocampe chez les mammifères.

Description dans le texte. Reproduite avec permission de Aoto and Chen (2007)

Les neurones de l'hippocampe montrent une grande plasticité, qui se manifeste entre autres par la LTP, un processus de renforcement synaptique très étudié comme l'un des mécanismes cellulaires présumés de la mémoire. Il correspond à une augmentation prolongée de l'amplitude de la réponse postsynaptique à la suite d'une intense activation présynaptique.

La plupart des récepteurs Eph et des Efn sont exprimés dans des régions spécifiques de l'hippocampe des mammifères (Figure 3). Ils peuvent participer au cheminement de fonctions spécifiques telles que l'induction et l'expression des différentes formes de plasticité synaptique, la morphogénèse des épines, la formation des synapses (Grunwald *et al.*, 2001; Palmer & Klein, 2003; Chen *et al.*, 2004; Grunwald *et al.*, 2004; Klein, 2004) et la neurogenèse chez l'adulte dans la zone sous-granulaire (ZSG) de l'hippocampe (Chumley *et al.*, 2007)

Le rôle des récepteurs Eph dans la morphogénèse des épines dendritiques a été largement étudié. Dans l'hippocampe de souris, l'immunomarquage des récepteurs Eph a confirmé leur localisation dans les troncs dendritiques, les filopodes et les têtes des épines, (Murai & Pasquale, 2003; Penzes *et al.*, 2003; Irie *et al.*, 2005). Henkemeyer et collaborateurs (2003) ont rapporté que les épines dendritiques ne se sont pas développées dans des cultures primaires de neurones hippocampiques de souris triplement knockouts pour EphB1, EphB2 et EphB3, en comparaison à des cultures hippocampiques témoins de souris de type sauvage. On a aussi démontré que les récepteurs EphB stimulent la formation des épines via l'activation des petites GTPases de la famille Rho. Par exemple, dans les prolongements dendritiques, les GEF Tiam1, intersectine et kalirine sont recrutés par les EphB afin d'activer Rac ou Cdc42; ce qui induit la régulation de la dynamique de l'actine liée à la formation des épines dendritiques (Penzes *et al.*, 2003).

Bien que les récepteurs EphA ne semblent pas promouvoir directement la formation des épines, Murai et collaborateurs (2003) ont proposé qu'elles puissent réguler la stabilité des épines dans la région CA1 de l'hippocampe, car l'activation d'EphA4 par l'application

d'EfnA3-Fc agglomérée conduisait à leur rétraction et à une diminution du volume de leurs têtes. Ces auteurs ont proposé que l'Efn A3 exprimée par les cellules gliales active la signalisation antérograde d'EphA4 dans l'épine, possiblement par le biais du recrutement du complexe SHEP1/Ras GTPase ou l'éphexine (une RhoGEF).

Plusieurs études ont démontré que les récepteurs EphA4 et EphB2, de même que les Efn B2, B3 et A3 étaient impliqués dans la plasticité synaptique, notamment la LTP au niveau des synapses formées par les fibres moussues dans CA3 et les collatérales de Schaffer dans CA1 (Figure 3). Il a été proposé que EphB2 soit nécessaire pour la phase tardive de la LTP (Grunwald *et al.*, 2004), (Henderson *et al.*, 2001) tandis que EphA4 fonctionnerait comme un récepteur présynaptique pour les Efn B dans la phase précoce de la LTP (Grunwald *et al.*, 2004).

2.7. EphA7

2.7.1. Historique et isoformes

Le récepteur EphA7 est d'intérêt spécial, car il est hautement conservé chez les vertébrés, du poisson à l'humain, et largement exprimé durant l'embryogenèse, en particulier pendant le développement du SNC. Dans le cerveau adulte, EphA7 est exprimé principalement dans l'hippocampe, par des neurones participant à la plasticité synaptique, avec des niveaux d'expression plutôt faibles ailleurs dans le cerveau (Ciossek *et al.*, 1999)

EphA7 a été isolé indépendamment chez plusieurs espèces, dont l'humain (Hek11), le rat (Ehk3) et la souris (Mdk1; EBK) (Ciossek *et al.*, 1995; Ellis *et al.*, 1995; Valenzuela *et al.*, 1995; Taneja *et al.*, 1996). La protéine EphA7 de la souris comprend 998 acides

aminés. Son poids moléculaire théorique est de 111 860 Da (voir www.ensembl.org) et (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_034271.3).

EphA7 a la particularité d'avoir une seconde isoforme dénuée du domaine tyrosine kinase par épissage alternatif de l'ARNm. En fait, Ciossek et collaborateurs (1995) ont identifié plusieurs ARNm encodant au moins 5 isoformes différentes d'EphA7 (ou MDK1) résultant d'un épissage alternatif, dans le SNC de la souris adulte (Figure 4).

Ainsi, EphA7-FL (« *full length* », ou MDK1 dans l'ancienne nomenclature), représente l'isoforme de pleine longueur. Les isoformes (MDK1-1 et MDK1-2) sont respectivement dépourvues de séquences de cinq (MDK1-1) ou de quatre (MDK1-2) acides aminés dans les domaines extracellulaire ou juxtamembranaire, alors que les isoformes EphA7-T1, (MDK1-T1) et EphA7-T2 (MDK1-T2) ne possèdent que 20 acides aminés du domaine juxtamembranaire intracellulaire d'EphA7. Leur domaine C-terminal se termine respectivement avec 11 (EphA7-T1) ou 27 (EphA7-T2) acides aminés. En conséquence, EphA7-T1 et EphA7-T2 se terminent peu après le domaine transmembranaire et sont dépourvus de domaine kinase (Ciossek *et al.*, 1995) (Figure 4).

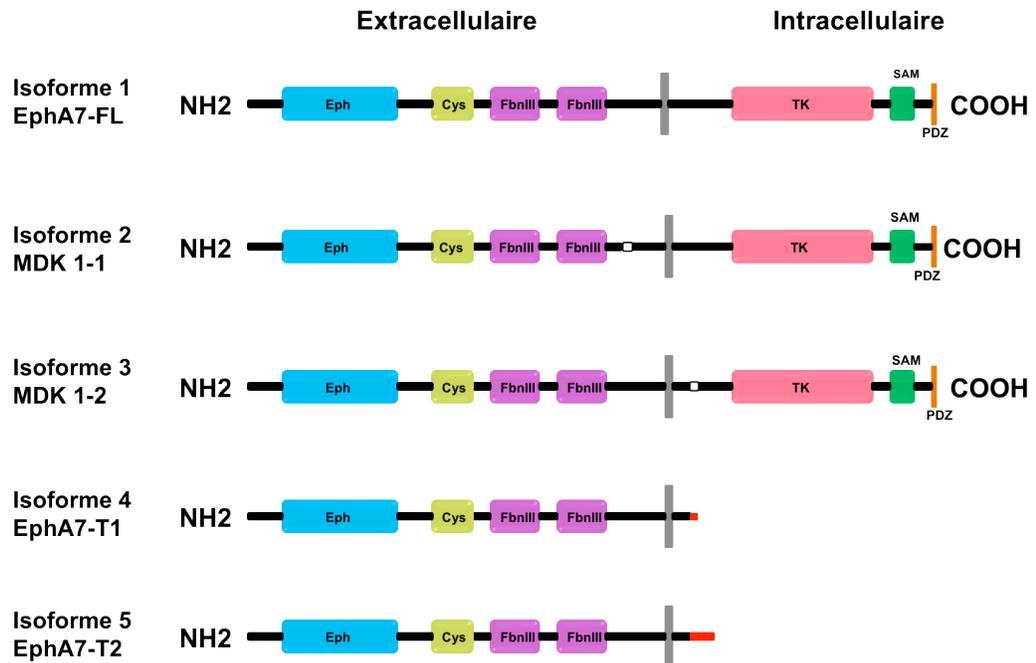
L'intensité de l'expression relative d'EphA7-T1 augmente au cours du développement dans le système nerveux central (Mori *et al.*, 1995). Dans le cerveau de souris adulte, EphA7-T1 représente l'isoforme la plus abondamment détectée d'EphA7 (Ciossek *et al.*, 1995). Le rôle physiologique des isoformes MDK1-1 et MDK1-2 est actuellement inconnu. D'autre part, van der Geer et collaborateurs (1994) ont proposé que les isoformes dépourvues d'activité tyrosine kinase puissent agir comme des récepteurs dominants négatifs captant les Efn afin de les empêcher d'activer d'autres récepteurs Eph.

Ils pourraient aussi servir simplement de ligands pour des Efn A, sans avoir eux-mêmes d'activité de récepteurs, permettant une signalisation unidirectionnelle. Une autre possibilité a aussi été suggérée, soit que la formation d'hétéromères comprenant l'isoforme pleine longueur et des isoformes tronquées puisse réguler la transphosphorylation, et par conséquent le degré d'activation du récepteur (Kashles *et al.*, 1991).

Comme les autres EphA, EphA7 peut reconnaître toutes les Efn A, mais avec des affinités variées. Son affinité serait plus élevée pour les Efn A2 (Holmberg *et al.*, 2005) et A5 (Torii & Levitt, 2005). Ciossek et Ulrich (1997) ont, pour leur part, étudié l'affinité de l'Efn A1 (B61 ou LERK-1) et de l'Efn A2 (Elf-1 dans l'ancienne nomenclature) qui se lient aux trois isoformes de pleine longueur d'EphA7 (EphA7-FL, MDK1-1 et MDK1-2) avec des constantes de dissociation similaires (Cheng & Flanagan, 1994; Easty *et al.*, 1995). Des affinités légèrement plus faibles ont été observées pour les isoformes tronquées, EphA7-T1 et EphA7-T2. Enfin, l'activation d'EphA7 par les Efn A1 ou Efn A2 conduit à une autophosphorylation rapide d'EphA7.

Buchert et collaborateurs (1999) ont proposé la protéine afadin /AF-6 comme une candidate pour la médiation de l'oligomérisation du récepteur EphA7 aux spécialisations postsynaptiques dans l'hippocampe du rat adulte.

A) Schéma des isoformes d'EphA7



B) séquence des acides aminés des isoformes d'EphA7

MVVQTRFPSWIILCYIWLGLGFAHTGEAQA**AKEVLL**LLDSKAQQTELEWISSPPSGWEEISGLDENYTPIRTYQVCQVMEPNQNNWLRTNWI
 SKGNAQRIFVELKFTLRDCNSLPGVLGTCKETFNLYYYETDYDTGRNIRENLVVKIDTIAADESFTQGD~~LG~~ERKM~~KL~~NTVEIREIGPLSKKGFYL
 AFQDVGACIALVSVKVVYKCKWSIVENLAVFPDVTVTGSEFSSLVEVRGTCVSSAEEEEAENSPRMHCSAEGEWLVIPI**GKICKAGYQQK**GDT
 CEP**CGRRFYKSSQDLQCSRCPTH**SFSDREGSSRCE**ED**GYRAPSDPPYVACTRPP**SAPQNLIFINQTTV**SLEWSPPADNGRNDVYTRI
 LCKRCSWEQEGCVPCGSNIGYMPQQTGLEDN~~Y~~VTVM**DL**LAHANYTFEVEAVNGVSDLSRSQRLFAAVSITGQAAPSQVSGVM**KERVL**
 QRSVQLSWQPEHPNGVITEYEIKY**EK**Q**RERTYSTLTKT**STASINNLKPGTVYVFQIRAVTAAGYGNYS**PRLDVATLEEASGKMF**EATAV
 SSEQNPVIIIAVVAVAGTIIILVFMVFGFIIGRRHCGYSKADQEGDEELYFH**FKFPGTKTYID**PETYEDPNRAV**HQFAK**ELDAS**CIKIERVIGAGE**
 FGEVCSGRLKLPGRDVAVAIKTLKVGYTEKQRRDFLCEASIMGQFDHPNVVHLEGVVTRGKPMVIVIEFMENGALDAFLRKHDGQFTVIQ
 LVGMLRGAAGMRYLADMGYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRVIEDDPEAVYTTTGGKIPVRWTAPEAIQYRKFTSASDVWSYGI
 VMWEVMSYGERPYWDM**SNQDV**IKAI**EEGYRLPAPMDCPAGLHQLMLD**CWQKDRAERP**KFEQIVG**ILDKMIRNPSS**LKTP**LGTC**SRPLS**
 PLLDQSTPD**FTAFCSVGEWLQA**IK**MERYKDNFTAAGYNSLES**VARM**TIDDVMSL**GITLVGHQ**KKIMSSIQT**MRAQMLHLHGTG**IQV**

Figure 4. Isoformes du récepteur EphA7

MDK 1-1 : la séquence **SGKMF** dans B) illustré par □ dans A) est manquante,

MDK 1-2 : la séquence **KFPG** dans B) illustré par □ dans A) est manquante,

EphA7-T1 : la séquence **FKFPGTKTYID** dans B) illustré par ■ dans A) est remplacée par la séquence SLVTNEHLSVL,

EphA7-T2 : la séquence **FKFPGTKTYIDPETYEDPNRAVHQA** dans B) illustré par ■ dans A) est remplacée par la séquence SLYRERGDGMEKTQHNNKMMIASCRL,

Lettres soulignées : séquence peptidique qui a servi à produire l'anticorps anti-EphA7 utilisé dans notre étude.

2.7.2. Rôles d'EphA7 pendant le développement

2.7.2.1. Fermeture du tube neural

Pendant la neurulation, l'EfnA5 est co-exprimée avec les 3 isoformes, EphA7-FL, EphA7-T1 et EphA7-T2, dans les cellules des crêtes neurales dorsales, mais cette co-expression est restreinte aux crêtes neurales du niveau céphalique correspondant précisément à la localisation des anomalies de fermeture du tube neural à ce niveau (Ciossek *et al.*, 1995; Valenzuela *et al.*, 1995).

Quelques études (Holmberg *et al.*, 2000; Klein, 2001) ont démontré qu'une forme tronquée d'EphA7 contrôle l'interaction attractive entre ce récepteur et l'EfnA5 durant la fermeture du tube neural. Des souris knockouts pour l'EfnA5 montrent des anomalies de fermeture du tube neural ressemblant à l'anencéphalie chez l'humain. Cette anomalie résulte de l'échec des crêtes neurales à fusionner sur la ligne médiane dorsale (Holmberg *et al.*, 2000). Cette observation suggère que l'EfnA5, en plus de son implication dans la répulsion intercellulaire (Frisen *et al.*, 1998), puisse participer à l'adhésion cellulaire. Des expériences *in vitro* sur l'agrégation des cellules ont démontré qu'une forme tronquée d'EphA7 favorise l'adhésion cellulaire. En effet, la co-expression endogène d'une forme tronquée d'EphA7 (EphA7-T1), supprime la phosphorylation de tyrosines du récepteur EphA7 de pleine longueur et modifie la réponse cellulaire, de la répulsion à l'adhérence (Holmberg *et al.*, 2000). Il peut paraître étonnant que des cellules qui adhèrent les unes aux autres, lors de la fermeture du tube neural expriment EphA7 et l'Efn-A5 dont les actions répulsives sont bien caractérisées. Or, il semble bien que ces molécules soient importantes pour l'adhésion dans ce contexte, et que la fusion des crêtes neurales soit altérée en leur

absence. L'adhésion pourrait s'expliquer par la suppression de l'activation de EphA7, l'activation de l'EfnA5, ou l'interaction directe entre EphA7 et l'EfnA5 (Holmberg *et al.*, 2000). Ce comportement apparemment paradoxal pourrait aussi résulter de la présence ou de l'absence des enzymes impliquées dans le clivage des Eph ou des Efn, ou des molécules de signalisation impliquées dans l'internalisation des complexes Eph/Efn, suivant leur liaison (Klein, 2001).

2.7.2.2. Contrôle de la taille du cerveau

Il a été démontré que l'activation d'EphA7 par des EfnA exprimées artificiellement, de façon ectopique, dans les progéniteurs ou par l'ajout d'EfnA en culture provoquait la mort cellulaire durant le développement du cerveau, en régulant négativement le nombre de progéniteurs neuraux, par un mécanisme d'activation de l'apoptose (Depaepe & Vanderhaeghen, 2005; Romanelli & Wood, 2008). En outre, cette vague apoptotique était observée en l'absence de toute altération notable de la prolifération, de la différenciation ou de la migration neurales dans le cortex, puisqu'une coloration immunohistochimique anti-*nestine* n'a révélé aucune diminution de la densité des progéniteurs corticaux, et un marquage au BrdU a indiqué que la prolifération et la régulation du cycle cellulaire étaient intactes en comparaison avec des souris témoins de type sauvage. La même étude a aussi révélé que les souris EphA7 knockouts (EphA7^{-/-}) montraient une diminution de moitié de la mort des cellules progénitrices corticales lors de la période de pointe de la neurogenèse corticale, par rapport aux souris de type sauvage. Ces souris knockouts présentaient aussi une taille beaucoup plus grande (20%) du cortex que les témoins de type sauvage. Par ailleurs, dans une petite proportion (10%) des embryons de souris EphA7^{-/-}, on a observé

une prolifération exencéphalique du tissu prosencéphalique, caractérisée par des foyers de prolifération ectopiques et des plis corticaux aberrants. Les EfnA responsables de l'activation d'EphA7 en conditions normales *in vivo* restent à identifier, mais ces observations montrent bien un rôle d'EphA7 dans la régulation de la taille du cerveau.

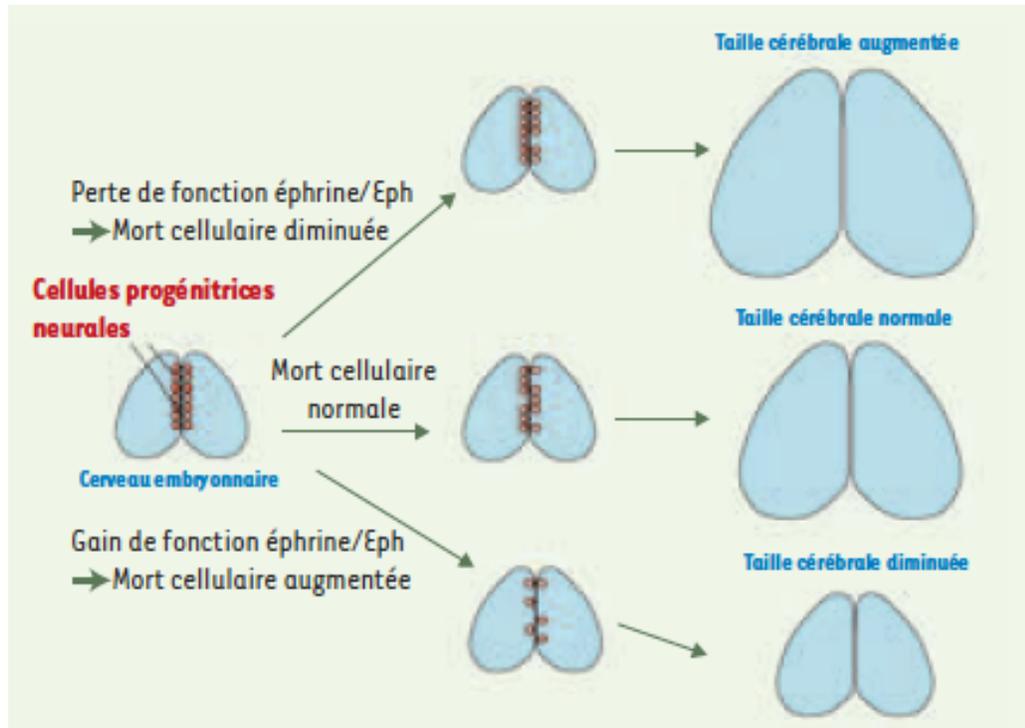


Figure 5. Rôle d'EphA7 dans le contrôle de la taille du cerveau

Les cellules progénitrices neurales (en rouge) sont à l'origine de l'ensemble des neurones engendrés au cours du développement cérébral. Une certaine proportion de ces cellules meurt par apoptose, notamment sous l'effet de signaux Efn/Eph. En cas de gain de fonction de la voie Efn/Eph, la mort cellulaire des progéniteurs est augmentée, causant une déplétion des progéniteurs ; il en résulte une diminution de la taille cérébrale à la naissance. En cas de perte de fonction de la voie Efn/Eph, la mort cellulaire des progéniteurs est diminuée, avec, pour résultat, une augmentation de la taille du cerveau. Tiré de Depaepe and Vanderhaegen (2005), avec permission.

2.7.2.3. Guidage axonal

Plusieurs études ont démontré un rôle important d'EphA7 dans la formation de projections axonales organisées topographiquement dans différentes régions du cerveau.

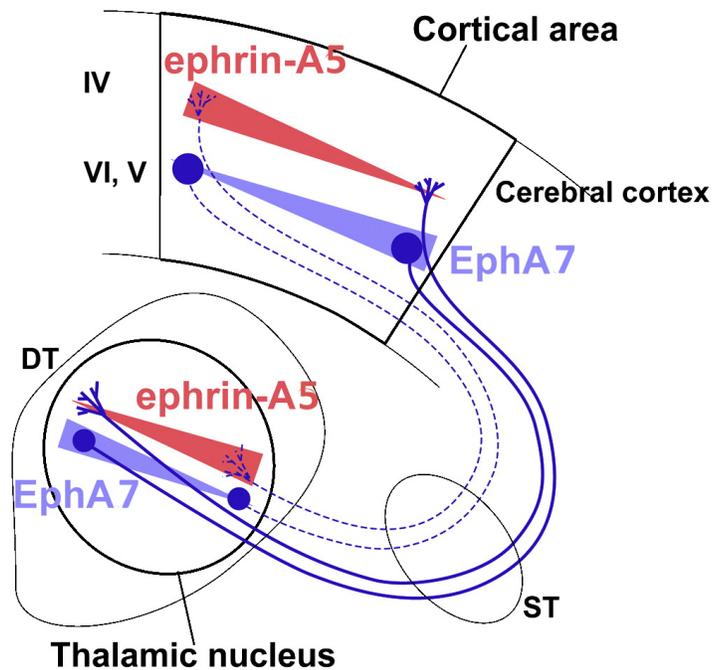


Figure 6. Modèle représentant le contrôle de l'organisation mutuelle des projections cortico-thalamiques et thalamo-corticales par les gènes EphA7 et EfnA5

EphA7 et l'EfnA5 sont exprimés en gradients complémentaires (indiqués par des triangles rouges et bleus, respectivement) au sein et entre certaines zones spécifiques du néocortex et de leurs cibles dans des noyaux thalamiques. Les axones cortico-thalamiques et thalamo-corticaux avec, respectivement, des niveaux élevés (lignes continues) ou faibles (lignes pointillées) d'EphA7 envoient leurs projections aux domaines avec des niveaux bas ou élevés d'EfnA5 dans leurs cibles réciproques. Modifié avec permission de Torii & Levitt (2005).

Ainsi, selon la connectivité réciproque connue entre le cortex et le thalamus dorsal des rongeurs, le gradient d'expression d'EphA7 dans les couches profondes du néocortex est complémentaire à celui de l'EfnA5 dans les noyaux thalamiques (Lozsadi *et al.*, 1996) (Figure 6). Réciproquement, le gradient d'expression d'EphA7 dans les noyaux thalamiques est également complémentaire à celui de l'EfnA5 dans la couche IV du cortex (Fabri & Burton, 1991; Deschenes *et al.*, 1998) (Figure 6).

Aussi, une étude de Torii et Levitt (2005) a démontré, par électroporation *in utero*, que le niveau d'expression d'EphA7 dans les neurones du néocortex, contrôle la topographie des projections cortico-thalamiques au sein des noyaux thalamiques. Cette cartographie régulée par EphA7 est indépendante du positionnement relatif des axones cortico-thalamiques dans les faisceaux traversant le télencéphale sous-cortical et de l'organisation topographique des axones thalamo-corticaux. Torii et Levitt (2005) ont aussi démontré une différence nette entre les mécanismes de guidage des projections cortico-thalamiques et thalamo-corticales. En effet, une étude antérieure de Dufour et collaborateurs (2003) avait démontré que le guidage des axones thalamo-corticaux nécessitait une interaction entre EphA7 et l'EfnA5 dans le télencéphale sous-cortical. Ainsi, l'absence de perturbation dans l'organisation des axones cortico-thalamiques, dans le télencéphale sous-cortical, à la suite d'une altération des niveaux d'expression d'EphA7 (Torii & Levitt, 2005), contrastait avec la désorganisation des projections thalamo-corticales dans le télencéphale sous-cortical déficient en EphA7 ou en EfnA (Dufour *et al.*, 2003). Ces observations indiquent que c'est au niveau même des noyaux thalamiques

dorsaux individuels que s'exerce l'influence d'EphA7 et de l'EfnA5 sur l'organisation topographique des projections cortico-thalamiques.

Une autre étude a indiqué un rôle potentiel d'EphA7 dans le guidage des axones rétino-colliculaires pendant le développement du système visuel chez la souris (Rashid *et al.*, 2005). Chez la souris de type sauvage, les axones temporaux et nasaux projettent respectivement dans les portions antérieure et postérieure des collicules supérieurs (Figure 7). Par contre, chez la souris EphA7^{-/-}, des traçages antérogrades et rétrogrades des axones des cellules ganglionnaires de la rétine a montré que, alors que les axones temporaux continuaient d'innervier la zone antérieure des collicules supérieurs, ceux provenant de la rétine nasale avaient aussi des projections aberrantes dans cette même zone antérieure (Figure 7). En outre, la zone des cellules ganglionnaires marquées dans la rétine temporale à partir des collicules supérieurs était considérablement élargie chez la souris EphA7^{-/-}.

La morphologie *in vitro* des cônes de croissance de neurones hippocampiques mutants pour EphA7 est aussi modifiée comparativement à celle des mêmes neurones de type sauvage (Yue *et al.*, 2002). En effet, les neurones hippocampiques déficients en EphA7 se distinguent facilement des neurones témoins par leurs cônes de croissance plus petits et la longueur et le nombre de leurs filopodes plus élevés (Yue *et al.*, 2002). D'ailleurs, l'expression d'un récepteur EphA7 tronqué dans le cerveau de souris cause une altération marquée de la carte topographique hippocampo-septale (Yue *et al.*, 2002).

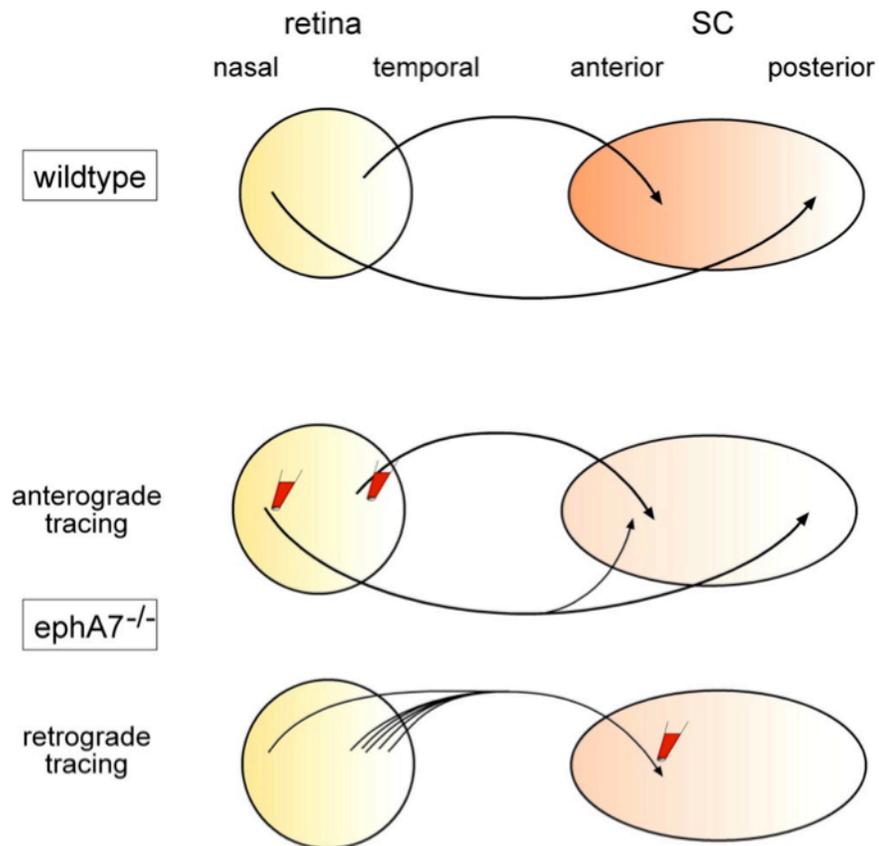


Figure 7. Défauts de ciblage topographique des axones naso-rétiniens chez la souris *EphA7^{-/-}*.

Chez la souris de type sauvage, les axones temporaux et nasaux projettent respectivement dans les portions antérieure et postérieure des collicules supérieurs. Par contre, chez la souris *EphA7^{-/-}*, des traçages antérogrades et rétrogrades des axones des cellules ganglionnaires de la rétine ont montré que, alors que les axones temporaux continuaient d'innervent la zone antérieure des collicules supérieurs, ceux provenant de la rétine nasale avaient aussi des projections aberrantes dans cette même zone antérieure. En outre, la zone des cellules ganglionnaires marquées dans la rétine temporale à partir des collicules supérieurs était considérablement élargie chez la souris *EphA7^{-/-}*.

Tiré avec permission de Rachid & Upton (2005).

2.7.3. Rôles d'EphA7 chez l'adulte

2.7.3.1. Régulation de la prolifération des cellules souches neurales

Les cellules souches et progénitrices neurales sont influencées par la signalisation des Eph et Efn, tant pendant le développement qu'à l'âge adulte (Qiu *et al.*, 2008).

Les deux zones de neurogenèse du cerveau adulte sont la zone sous ventriculaire (sous la paroi des ventricules latéraux) et la zone sous granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe.

Le récepteur EphA7 et l'EfnA2 sont fortement exprimés dans la paroi des ventricules latéraux du cerveau de la souris, avec des motifs d'expression complémentaires et mutuellement exclusifs. Les cellules progénitrices du ventricule latéral ont un cycle cellulaire plus court et une prolifération augmentée chez les souris knockouts EfnA2^{-/-} ou EphA7^{-/-}, suggérant un effet d'inhibition de ces deux protéines sur la prolifération neurale (Holmberg *et al.*, 2005).

L'expression par infection rétrovirale de cellules souches neurales avec EphA7-T1-GFP, une forme tronquée d'EphA7 privée de domaine cytoplasmique et ainsi d'activité kinase fusionnée à la GFP (« *green fluorescent protein* »), a induit une baisse de la prolifération des cellules progénitrices au niveau du ventricule latéral, contrairement au knockout total d'EphA7. Cela signifie que la signalisation antérograde par le récepteur EphA7 n'est pas nécessaire pour sa régulation négative de la prolifération et que sa médiation de cette fonction se fait en activant la signalisation inverse de l'EfnA2 (Holmberg *et al.*, 2005).

2.7.3.2 Inhibition de la régénération axonale dans la moelle épinière

Figuroa et collaborateurs (2006) ont étudié le profil d'expression d'EphA7 après un trauma de la moelle épinière, en utilisant la réaction de polymérase en chaîne quantitative en temps réel QRT-PCR (« *Quantitative Real-time polymerase chain reaction* ») et des techniques d'immunohistochimie. La QRT-PCR a montré une augmentation de l'expression d'EphA7 de pleine longueur, 7 jours après la lésion. L'immunoréactivité du récepteur se trouvait majoritairement dans les astrocytes réactifs de la substance blanche du centre de la lésion. Ces données suggèrent un rôle potentiel pour EphA7 dans le processus de formation de la cicatrice gliale, qui limite la croissance axonale. Chez les animaux témoins, l'expression d'EphA7 a été observée principalement dans les neurones moteurs de la matière grise ventrale, bien qu'une certaine immunoréactivité a été observée dans la substance blanche. Selon les auteurs, cette expression normale d'EphA7 principalement dans les neurones de la moelle épinière servirait peut-être à stabiliser les connexions synaptiques en réduisant la formation de pousses neuritiques ou la formation de connexions synaptiques aberrantes dans le SNC adulte (Figuroa *et al.*, 2006). De plus, des analyses comportementales effectuées sur des rats ayant subi un trauma médullaire et traités avec 5 nmoles d'oligonucléotides antisens d'EphA7, ont montré qu'un blocage de l'expression d'EphA7, 7 j après la lésion, permettait une réduction considérable du dysfonctionnement locomoteur de ces rats par rapport aux témoins traités. Les résultats de Figuroa et collaborateurs (2006), suggèrent un rôle fonctionnel d'EphA7 en tant que régulateur putatif de l'apoptose dans la phase aigüe suivant un traumatisme médullaire. Ceux-ci ont en effet montré une diminution significative de la densité des cellules apoptotiques suivant le

traumatisme chez les rats recevant une injection intrathécale d'oligonucléotides antisens d'EphA7.

2.7.4 Distribution d'EphA7 dans le SNC en développement

Durant l'embryogenèse, EphA7 est transcrit à un niveau élevé dans le système nerveux central (Ciossek *et al.*, 1995; Ellis *et al.*, 1995; Valenzuela *et al.*, 1995; Taneja *et al.*, 1996). Cette expression persiste pendant tous les stades du développement de l'épithalamus, du thalamus, des corps mamillaires de l'hypothalamus, de l'hippocampe, du gyrus dentelé, de la moelle épinière, du rhombencéphale, et aussi, à des niveaux plus faibles, dans le néostriatum.

De hauts niveaux d'EphA7 ont aussi été détectés dans diverses régions du cerveau à certains stades du développement; dans le cervelet aux jours embryonnaires E12.5 et E14.5, dans le tectum antérieur à E16.5 et E18.5, dans le cortex frontal et cingulaire à E12.5, dans le cortex pyriforme à E18.5, dans la zone ventriculaire du télencéphale à E16.5, et à E14.5 dans l'organe sous-commissural (Ciossek *et al.*, 1995).

Le récepteur est aussi exprimé à un niveau modéré dans le cortex cérébral, l'amygdale, l'habénula et le striatum. La distribution de son expression suggère que EphA7 puisse être impliqué dans l'organisation complexe des neurones du système nerveux, notamment des composantes importantes du système limbique.

2.7.5 Distribution d'EphA7 dans le SNC adulte

Comme nous l'avons vu ci-dessus, EphA7 présente un profil d'expression assez étendu dans le SNC de l'embryon de souris (Ellis *et al.*, 1995). Cependant, sa distribution

devient plus restreinte dans le cerveau de la souris adulte (Ciossek *et al.*, 1995; Ciossek *et al.*, 1999). Jusqu'à maintenant, peu d'études ont porté sur la distribution d'EphA7 et de ses isoformes tronquées dans le cerveau de la souris adulte. Il a été rapporté que ce récepteur est très fortement exprimé dans les couches pyramidales de l'hippocampe (CA1, CA2 et CA3) de même que dans les neurones du gyrus dentelé et l'organe sous-commissural. Son expression est relativement faible ailleurs dans le cerveau, avec des niveaux un peu plus élevés dans le striatum et le cortex cingulaire et piriforme, de même que dans l'habénula, les corps mamillaires, le noyau olfactif antérieur et la couche des cellules de Purkinje du cervelet. Ces régions montrant une plus forte expression dans le cerveau adulte avaient aussi une plus forte expression tout au long du développement du SNC. Ciossek et collaborateurs (1999) ont examiné par hybridation *in situ* et immunohistochimie en microscopie photonique la distribution des isoformes de pleine longueur ou tronquée du domaine kinase, dans le cerveau de la souris adulte. Leurs observations montrent que ces isoformes, dénommées ici EphA7-TK⁻ (tronquée, comprenant présumément les isoformes EphA7-T1 et -T2, décrites plus haut) et EphA7-TK⁺ (pleine longueur, incluant le domaine kinase), ont des distributions différentes dans le cerveau adulte. L'hippocampe montre une forte immunocoloration pour EphA7-TK⁺ dans le neuropile de toutes ses régions, mais peu ou pas de coloration dans la couche des corps cellulaires. Aussi, l'immunoréactivité anti-EphA7-TK⁺ semble faible dans le thalamus et le cervelet, alors que les corps mamillaires ne montrent aucun marquage.

En contraste, l'immunoréactivité anti-EphA7-TK⁻ (tronquée) était intense au niveau des corps cellulaires et des dendrites proximales dans un nombre restreint de régions

anatomiques. Certains de ces neurones exprimaient aussi la forme pleine longueur sur leurs axones, notamment les cellules pyramidales du cortex moteur, du cortex piriforme et de l'hippocampe, ainsi que les cellules de Purkinje du cervelet et les neurones du mésencéphale. Cette observation a été interprétée comme une indication que la forme tronquée, EphA7-TK⁻, si elle joue vraiment un rôle d'antagoniste dominant négatif, est localisée de manière à limiter l'action de EphA7-TK⁺ aux prolongements axonaux ou dendritiques. On peut toutefois opposer l'argument que, vu que l'isoforme pleine longueur semble déjà localisée uniquement dans ces prolongements, l'isoforme tronquée doit servir à autre chose qu'à bloquer l'action d'une protéine absente de la région somatique.

3. Hypothèses et objectifs

L'intérêt pour le récepteur EphA7 est relié à son expression abondante et étendue durant l'embryogenèse chez les vertébrés, du poisson à l'humain, et à son rôle dans les mouvements et l'adhésion cellulaires, notamment dans le guidage axonal. Il pourrait aussi jouer un rôle dans la plasticité synaptique ou dans les mécanismes qui restreignent la régénération axonale dans le SNC adulte. Enfin, il semble étroitement associé, chez l'adulte, aux régions du système limbique et particulièrement à l'hippocampe, une région cérébrale largement utilisée dans l'étude de la plasticité synaptique. Nous avons ainsi entrepris d'examiner la distribution régionale de ce récepteur dans le cerveau adulte et sa localisation ultrastructurale ou subcellulaire, dans l'hippocampe.

Notre hypothèse générale voudrait que la localisation d'EphA7 reflète ses fonctions. Par exemple, au niveau synaptique dans le SNC adulte, cette connaissance devrait permettre de mieux comprendre son rôle, s'il est localisé en présynaptique ou en postsynaptique, à la surface des dendrites, épines ou terminaisons axonales, ou encore dans les astrocytes.

Les objectifs généraux de mon travail de maîtrise étaient de cartographier la distribution régionale et subcellulaire du récepteur EphA7 dans le cerveau du rat et de la souris adultes, afin de mieux appréhender ses rôles fonctionnels potentiels. Dans le cadre de cette maîtrise, l'analyse ultrastructurale, en microscopie électronique s'est limitée à la région CA1 de l'hippocampe. Mais, des travaux en cours visent à compléter cette analyse dans les autres régions hippocampiques, de même que dans le cervelet.

Matériels et méthodes

1. Animaux

Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le *Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux* (CDEA) de l'Université de Montréal. Toutes les procédures ont été réalisées en respectant les directives du *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation* du *Conseil canadien de protection des animaux* (CCPA). Les animaux ont été hébergés à température (21 °C) et humidité (60 %) constantes, sous un cycle de 12 h de clarté/noirceur, avec accès libre à la nourriture et à l'eau.

Pour l'**immunocytochimie** nous avons utilisé 3 souris adultes de la lignée C57BL/6, âgées de 5-6 mois, et 1 rat adulte Sprague-Dawley, âgé de 5 mois (Charles River, St-Constant, Québec, Canada). Les animaux ont été profondément anesthésiés avec 0,5 ml/100 g d'une solution de kétamine (40 mg/ml) et de xylazine (2mg/ml) injectée par voie intrapéritonéale (i.p.) et perfusés par voie transcardiaque avec une solution de PLP (périodate-lysine-paraformaldéhyde) (McLean & Nakane, 1974), dans un tampon phosphate sodique (PB) 0,1M, à pH 7,4. Les cerveaux ont ensuite été prélevés et immergés dans le paraformaldéhyde (PFA) 4 % pendant 1 heure à 4 °C, puis rincés 2 X 10 min dans du PB salin (PBS; 0,9% NaCl dans PB 50 mM, pH 7.4). Des coupes coronales des cerveaux (6 séries) ont été obtenues avec un microtome à vibrations (Leica, VT1000S) à une épaisseur de 40 µm dans du PBS refroidi. Elles ont ensuite été conservées à -20°C dans un mélange antigél (40% PB 0,2 M, pH7.4, 30% glycérol, 30% éthylène glycol), jusqu'à l'utilisation.

Pour l'**hybridation *in situ*** (réalisée dans le laboratoire du Pr Guy Drolet, Université Laval, à Québec, à partir de plasmides contenant les insertions EphA7 sens et antisens produits par notre

laboratoire), 2 souris adultes C57BL/6 âgées de 2-3 mois et 2 rats adultes Sprague-Dawley âgés de 2-3 mois (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) ont été utilisés. Les animaux ont été profondément anesthésiés avec une solution de kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) i.p. et perfusés par voie transcardiaque avec une solution de PFA 4% dans un tampon borax (tétraborate de sodium, 0,1 M à pH 9.5). Les cerveaux ont été prélevés et post-fixés pendant 24 h dans le PFA 4%/borax à 4 °C. Puis, les cerveaux ont été placés dans une solution à 20% de sucrose/PFA 4%/borax à 4 °C, pour la cryoprotection. Ils ont été congelés et coupés sur un cryomicrotome à glissière (Leica SM2400 Sledge Microtome) en coupes coronales de 30 µm d'épaisseur. Les coupes ont été collectées dans une solution antigel et gardées à -20 °C.

2. Immunocytochimie

2.1. Anticorps

L'anticorps polyclonal anti-EphA7 nous a été gracieusement fourni par Dre Elena Pasquale (Burnham Institute, LaJolla, Californie). L'antisérum a été produit chez le lapin contre un peptide correspondant à la séquence des 105 derniers acides aminés de la portion intracellulaire de la protéine EphA7 de la souris (domaine SAM + motif de liaison PDZ, voir Figure 4), fusionné à la protéine GST (glutathion S-transférase). Il ne détecte donc pas les isoformes T1 et T2 d'EphA7, et serait théoriquement sélectif pour les isoformes de pleine longueur, aptes à la transduction du signal (Figure 4).

2.2. Traitement immunocytochimique des coupes

Les coupes ont été rincées dans le PBS et traitées avec du borohydrure de sodium 0.1% dans le PBS pendant 30 min à la température ambiante (~22 °C). Après 3 autres rinçages dans du PBS, les coupes flottantes ont été traitées selon un protocole d'immunoperoxydase (Figure 8).

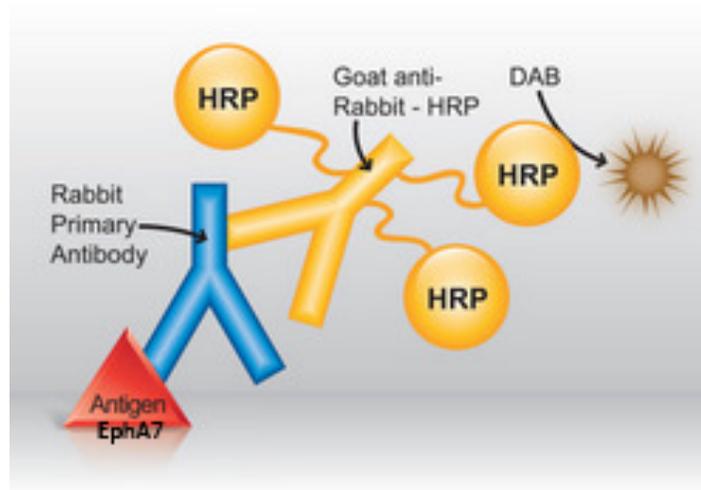


Figure 8. Détection immunohistochimique de la protéine EphA7 avec le kit *EXPOSE* de Abcam.

Les réactifs de ce kit constituent un système sans biotine immuno-enzymatique de détection d'antigène. Cette technique implique l'incubation séquentielle de l'échantillon (coupes flottantes de cerveau) avec un anticorps primaire non conjugué et spécifique à l'antigène cible (ici EphA7). Un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à la HRP (« *horse radish peroxidase* » ou peroxydase du raifort) reconnaît ensuite l'anticorps primaire. Ensuite, on révèle, en présence de H_2O_2 , l'activité enzymatique de la HRP avec la DAB comme chromogène qui, par oxydation, forme un précipité brun insoluble et électron dense, visible en microscopie électronique.

Adapté de <http://www.abcam.com>.

Les coupes ont subi une préincubation de 1 h à température ambiante dans une solution de blocage de PBS contenant 5% de sérum normal de chèvre et 0,5 % de gélatine, avec ou sans

0,3 % de Triton X100. Les coupes ont ensuite été incubées avec 0,5 µg/ml de l'anticorps primaire anti-EphA7 dilué dans la même solution de blocage, pendant 48 h à 4 °C sur agitateur. Après trois rinçages de 10 min dans le PBS, le marquage a été révélé en utilisant un kit commercial (*EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit*, Abcam, Cambridge, MA, USA, # ab80437; Figure 8), en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, les coupes ont été incubées avec la solution d'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à l'HRP (*horse radish peroxidase* ou peroxydase du raifort) pendant 30 minutes sur agitateur à température ambiante, puis les coupes rincées ont été traitées avec une solution mixte de DAB et de peroxyde d'hydrogène pendant 3 minutes.

Après plusieurs rinçages dans le PBS, les coupes destinées à la microscopie photonique (traitées avec le Triton X100) ont été étalées sur lames, déshydratées dans des concentrations croissantes d'éthanol, dégraissées dans du toluène, puis recouvertes avec du milieu de montage DPX (Fluka, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) et une lamelle.

Les coupes destinées à la microscopie électronique (incubation sans Triton X100) ont été rincées dans du PB 0,1M, puis post-fixées à plat dans une solution de tétraoxyde d'osmium (OsO₄) 1 % pendant 1 h, à 4 °C sur agitateur. Après déshydratation dans des bains d'éthanol à concentrations ascendantes (de 35 % à 100 %), les coupes ont été imprégnées avec un mélange 1 :1 d'oxyde de propylène et de Durcupan ACM (Sigma, St Louis, MO USA) durant une nuit, à température ambiante. Elles ont ensuite été montées dans le Durcupan pur, entre films d'ACLAR (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), et polymérisées au four à 55°C pendant environ 48 h. Les zones d'intérêt ont été identifiées au microscope photonique, découpées des films d'ACLAR avec un scalpel et fixées sur des blocs de résine pré-polymérisés.

Des coupes ultrafines, de 50-70 nanomètres d'épaisseur, ont été obtenues avec un ultramicrotome (Reichert Ultracut S; Leica, Wetzlar, Allemagne), prélevées sur des grilles de cuivre, colorées avec du citrate de plomb et examinées au microscope électronique (Philips CM 100). Les négatifs des micrographies ont été numérisés à 1200 dpi avec le numériseur Epson Perfection 3200. Les images ont été converties en images positives et le contraste a été ajusté avec le logiciel Adobe Photoshop CS.

Pour *l'immunofluorescence en microscopie confocale*, des coupes de cerveaux de rat adultes fixés au PLP ont été rincées 3 X 10 minutes dans du TBS (« *Tris-buffered saline* ») 0,1M à pH 7,4, contenant 0,05 % de Triton X100. Après 1 h d'incubation avec la solution de blocage (TBS 0,1M, 3 % NGS; 0,1 % Triton X-100 et 1 % gélatine), les coupes ont été incubées pendant 24 h à 4 °C avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-EphA7 dilué dans la même solution de blocage. Après 3 rinçages de 10 min dans le TBS contenant 1 % de NGS, les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin-Alexa Fluor® 488 pendant 1 h puis, après des rinçages dans le TBS, elles ont été montées sur des lames gélatinisées avec le milieu de montage « *Prolong Gold antifade reagent* » (Invitrogen, P36930). Elles ont été examinées au microscope confocal (Leica DM IRBE) avec une source laser à l'argon, incluant la ligne spectrale de 488 nm pour l'Alexa Fluor 488.

3. Hybridation in situ

3.1. Construction des plasmides contenant les insertions d'EphA7

Un fragment de 487 pb comprenant les nucléotides 401 à 888 (NM_001122889.1) et correspondant spécifiquement à l'exon 3 du gène EphA7 (GENE ID: 13841 EphA7), tel

qu'illustré dans la Figure 7, a été obtenu par une autre étudiante du laboratoire, en collaboration avec Frédérique Badeaux, dans le laboratoire de Pr L. DesGroseillers (Baharnoori, 2007) à partir de l'ADN génomique extrait de cellules en culture de la lignée cellulaire de souris Neuro2A. Ce fragment encode la partie extracellulaire de la protéine EphA7 (acides aminés 55 à 217 de ce domaine, tels qu'illustré dans la Figure 7 ; NP_034271.3). En conséquence, la ribosonde antisens générée devrait détecter les cinq isoformes du récepteur EphA7 (Figure 4).

L'insertion de ce fragment dans des plasmides pBluescript II SK+/- (2 plasmides distincts permettant la synthèse des ribosondes sens et antisens avec les promoteurs T7 et T3) a été effectuée en utilisant les amorces suivantes : EphA7 sens, 5' - AAG AAT TCG TGG GAA GAA ATT AGT GGT TTG-3' ; et EphA7 antisens, 5' - TTG AAT TCG GAA AGA CAG CTA AGT TCT CAA-3'.

A) Séquence du gène d'EphA7 de souris (NM_001122889.1)

```

1   gtggagcaag cggccggtct gcagtcggag acttgcaggc agcaaacacg gtgcgaacga
61  accggagggg ggagagagaa atcaaacagc taagcgtgga gcagacggcc tgggacccag
121 aaggggatcg atgcgaggag cgcaataata acaacaataa taaccactt cggagcaaac
181 agcatctaaa gagctgagac ccaactgcag cctaaaaaaa tcaaacctgc tcatgcacca
241 tggttgttca aactcggttc cttcgtgga ttatTTTgtg ttacatctgg ctgcttggct
301 ttgcacacac gggggaggcg caggctgcga aggaagtact attactggac tcgaaagcac
361 aacaaacaga attggaatgg atttcctctc caccagtggt gtgggaagaa attagtggtt
421 tggatgagaa ctacactccg ataagaacat accagggtgtg ccagggtcatg gagcccaacc
481 agaacaactg gctgaggact aactggattt ctaaaggcaa cgacacaaagg atTTTTgtag
541 aattgaaatt caccttgagg gattgtaata gtcttcccgg agtctggga acttgcaagg
601 aaacgtttaa tttgtactat tatgaaacag actacgacac cggcaggaat atacgagaaa
661 acctttatgt taaaatagac accattgctg cagatgaaag tttcacacaa ggtgaccttg
721 gtgaaagaaa gatgaagctg aacactgagg tgagagagat tggacctttg tccaaaaagg
781 gattctatct tgcctttcag gatgtagggg cttgcatagc attggtttct gtcaaagtgt
841 actacaagaa gtgctgggtcc attgttgaga acttagctgt ctttcagat acagtgactg
901 gttcgggaatt ttctcctta gtcgaggtcc gtgggacatg tgtcagcagt gccgaggaag

```

B) Séquence protéique du domaine extracellulaire d'EphA7 de souris (NP_034271.3)

```

1   mvvqtrfpsw iilcyiwllg fahtgeaqaa kevlldska qqtelewiss ppsgweeisg
61  ldenytpirt yqvcqvmepn qnnwlrtnwi skgnaqrifv elkftlrdsn slpgvlgtck
121 etfnlyyyet dydtgrnire nlyvkidtia adesftqgdL gerkmklnte vreigplsck
181 gfylafqdvG acialvsvkv yykkcwsive nlavfpdtvT gsefsslvev rgtcvssaee
241 eaensprmhC saegewlvpi gkcickagyq qkgdtcepcg rrfyksssqd lqcsrCpThS
301 fsdregssrc ecedgyrap sdppyvactr ppsapqnlif ninqttvsle wsppadnggr
361 ndvtyrilck rcsweqgecv pcgsnigymp qqtglednyv tvmdllahan ytfeyeavng
421 vsdlrsqrL faavsittgq aapsqvsgvm kervlqrsVq lswqephepn gviteyeiky
481 yekdqreRty stlktktsa sinnlkgptv yvfqiravta agygnysprL dvatleasg

```

Figure 9. Séquence partielle d'EphA7 utilisée pour l'insertion dans les plasmides pBluescript II SK+/-

- A) Les nucléotides 401 à 888, colorés en rouge, correspondent à l'insertion de 487 paires de bases (NM_001122889.1).
- B) Acides aminés 55 à 217 du domaine extracellulaire d'EphA7 colorés en vert (NP_034271.3) codés par la séquence insérée et illustrée en A.

3.2. Synthèse des ribosondes sens et antisens

Pour synthétiser les ribosondes, on a d'abord dû linéariser les plasmides. À cette fin, 15 μ l du plasmide « antisens » pBluescript (0.36 μ g/ μ l) ou du plasmide « sens » pBluescript (0.47 μ g/ μ l) ont été linéarisés avec 2 μ l de l'enzyme de restriction appropriée (Not-I pour le plasmide sens, et HindIII pour le plasmide antisens), 2 μ l de leur tampon respectif et 1 μ l d'H₂O. Une électrophorèse sur gel (agarose 1% avec bromure d'éthidium) a été effectuée en présence de 1 Kb d'un marqueur d'étalonnage en échelle d'ADN et des plasmides digérés. Après migration à 120 V pendant 45 min, les gels ont été visualisés sous lumière UV et les bandes correspondant aux plasmides linéarisés ont été découpées au scalpel. L'ADN a été extrait du gel et purifié en utilisant un kit commercial (QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAGEN).

Les ribosondes radioactives antisens et sens ont été produites par transcription *in vitro* à partir des plasmides linéarisés, en utilisant la polymérase T7 (ribosonde antisens), ou la polymérase T3 (ribosonde sens), par l'incubation de 250 ng des plasmides linéarisés respectifs dans un tampon de transcription 5X (tampon 1X : 6 mM MgCl₂, 30-40 mM Tris à pH 7,9, 2 mM spermidine, 10 mM NaCl, 10 mM dithiothréitol, 0,2 mM R-ATP/GTP/CTP, 100 μ Ci d' α -³⁵S-UTP, 40 U de RNasin, et 20 U d'ARN polymérase) pendant 60 min à 37 °C. Les ribosondes ont été purifiées sur des colonnes miniQuick-spin RNA (Roche Diagnostics).

3.3. Traitement des coupes

Les protocoles pour l'hybridation et la localisation autoradiographique du signal de l'ARNm ont été précédemment décrits (Holmberg *et al.*, 2000; Henkemeyer, 2003; Aoto & Chen, 2007; Mougnot *et al.*, 2007).

Brièvement, toutes les solutions ont été traitées au DEPC (Di-éthyl-pyro-carbonate) et stérilisées pour éviter la dégradation de l'ARNm. Les coupes de cerveau ont été rincées dans le PBS, montées sur des lames chargées positivement (Surgipath), séchées sous vide pendant une nuit, fixées dans du PFA 4 % pendant 20 min, et digérées par la protéinase K à 37 °C pendant 25 min. Par la suite, les coupes ont été rincées à l'eau stérile traitée au DEPC et contenant de la triéthanolamine 100 mM (pH 8,0), puis acétylées avec 0,25 % d'anhydride acétique dans 100 mM de triéthanolamine et déshydratées dans des solutions à concentrations progressives d'éthanol (50, 70, 95, et 100 %). Elles ont ensuite été séchées sous vide pour un minimum de 2 h.

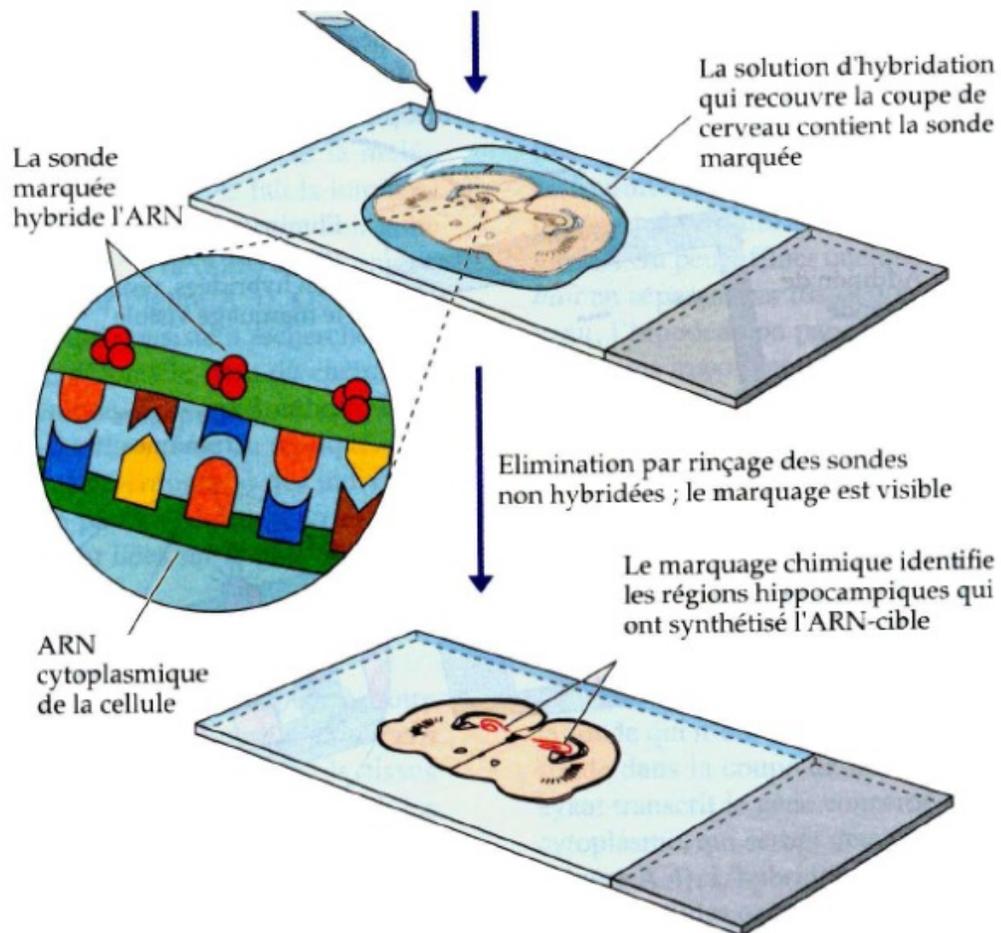


Figure 10. Détection de l'hybridation *in situ* d'EphA7 par autoradiographie à haute résolution

Afin de détecter la présence de la sonde EphA7 radioactive au niveau cellulaire, la coupe du cerveau étalée sur une lame chargée positivement, est recouverte avec 90 μ l de la solution d'hybridation. Après élimination par rinçage des sondes non hybridées, la présence de la sonde EphA7 radioactive hybridée sur l'ARNm cytoplasmique cible se traduit, après révélation de l'émulsion photographique, par la présence de grains d'argent sur les cellules.

(<http://www.ufrsdv.u-bordeaux2.fr>)

Une concentration de 10^7 cpm/ml de ribosonde a été mélangée dans la solution d'hybridation (pour chaque ml, 518 μ l de formamide, 62 μ l de NaCl 5 M, 10 μ l de Tris 1 M, à pH 8.0, 2 μ l d'EDTA 0.5 M (acide éthylène diamine tétraacétique) à pH 8.0, 20 μ l de 50 \times de solution Denhart's, 207 μ l de dextrane sulfate 50 %, 50 μ l d'ARN de transfert à 10 mg/ml, 10 μ l de dithiothreitol 1 M, 118 μ l H₂O (0,01% DEPC), moins le volume de la sonde utilisée). Le mélange a été chauffé pendant 5 min à 65 °C avant d'être déposé (90 μ l) sur les coupes montées (Figure 8) sur lames et scellé sous une lamelle pour une incubation à 58 °C pendant une nuit (~15-20 h).

Les lamelles ont ensuite été retirées et les lames ont été rincées dans un tampon citrate salin standard 4X (CSS; 1x CSS: 150 mM de NaCl, 15 mM tampon citrate trisodique, pH 7,0) à la température ambiante. Les coupes ont été traitées à la RNase A (10 mg/ml, à 37 °C, pendant 30 min), rincées avec des concentrations décroissantes de SSC (2x, 1x, 0,5x SSC), puis avec 0,1x SSC pendant 30 min à 60 °C, et déshydratées avec des concentrations croissantes d'éthanol. Après un séchage de 2 h sous vide, les coupes ont été exposées à 4 °C à un film radiographique (Kodak) pendant une nuit, dégraissées dans le xylène et trempées dans l'émulsion nucléaire liquide (NTB, Kodak; diluée 1:1 avec de l'eau distillée). Les lames ont été exposées pendant 15 j, développées dans le D19 (Kodak) pendant 3,5 min à 14-15 °C, et fixées dans le *Kodak Rapid Fix* pendant 5 min. Les coupes ont ensuite été rincées à l'eau distillée pendant 1 - 2 h, déshydratées avec des concentrations progressives d'éthanol et couvertes de lamelles avec le milieu de montage DPX.

Résultats

1. Expression régionale du récepteur EphA7 détectée par hybridation *in situ* dans le cerveau adulte

La spécificité de la sonde antisens utilisée pour l'hybridation a été démontrée par l'absence du marquage dans l'hippocampe de la souris adulte en utilisant la sonde sens. Ces sondes étaient marquées avec de la digoxigénine (Baharnoori, 2007) (Figure 11).

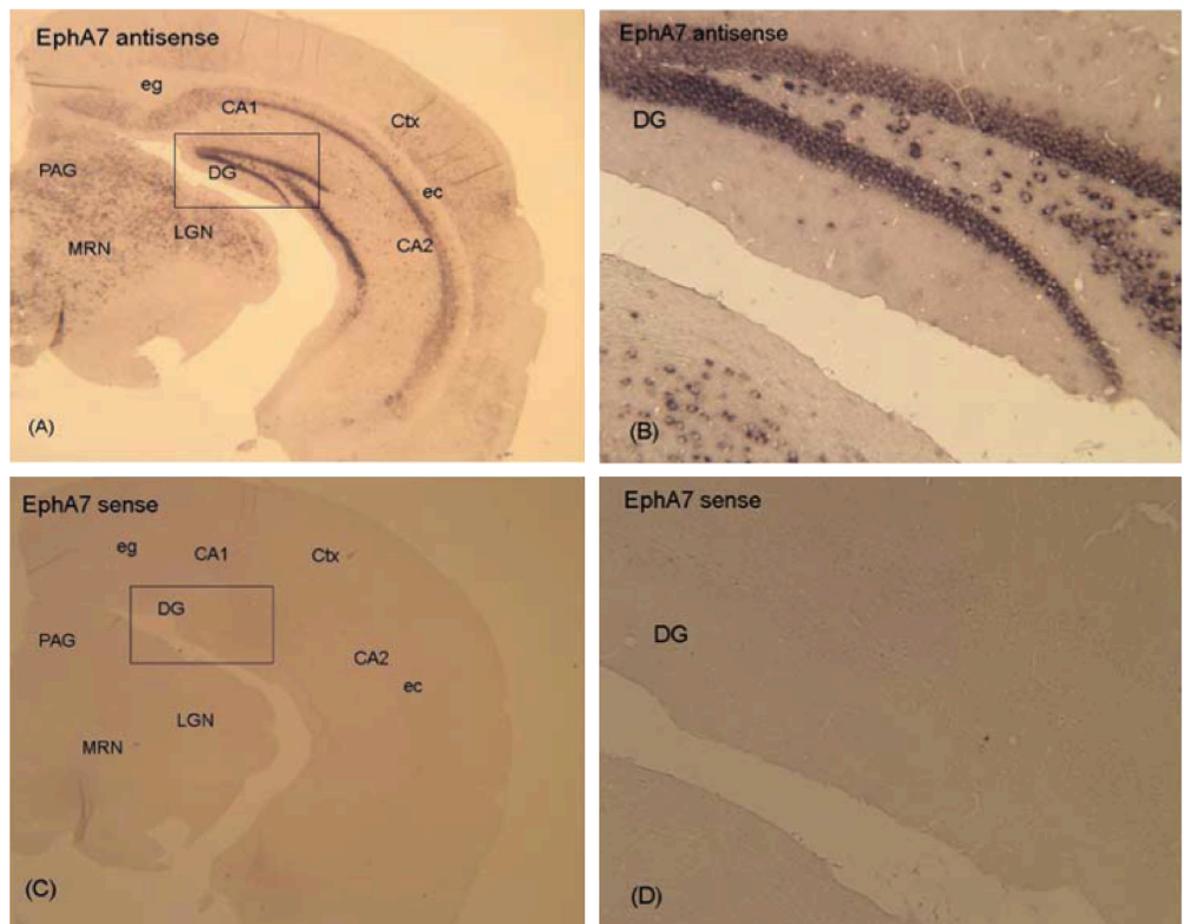


Figure 11. Spécificité des ribosondes EphA7

Tiré et modifié de (Baharnoori, 2007)

Nous avons cartographié l'expression régionale d'EphA7 dans le cerveau du rat et de la souris adultes par hybridation *in situ* (Figures 12 et 13). Le signal d'expression observé était généralement semblable chez le rat et la souris. Le marquage le plus remarquable a été détecté dans l'hippocampe, surtout dans les couches des cellules pyramidales de CA1, CA2, CA3 et des cellules granulaires du gyrus dentelé (Figure 12c, d, e et Figure 13d, e, f). L'expression était plus modérée dans l'habénula médiane (Figures 12e et 13d, e), le striatum (Figures 12b et 13b, c), l'amygdale (Figures 12c, e et 13e, f), les corps mamillaires (Figure 13f) le cortex cingulaire (Figures 12a, b et 13b, c, d, e, f), piriforme (Figures 12a, b, d et 13b, c) et entorhinal (Figures 12e et 13e), et plus faible dans le cervelet en général (Figures 12f et 15a, b) – quoique assez marqué dans la couche des cellules de Purkinje, faible dans la couche moléculaire et apparemment absente dans la couche granulaire (Figure 15b, d, f) - et dans le noyau olfactif antérieur (Figures 12a et 13a).

Des niveaux d'expression plutôt faibles ont été détectés dans le néocortex (Figures 12b, c, d, e et 13a, b, c, e), le thalamus (Figures 12c, d et 13c, d, e) et l'hypothalamus (Figure 13d, f).

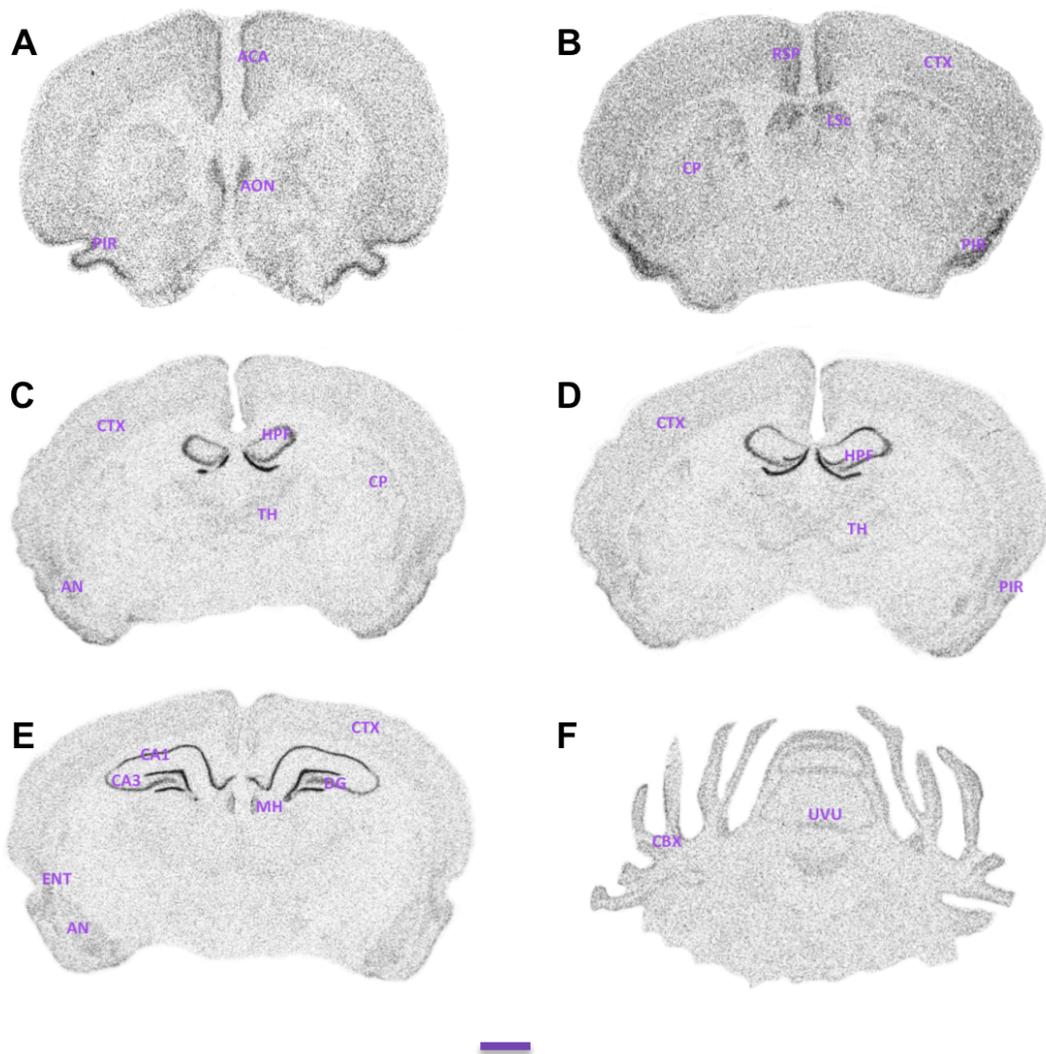


Figure 12. Distribution d'EphA7 selon l'hybridation *in situ* dans le cerveau du rat

Images autoradiographiques de l'hybridation *in situ* montrant la distribution d'expression de l'ARNm de EphA7 à travers des coupes coronales de cerveau du rat adulte. Abréviations : CTX, néocortex; ACA, aire cingulaire antérieure; CP, caudé-putamen; LSc, portion caudale du noyau septal latéral; TH, thalamus; MH, habénula médiane; HY, hypothalamus; RSP, aire rétrospléniale; HPF, formation de l'hippocampe; DG, gyrus dentelé; ENT, aire entorhinale; PIR, cortex pyriforme région de l'amygdale; AN, noyau amygdalien; AON, noyau olfactif antérieur; CBX, cortex cérébelleux; Uvu, Uvula, barre d'échelle =1mm. Nomenclature d'après Paxinos et Watson (1986).

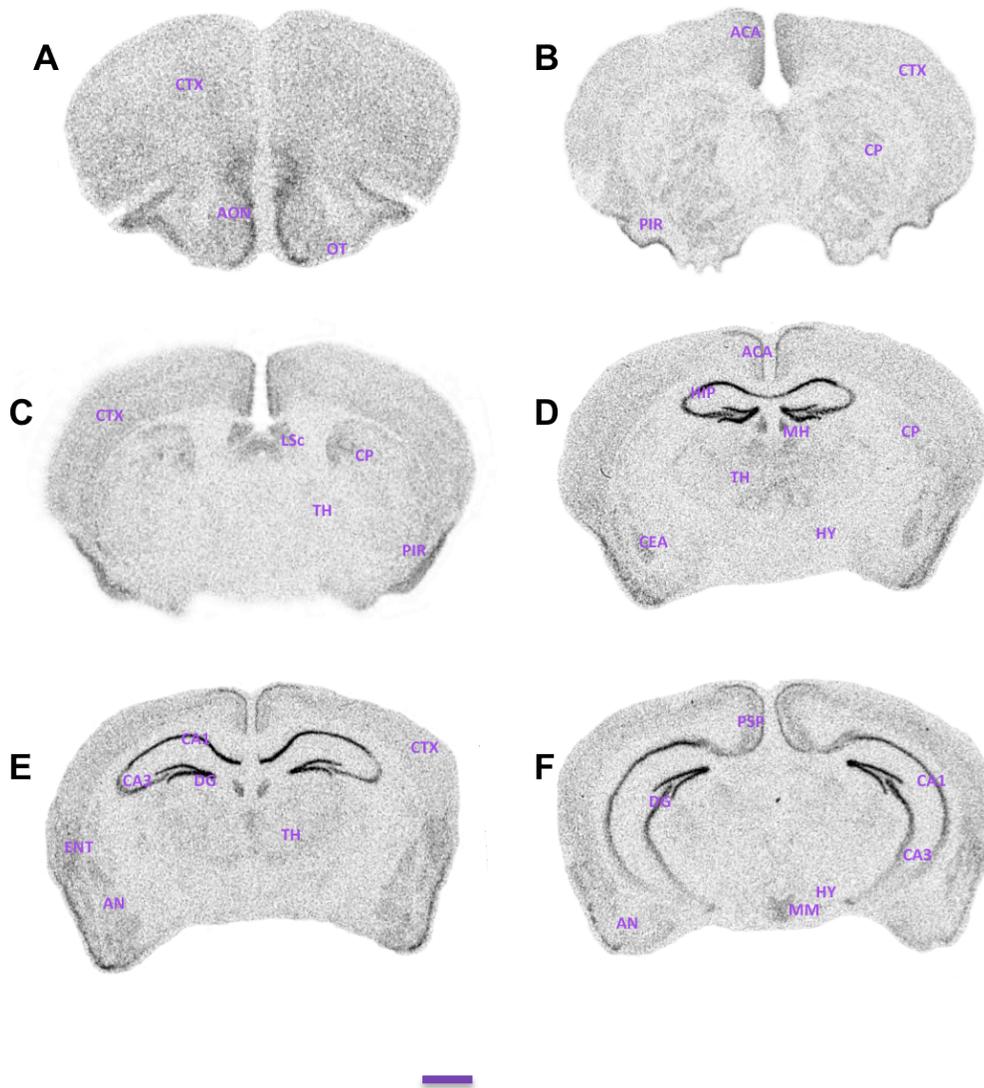


Figure 13. Distribution d'EphA7 selon l'hybridation *in situ* dans le cerveau de souris

Images autoradiographiques de l'hybridation *in situ* illustrant la distribution de l'expression de l'ARNm d'EphA7 sur coupes coronales du cerveau de souris adulte. Abréviations : voir la Figure 11; MM, noyau mamillaire médian; OT, tubercule olfactif. Barre d'échelle = 1mm. Nomenclature d'après Paxinos et Franklin (2008).

2. Distribution du récepteur EphA7 détectée par immunohistochimie dans le cerveau murin adulte

Le marquage immunohistochimique obtenu avec l'anticorps anti-EphA7 utilisé dans cette étude, était conséquent avec celui de l'expression de l'ARNm révélée par l'hybridation *in situ* sur coupes du cerveau de souris ou de rat adultes, en tenant compte du fait que l'hybridation *in situ* montre l'ARNm, qui est présent dans les corps cellulaires, alors que l'immunohistochimie révèle la localisation de la protéine, qui peut demeurer dans le corps cellulaire ou être transportée dans les dendrites ou les axones (Figure 14). Cela est particulièrement clair dans la formation de l'hippocampe, où l'hybridation *in situ* marque fortement les couches de corps cellulaires des régions CA1, CA2, CA3 et DG, tandis que l'immunohistochimie colore intensément les mêmes régions, mais dans les couches de neuropile. Les deux techniques montrent d'ailleurs un marquage un peu plus faible dans CA3, comparativement aux autres secteurs de l'hippocampe ou du DG. Dans le cervelet, par contre, le marquage immunohistochimique est localisé surtout dans les corps cellulaires des cellules de Purkinje, et plus faiblement dans la couche moléculaire, tout en étant absent dans la couche granulaire, comme avec l'hybridation *in situ* (Figure 15). Le marquage en immunofluorescence est aussi très semblable à celui obtenu par immunoperoxydase : par exemple dans les couches du cervelet (Figure 15).

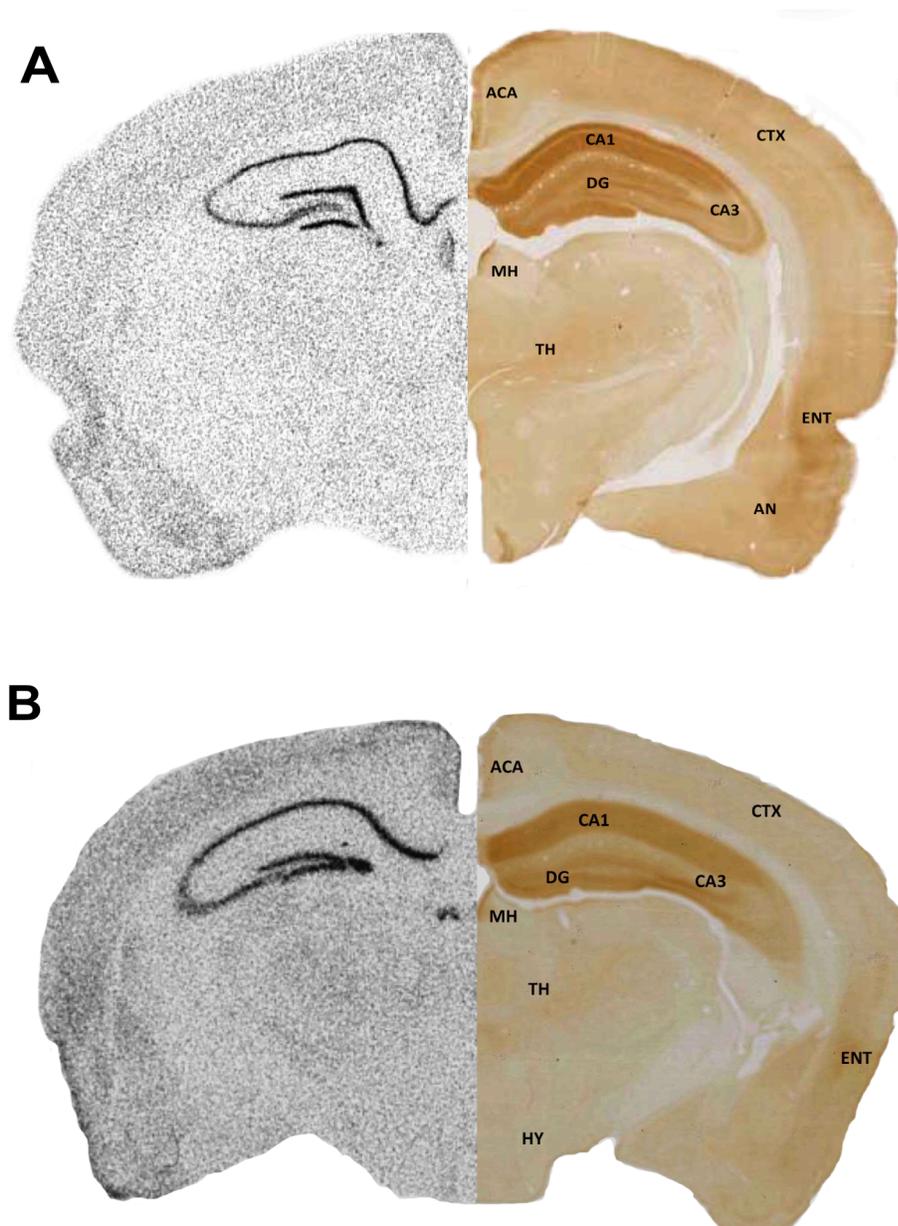
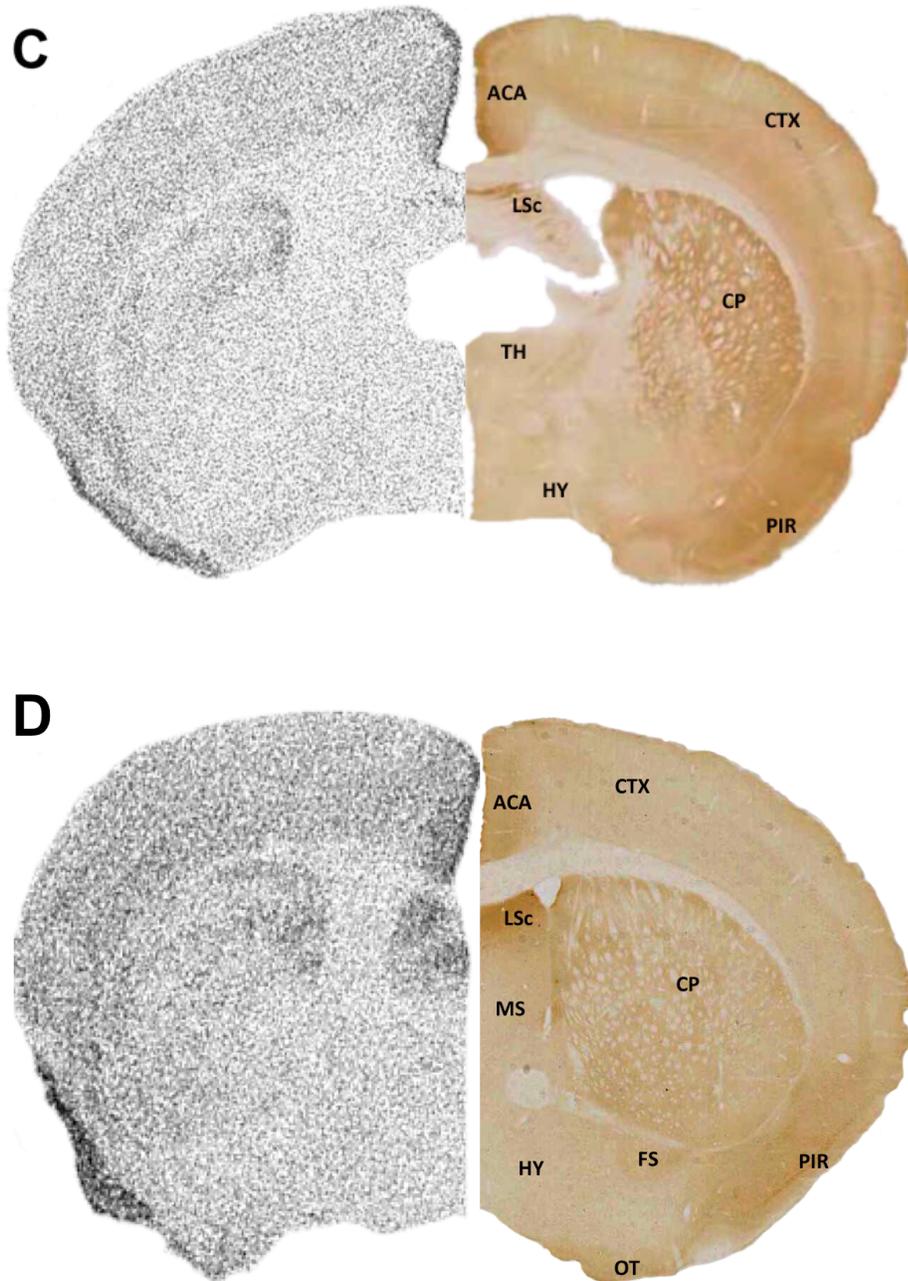


Figure 14. Cohérence de distribution d'EphA7 entre l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*. L'hémi-cerveau gauche montre l'hybridation *in situ* détectée sur film autoradiographique, et celui de droite illustre l'immunohistochimie. A, C) rat; B, D) souris.



Suite de la Figure 14. Noter que les deux techniques montrent un plus fort marquage dans CA1 et dans le gyrus dentelé que dans CA3, dans la formation de l'hippocampe. Abréviations (voir les Figures 12 et 13).

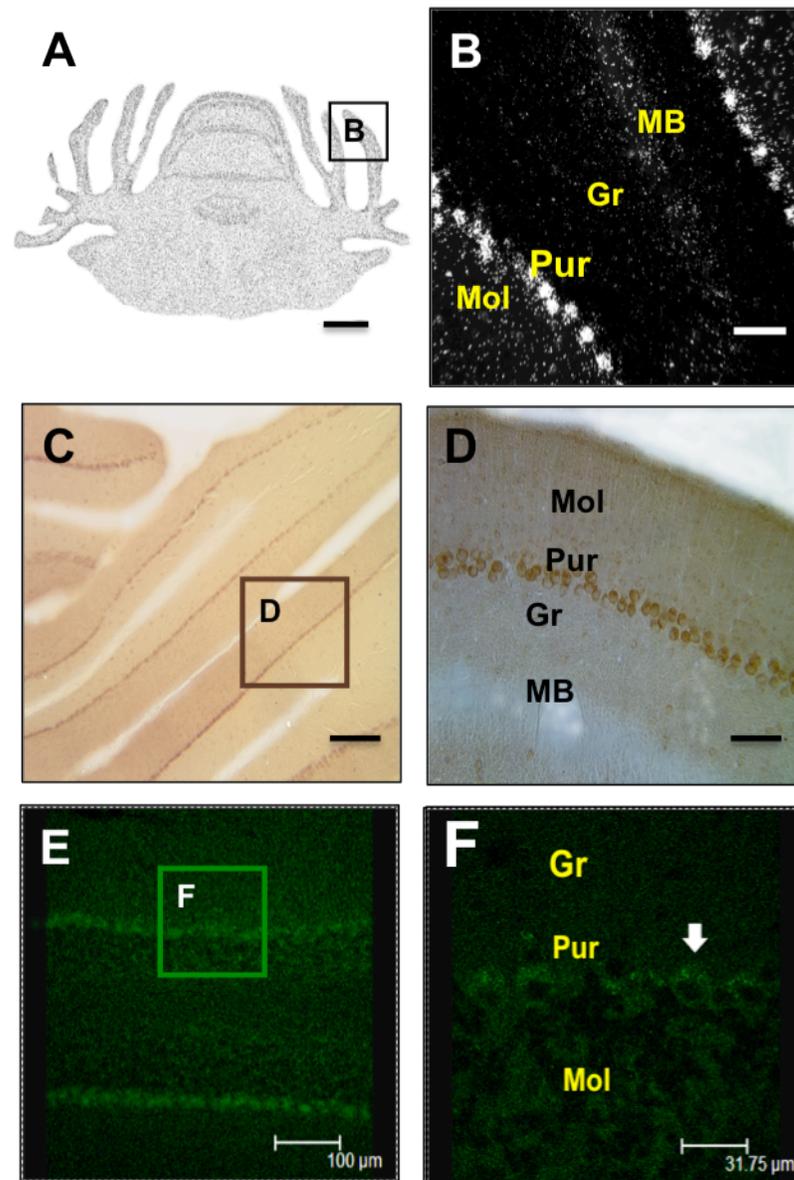


Figure 15. EphA7 dans le cervelet du rat adulte

A) Autoradiographie sur film d'une coupe de cervelet du rat adulte montrant l'expression d'EphA7 en hybridation in situ, B) Micrographie de microscopie optique à fond noir, à plus forte magnification, C) et D) Immunoperoxidase d'EphA7 dans le cervelet, E) et F) Immunofluorescence anti-EphA7 dans le cervelet. Abréviations : GC, couche des cellules granulaires; Mol, couche moléculaire; Pur, couche des cellules de Purkinje; MB, matière blanche. Barres d'échelle : 1 mm (a); 25 μ m (b); 200 μ m (c); 50 μ m (d). Noter que les cellules de Purkinje

sont les plus fortement marquées avec les 3 techniques, tandis que la couche moléculaire montre aussi un certain marquage, quoique faible, autant en hybridation *in situ* qu'en immunoperoxydase ou en immunofluorescence. La couche des cellules granulaires est exempte de marquage tant en hybridation *in situ* qu'en immunoperoxydase ou en immunofluorescence. Cette parfaite correspondance du marquage obtenu avec les 3 approches constitue une autre preuve de la spécificité du marquage immunocytochimique obtenu avec l'anticorps anti-EphA7.

2.1. Distribution d'EphA7 dans l'hippocampe adulte

Après marquage par immunoperoxydase, toutes les couches de l'hippocampe du rat et de la souris ont montré une immunoréactivité anti-EphA7 (Figure 16a).

Dans l'hippocampe, elle était localisée dans la majorité des neurones des couches cellulaires principales, incluant les cellules granulaires et polymorphes du gyrus dentelé (Figure 16d) et pyramidales de CA1, CA2, et CA3 (Figure 16b, c), en ordre décroissant d'intensité. Tel qu'illustré pour la région CA1, la région la plus intensément marquée, le marquage était plus fort dans les couches de neuropile *stratum oriens* et *stratum radiatum* (Figures 16a,c et 17a), et plus ponctiforme dans la couche pyramidale (Figures 16c; 17b,c).

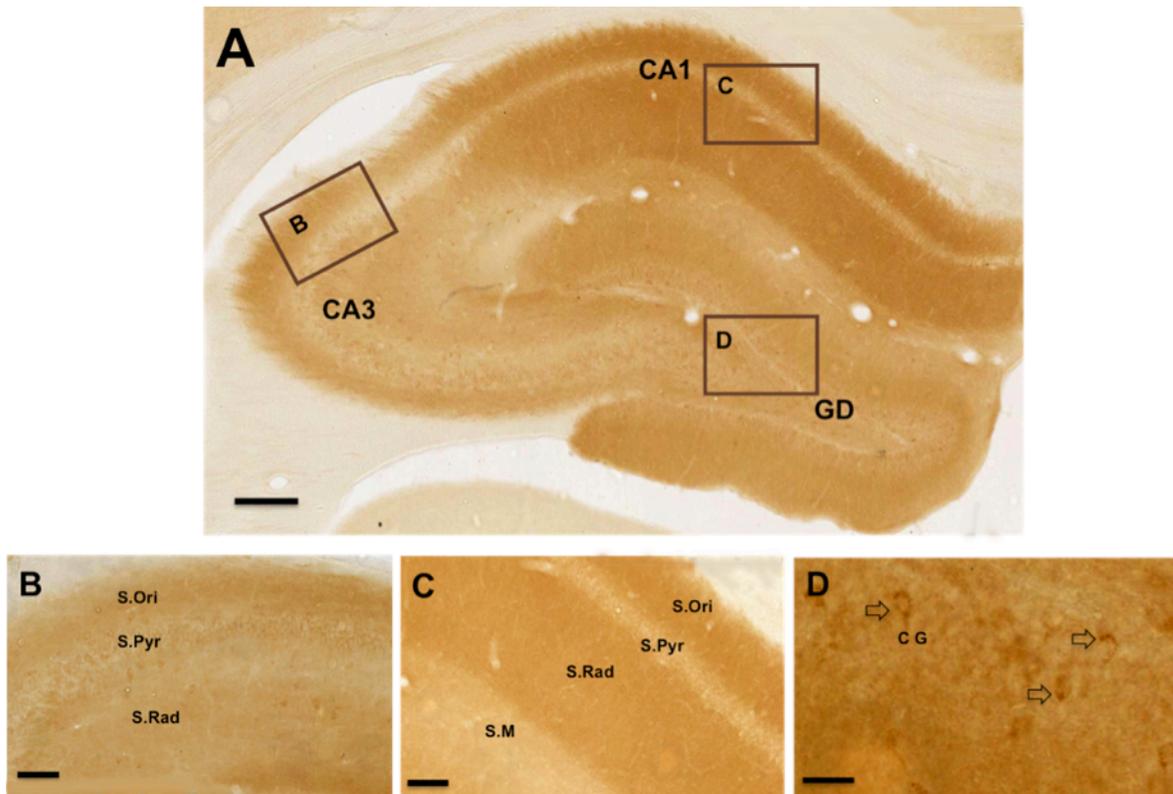


Figure 16. Distribution immunohistochimique du récepteur EphA7 dans l'hippocampe adulte

Micrographies en microscopie optique de l'hippocampe du rat adulte après immunocoloration anti-EphA7. Abréviations : GD, gyrus dentelé; CA1, CA3, cornes d'Ammon 1 et 3; S.pyr, couche des cellules pyramidales; S.rad, *stratum radiatum*; S.m, *stratum moleculare*; GC, couche des cellules granulaires. Barres d'échelle : 200 μm (a); 100 μm (b, c); 50 μm (d).

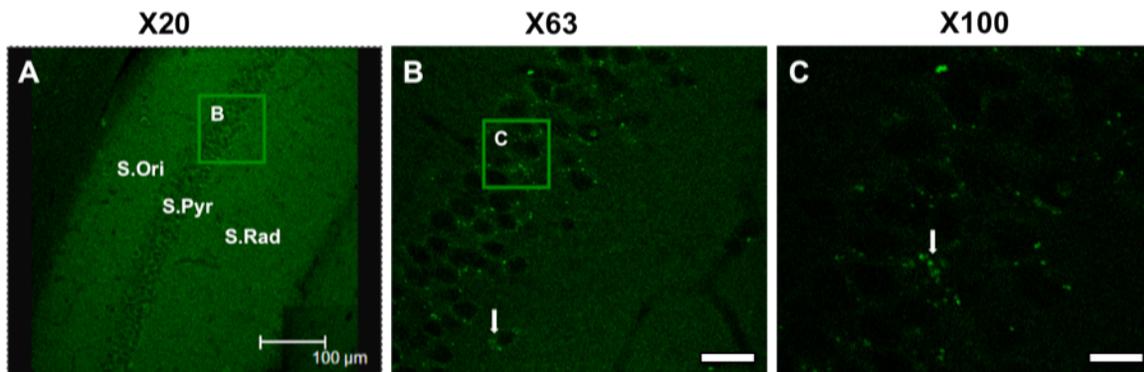


Figure 17. EphA7 dans la région CA1 de l'hippocampe en immunofluorescence

Photomicrographies en microscopie confocale de la région CA1 chez le rat adulte. Noter l'immunoréactivité anti-EphA7 (flèches blanches). Abréviations : voir la Figure 16. Barres d'échelle : 100 µm (a); 31,75 µm (b, c); 25 µm (d).

2.2. Localisation ultrastructurale d'EphA7 dans la région CA1 de l'hippocampe adulte

Les données ont été recueillies dans les trois couches du CA1 (*stratum oriens*, la couche de cellules pyramidales et *stratum radiatum*). Les profils cellulaires ont été identifiés selon des critères définis par Peters et collaborateurs (1991).

Dans la couche pyramidale, l'immunoréactivité anti-EphA7 intracellulaire était localisée sur des vésicules et du réticulum endoplasmique. La membrane plasmique des cellules pyramidales était aussi marquée par endroits (Figure 18a). Le même type de marquage (vésicules, réticulum endoplasmique et membrane plasmique) a aussi été fréquemment observé au niveau des corps cellulaires d'astrocytes (Figure 18b).

Des épines dendritiques (Figure 19) et des prolongements astrocytaires, souvent pérисynaptiques (Figure 20), ont été les éléments le plus fréquemment marqués.

Plus rarement, nous avons aussi rencontré des dendrites (Figure 21a, b) et des terminaisons axonales (Figure 22a, b) immunopositives. Dans le cas des dendrites, le marquage était essentiellement intracellulaire et concernait des vésicules. La membrane plasmique n'était pas marquée, indiquant que le marquage des dendrites est celui d'EphA7 en transit vers les épines dendritiques.

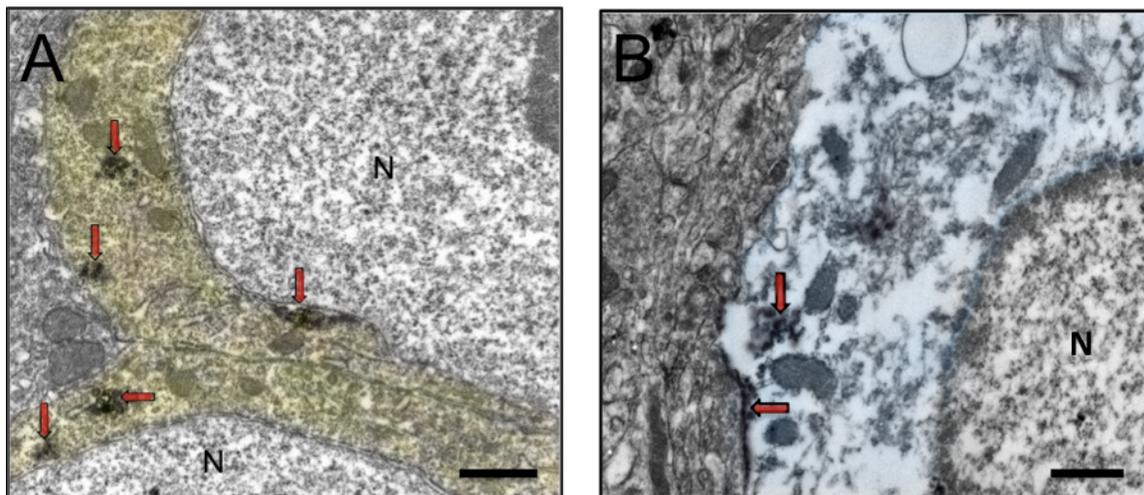


Figure 18. Immunomarkage anti-EphA7 dans des corps cellulaires neuronaux (cellules pyramidales) et astrocytaires

Micrographies en microscopie électronique montrant l'immunomarkage anti-EphA7 (flèches rouges) dans le cytoplasme (coloré en jaune) du corps cellulaire de deux cellules pyramidales chez la souris (A) ou celui (coloré en bleu) d'un astrocyte de *la stratum radiatum* chez le rat (B). N : noyau. Barres d'échelle = 500 nm.

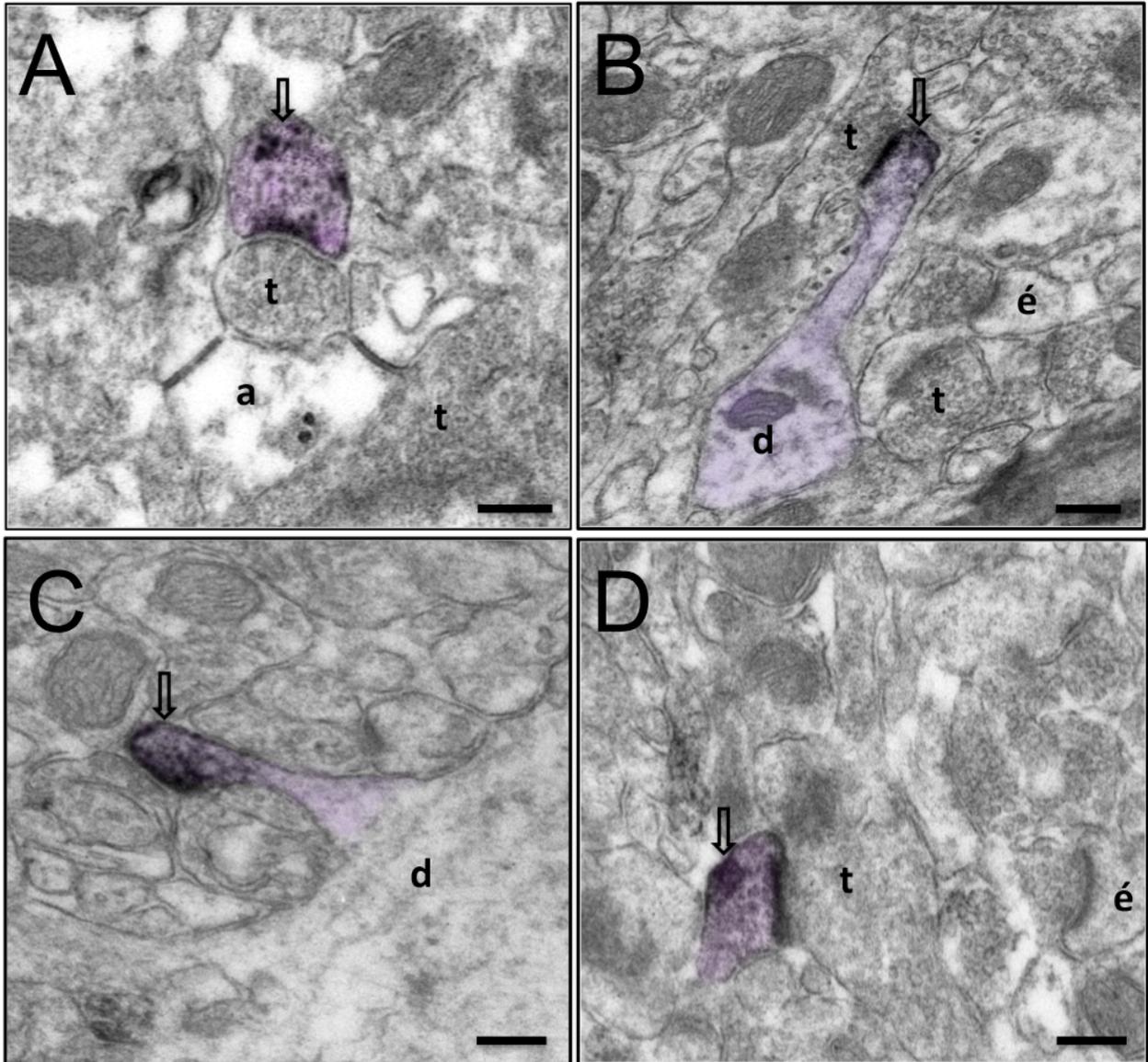


Figure 19. Immunomarkage d'EphA7 dans des épines dendritiques

Épines dendritiques (colorées en mauve) montrant une immunoréactivité EphA7 dans certaines vésicules ou appareil épineux, sur la membrane plasmique extrasynaptique et sur les densités postsynaptiques, dans la région CA1. A) et C) *Stratum radiatum* chez la souris; B) et D) *Stratum radiatum*, chez le rat. Noter l'absence de marquage dans les dendrites dont sont issues deux épines marquée en B et C. Légendes : t, terminaison; d, dendrite; a, astrocyte; é, épine dendritique. Barres d'échelle = 500 nm.

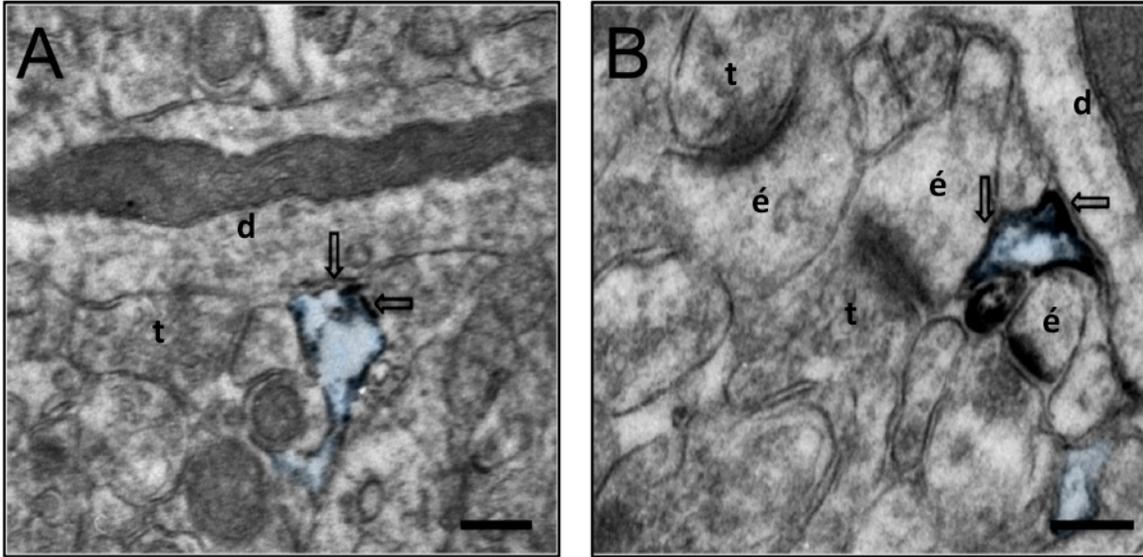


Figure 20. Immunomarquage anti-EphA7 dans des prolongements astrocytaires périssynaptiques.

Noter l'intense immunomarquage de la membrane plasmique dans les petits prolongements astrocytaires (en bleu) localisés au contact d'éléments synaptiques (terminaisons ou épines). A) *S. radiatum*, chez le rat. B) *S. pyramidale*, chez le rat. Légendes: voir Figure 19. Barre d'échelle = 500 nm

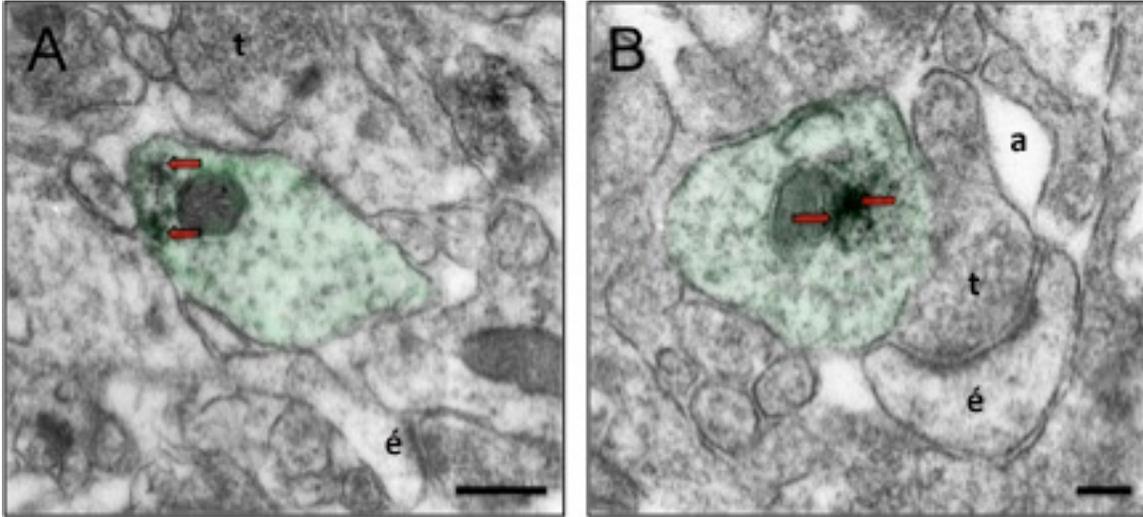


Figure 21. Immunomarkage anti-EphA7 dans des dendrites

Noter l'immunomarkage intracellulaire (flèches rouges) dans des branches dendritiques (colorées en vert). A) *S. radiatum*, chez le rat. B) *S. radiatum*, chez la souris. La membrane plasmique n'apparaît pas marquée, suggérant qu'il s'agit du marquage de vésicules de transport en transit vers les épines dendritiques. Légendes: voir Figure 19. Barres d'échelle = 500 nm.

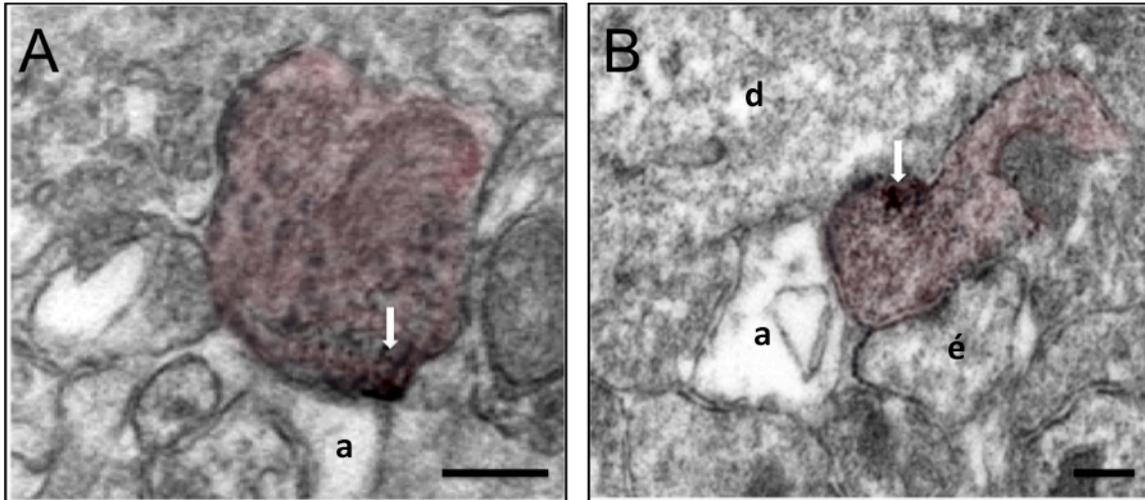


Figure 22. Immunomarkage anti-EphA7 dans des terminaisons axonales

Noter l'immunomarkage de sous-populations de vésicules et de la membrane plasmique adjacente (flèches blanches) des terminaisons axonales (colorées en rosé). A) et B) *S. radiatum*, chez la souris. Légendes: voir figure 19. Barres d'échelle = 500

Discussion

Par hybridation *in situ* et immunohistochimie en microscopie photonique et électronique, nous avons cartographié la distribution du récepteur EphA7 dans le cerveau du rat et de la souris adultes, de même que sa localisation subcellulaire dans la région CA1 de l'hippocampe, chez les deux espèces. Les deux méthodes montrent une distribution conséquente du marquage. En effet, la distribution régionale du signal d'expression de l'ARNm d'EphA7 détecté par notre ribosonde - qui devrait détecter les 5 isoformes connues d'EphA7 (voir section 2.7.1.) - et celle du signal immunohistochimique avec notre anticorps anti-EphA7 - détectant le domaine intracellulaire des formes de pleine longueur - étaient très comparables, tant chez le rat que chez la souris. De plus l'absence de marquage avec la ribosonde « sens » démontre la spécificité du marquage en hybridation *in situ* (la spécificité de la séquence de notre insertion, pour EphA7, avait été vérifiée par un « *blast* » dans *Genbank*). Bien que nous n'ayons pas été en mesure de tester l'anticorps sur des coupes de cerveau de souris KO-EphA7 (ce que nous souhaitons faire dès que de telles souris nous seront rendues disponibles), la corrélation à peu près parfaite entre les distributions neuroanatomiques obtenues avec les deux approches constitue une preuve convaincante que cet anticorps est bien spécifique en immunohistochimie. Cette corrélation était même manifeste à un niveau sous-régional. Par exemple, dans l'hippocampe, on a pu constater que l'intensité du marquage de la région CA3 était plus faible que dans CA1, autant en hybridation *in situ* qu'en immunohistochimie. Autre exemple dans le cervelet, où le marquage des cellules de Purkinje était très intense, alors que la couche moléculaire était nettement moins marquée et que la couche granulaire ne montrait aucun marquage avec les deux techniques. Il est bon de se rappeler ici que

cet anticorps est dirigé contre les domaines intracellulaires, SAM et PDZ du récepteur, ne devrait pas détecter donc les isoformes tronquées EphA7-T1 et -T2, qui ne possèdent plus que la portion juxtamembranaire du domaine intracellulaire.

En hybridation *in situ*, le signal d'expression le plus fort pour EphA7 se trouvait dans l'hippocampe. Il était nettement moins intense dans l'habénula, le striatum, l'amygdale, les cortex cingulaire, piriforme et entorhinal, ainsi que dans le cervelet. Les études de Ciossek et collaborateurs (1995) et de Valenzuela et collaborateurs (1995) sont les seules ayant rapporté auparavant, quoique très succinctement, un motif de distribution neuroanatomique de la transcription d'EphA7 dans le cerveau de la souris adulte, qui était très similaire à nos observations. Dans la présente étude, nous avons aussi démontré que cette distribution est très semblable chez le rat et la souris.

Nos résultats immunohistochimiques en microscopie optique montrent divers niveaux d'expression de la protéine EphA7 dans la plupart des régions anatomiques du cerveau adulte. L'immunomarquage le plus fort a été retrouvé dans l'hippocampe puis, avec des niveaux d'expression moins forts, dans l'habénula, le striatum, l'amygdale, les cortex cingulaire, piriforme et entorhinal, ainsi que dans le cervelet, intense dans les cellules de Purkinje, et plus faible dans la couche moléculaire et dans le noyau olfactif antérieur. L'immunoréactivité était faible ailleurs dans le cerveau. Cela dit, dans son état actuel, notre étude manque encore certains niveaux stéréotaxiques, comme la substance noire, par exemple, qui montrait un niveau d'expression d'EphA7 relativement élevé dans l'étude de Ciossek et collaborateurs (1999).

Ciossek et collaborateurs (1999) ont aussi pu examiner, grâce à des anticorps reconnaissant distinctement les isoformes de pleine longueur (EphA7-TK+) ou tronquée du domaine kinase (EphA7-TK-), la distribution respective de ces deux isoformes. Dans notre étude, l'anticorps utilisé ne détectait pas les isoformes tronquées T1 et T2 d'EphA7, et était donc sélectif pour les isoformes de pleine longueur (EphA7-FL) de même que MDK1-1 et MDK1-2, capables de transduction du signal par l'activité kinase. Possédant aussi les domaines SAM et PDZ, on s'attend aussi à une distribution cellulaire de ces dernières isoformes qui soit semblable à celle de pleine longueur, mais différente de celle des isoformes dépourvues de ces domaines de liaison à d'autres protéines. Dans leur étude, ces auteurs ont, en effet, démontré que les isoformes de pleine longueur et tronquée étaient distribuées différemment, la forme tronquée restant dans les corps cellulaires alors que celle de pleine longueur migrait dans les prolongements.

Comme suggéré par son expression préférentielle dans les structures clés du système limbique, EphA7 est susceptible d'être impliqué dans les fonctions importantes associées à ce système, notamment les aspects émotionnels du comportement, ou liés à la survie de l'animal et de l'espèce, ainsi que les réponses viscérales qui accompagnent ces émotions. De plus, ce système est généralement reconnu pour son implication dans des processus de formation de la mémoire (Kotter & Stephan, 1997).

Au niveau ultrastructural, nous sommes les premiers à révéler la localisation subcellulaire d'EphA7 en microscopie électronique, en commençant par l'hippocampe adulte. Nous avons jusqu'à maintenant examiné la région CA1 de cette structure anatomique. Nous avons trouvé que l'immunoréactivité d'EphA7 était associée à des vésicules, au réticulum endoplasmique et à

l'appareil de Golgi dans les corps cellulaires. Des observations similaires ont été faites dans les corps cellulaires des astrocytes. Ce marquage intracellulaire est très similaire à celui qui a été rapporté pour EphA4 dans l'hippocampe adulte ou en développement postnatal (Tremblay *et al.*, 2007; Tremblay *et al.*, 2009). Comme dans ces études sur EphA4, nous avons aussi détecté une immunocoloration EphA7 de la membrane plasmique au niveau des corps cellulaires, tant neuronaux qu'astrocytaires. Toutefois, ce marquage de surface des corps cellulaires semblait plus fréquent pour EphA7 que pour EphA4, chez l'animal adulte.

Sa localisation dans les épines dendritiques et les terminaisons axonales des cellules principales de l'hippocampe, suggère un rôle dans les synapses où le récepteur EphA4 a également été situé (Tremblay *et al.*, 2007). Cela dit, EphA4 était beaucoup plus abondant dans les terminaisons axonales qu'EphA7.

Ciossek et collaborateurs (1999) ont indiqué que l'hippocampe montrait une forte immunocoloration pour EphA7-TK⁺ (pleine longueur) dans le neuropile de toutes ses régions, mais peu ou pas de coloration dans la couche des corps cellulaires, ce qui indique qu'il est transporté le long des neurites. Ce modèle ressemble à celui du récepteur EphB2, qui s'exprime en particulier dans les cônes de croissance (Henkemeyer *et al.*, 1994) et dans la membrane synaptique du cerveau adulte (Torres *et al.*, 1998).

Au contraire, l'immunocoloration d'EphA7-TK⁻ (tronqué du domaine kinase) était évidente dans les couches des corps cellulaire hippocampiques et leurs dendrites proximales, notamment sur les neurones qui exprimaient l'ARNm d'EphA7-TK⁺, mais peu abondant dans le neuropile. Ces auteurs ont proposé que le récepteur tronqué puisse agir simplement comme un

antagoniste dominant négatif de l'isoforme de pleine longueur, afin d'assurer que celui-ci réponde uniquement aux éphrines rencontrées au niveau des épines ou terminaisons. Cela dit, on peut aussi proposer que le récepteur tronqué serve de ligand pour l'activation d'une éphrine et la transduction inverse du signal (sans transduction antérograde dans le sens du récepteur EphA7).

Dans **le cervelet**, l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ* ont démontré que EphA7 était localisé surtout dans les corps cellulaires des cellules de Purkinje, les cellules principales du cortex cérébelleux. Parmi les multiples afférences des cellules de Purkinje, les cellules à paniers (« *basket cells* ») sont celles qui innervent sélectivement le corps cellulaire des cellules de Purkinje (Cesa *et al.*, 2011). Considérant l'hypothèse d'un rôle d'EphA7 dans la formation, le maintien ou la plasticité des synapses, il sera intéressant d'investiguer la possibilité que ce récepteur intervienne dans ces fonctions pour les synapses GABAergiques des cellules à paniers, sur les corps cellulaires de Purkinje. Un examen en microscopie électronique sera effectué pour déterminer la localisation précise de ce récepteur au niveau des cellules de Purkinje. Il sera aussi intéressant d'identifier l'éphrine interagissant avec EphA7 à cet endroit et de déterminer si sa localisation est spécifique à un type d'afférences particulier (ex., cellules à paniers).

Conclusions et directions futures

Nous avons présenté deux études, en hybridation *in situ* et immunohistochimie, visant à mieux définir la distribution régionale, cellulaire et subcellulaire d'EphA7 dans le cerveau adulte, et plus particulièrement au niveau de l'hippocampe.

Dans le cerveau adulte, EphA7 est transcrit principalement dans l'hippocampe, avec des niveaux d'expression plus modérés ou plus faibles ailleurs. Après l'hippocampe, les niveaux d'expression les plus élevés se trouvaient dans l'habénula, le striatum, l'amygdale, les cortex cingulaire, piriforme et entorhinal, ainsi que le cervelet.

Au niveau ultrastructural, nous sommes les premiers à dévoiler la localisation subcellulaire d'EphA7 en microscopie électronique, ici dans l'hippocampe adulte. Dans cette étude, nous avons examiné la région CA1 et trouvé que l'immunoréactivité d'EphA7 a été localisée dans le cytoplasme et à la surface des cellules principales, granulaires (gyrus dentelé) et pyramidales (CA1 et CA3) et des astrocytes. La localisation au niveau du Golgi, du réticulum endoplasmique ou de vésicules de transport représente manifestement les sites de synthèse, de traitement et de transport de cette protéine. Cependant, sa localisation en surface suggère un rôle d'EphA7 dans des interactions intercellulaires au niveau somatique des neurones et astrocytes; un rôle qui reste à explorer.

Dans le neuropile de CA1, des épines dendritiques et des prolongements astrocytaires, souvent pérисynaptiques, ont été les éléments les plus fréquemment marqués, et nous avons rarement rencontré des dendrites ou des terminaisons axonales immunopositives, particulièrement au niveau de leur membrane plasmique. La localisation

préférentielle dans les épines dendritiques et les prolongements astrocytaires pérисynaptiques, particulièrement sur la membrane plasmique, est cohérente avec un rôle de ce récepteur dans la plasticité synaptique.

Dans le cadre de cette étude, l'analyse ultrastructurale, en microscopie électronique s'est limitée à la région CA1 de l'hippocampe. Mais, des travaux en cours visent à compléter cette analyse dans les autres régions hippocampiques, de même que dans le cervelet. De plus, dans son état actuel, notre étude manque encore certains niveaux stéréotaxiques, comme la substance noire, par exemple, qui montrait un niveau d'expression d'EphA7 relativement élevé dans l'étude de Ciossek et collaborateurs (1999). Donc il sera nécessaire d'inclure ces niveaux du cerveau dans de prochaines expériences pour bien comprendre le rôle d'EphA7 dans cette région importante du cerveau.

Aussi, dans le cervelet, en considérant l'hypothèse d'un rôle d'EphA7 dans la formation, le maintien ou la plasticité des synapses, il sera intéressant d'étudier la localisation ultrastructurale d'EphA7 dans les différentes régions et couches du cortex cérébelleux, et d'investiguer la possibilité que ce récepteur intervienne dans la fonction des synapses GABAergiques des cellules à paniers, par exemple, sur les corps cellulaires de Purkinje.

Il est important de noter que l'anticorps utilisé dans cette étude, dirigé contre les domaines intracellulaires - SAM et PDZ - du récepteur, ne peut pas détecter les isoformes tronquées EphA7-T1 et -T2 qui ne possèdent plus que la portion juxtamembranaire du domaine cytoplasmique. Pour cela, il pourrait être intéressant de produire un anticorps

capables de détecter sélectivement les isoformes tronquées pour mieux décrire les différences de distribution régionale ou ultrastructurale entre les isoformes tronquées et de pleine longueur du récepteur EphA7 dans le cerveau. De telles données, conjuguées éventuellement avec l'identification des éphrines qui interagissent avec l'une ou l'autre, pourraient permettre de mieux comprendre le rôle distinct ou complémentaire des isoformes.

Références

- Adams, R.H. & Eichmann, A. (2010) Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a001875.
- Aoto, J. & Chen, L. (2007) Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions. *Brain Res*, **1184**, 72-80.
- Araujo, M. & Nieto, M.A. (1997) The expression of chick EphA7 during segmentation of the central and peripheral nervous system. *Mech Dev*, **68**, 173-177.
- Baharnoori, M. (2007) *Expression des récepteurs EphA dans le raphé dorsal néonatal et adulte.*
- Buchert, M., Schneider, S., Meskenaite, V., Adams, M.T., Canaani, E., Baechli, T., Moelling, K. & Hovens, C.M. (1999) The junction-associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain. *J Cell Biol*, **144**, 361-371.
- Cesa, R., Premoselli, F., Renna, A., Ethell, I.M., Pasquale, E.B. & Strata, P. (2011) Eph receptors are involved in the activity-dependent synaptic wiring in the mouse cerebellar cortex. *PLoS One*, **6**, e19160.
- Chen, Z.Y., Sun, C., Reuhl, K., Bergemann, A., Henkemeyer, M. & Zhou, R. (2004) Abnormal hippocampal axon bundling in EphB receptor mutant mice. *J Neurosci*, **24**, 2366-2374.
- Cheng, H.J. & Flanagan, J.G. (1994) Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell*, **79**, 157-168.
- Cheng, H.J., Nakamoto, M., Bergemann, A.D. & Flanagan, J.G. (1995) Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell*, **82**, 371-381.
- Chumley, M.J., Catchpole, T., Silvany, R.E., Kernie, S.G. & Henkemeyer, M. (2007) EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, **27**, 13481-13490.
- Ciossek, T., Millauer, B. & Ullrich, A. (1995) Identification of alternatively spliced mRNAs encoding variants of MDK1, a novel receptor tyrosine kinase expressed in the murine nervous system. *Oncogene*, **10**, 97-108.
- Ciossek, T. & Ullrich, A. (1997) Identification of Elf-1 and B61 as high affinity ligands for the receptor tyrosine kinase MDK1. *Oncogene*, **14**, 35-43.

- Ciossek, T., Ullrich, A., West, E. & Rogers, J.H. (1999) Segregation of the receptor EphA7 from its tyrosine kinase-negative isoform on neurons in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **74**, 231-236.
- Contractor, A., Rogers, C., Maron, C., Henkemeyer, M., Swanson, G.T. & Heinemann, S.F. (2002) Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science*, **296**, 1864-1869.
- Cowan, C.A. & Henkemeyer, M. (2001) The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature*, **413**, 174-179.
- Dalva, M.B., Takasu, M.A., Lin, M.Z., Shamah, S.M., Hu, L., Gale, N.W. & Greenberg, M.E. (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell*, **103**, 945-956.
- Davy, A., Gale, N.W., Murray, E.W., Klinghoffer, R.A., Soriano, P., Feuerstein, C. & Robbins, S.M. (1999) Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev*, **13**, 3125-3135.
- Davy, A. & Robbins, S.M. (2000) Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *EMBO J*, **19**, 5396-5405.
- Depaepe, V. & Vanderhaeghen, P. (2005) [Lethal signals controlling brain size]. *Med Sci (Paris)*, **21**, 795-797.
- Deschenes, M., Veinante, P. & Zhang, Z.W. (1998) The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res Brain Res Rev*, **28**, 286-308.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M. & Bonhoeffer, F. (1995) In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell*, **82**, 359-370.
- Dufour, A., Seibt, J., Passante, L., Depaepe, V., Ciossek, T., Frisen, J., Kullander, K., Flanagan, J.G., Polleux, F. & Vanderhaeghen, P. (2003) Area specificity and topography of thalamocortical projections are controlled by ephrin/Eph genes. *Neuron*, **39**, 453-465.
- Easty, D.J., Guthrie, B.A., Maung, K., Farr, C.J., Lindberg, R.A., Toso, R.J., Herlyn, M. & Bennett, D.C. (1995) Protein B61 as a new growth factor: expression of B61 and up-regulation of its receptor epithelial cell kinase during melanoma progression. *Cancer Res*, **55**, 2528-2532.

- Egea, J. & Klein, R. (2007) Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol*, **17**, 230-238.
- Ellis, J., Liu, Q., Breitman, M., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Tempest, H.V., Warren, S., Muir, E., Schilling, H. & et al. (1995) Embryo brain kinase: a novel gene of the eph/elk receptor tyrosine kinase family. *Mech Dev*, **52**, 319-341.
- Fabes, J., Anderson, P., Brennan, C. & Bolsover, S. (2007) Regeneration-enhancing effects of EphA4 blocking peptide following corticospinal tract injury in adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci*, **26**, 2496-2505.
- Fabes, J., Anderson, P., Yanez-Munoz, R.J., Thrasher, A., Brennan, C. & Bolsover, S. (2006) Accumulation of the inhibitory receptor EphA4 may prevent regeneration of corticospinal tract axons following lesion. *Eur J Neurosci*, **23**, 1721-1730.
- Fabri, M. & Burton, H. (1991) Ipsilateral cortical connections of primary somatic sensory cortex in rats. *J Comp Neurol*, **311**, 405-424.
- Figueroa, J.D., Benton, R.L., Velazquez, I., Torrado, A.I., Ortiz, C.M., Hernandez, C.M., Diaz, J.J., Magnuson, D.S., Whittemore, S.R. & Miranda, J.D. (2006) Inhibition of EphA7 up-regulation after spinal cord injury reduces apoptosis and promotes locomotor recovery. *J Neurosci Res*, **84**, 1438-1451.
- Flanagan, J.G. & Vanderhaeghen, P. (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci*, **21**, 309-345.
- Frisen, J., Yates, P.A., McLaughlin, T., Friedman, G.C., O'Leary, D.D. & Barbacid, M. (1998) Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, **20**, 235-243.
- Goldshmit, Y., Galea, M.P., Bartlett, P.F. & Turnley, A.M. (2006) EphA4 regulates central nervous system vascular formation. *J Comp Neurol*, **497**, 864-875.
- Grunwald, I.C., Korte, M., Adelman, G., Plueck, A., Kullander, K., Adams, R.H., Frotscher, M., Bonhoeffer, T. & Klein, R. (2004) Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nat Neurosci*, **7**, 33-40.
- Grunwald, I.C., Korte, M., Wolfer, D., Wilkinson, G.A., Unsicker, K., Lipp, H.P., Bonhoeffer, T. & Klein, R. (2001) Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **32**, 1027-1040.
- Harel, N.Y. & Strittmatter, S.M. (2006) Can regenerating axons recapitulate developmental guidance during recovery from spinal cord injury? *Nat Rev Neurosci*, **7**, 603-616.

- Henderson, J.T., Georgiou, J., Jia, Z., Robertson, J., Elowe, S., Roder, J.C. & Pawson, T. (2001) The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron*, **32**, 1041-1056.
- Henkemeyer, M. (2003) Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol*, **163**, 1313-1326.
- Henkemeyer, M., Marengere, L.E., McGlade, J., Olivier, J.P., Conlon, R.A., Holmyard, D.P., Letwin, K. & Pawson, T. (1994) Immunolocalization of the Nuk receptor tyrosine kinase suggests roles in segmental patterning of the brain and axonogenesis. *Oncogene*, **9**, 1001-1014.
- Himanen, J.P., Chumley, M.J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W.A., Jeffrey, P.D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D.A., Boyd, A.W., Henkemeyer, M. & Nikolov, D.B. (2004) Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci*, **7**, 501-509.
- Himanen, J.P., Saha, N. & Nikolov, D.B. (2007) Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 534-542.
- Holmberg, J., Armulik, A., Senti, K.A., Edoff, K., Spalding, K., Momma, S., Cassidy, R., Flanagan, J.G. & Frisen, J. (2005) Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev*, **19**, 462-471.
- Holmberg, J., Clarke, D.L. & Frisen, J. (2000) Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature*, **408**, 203-206.
- Huai, J. & Drescher, U. (2001) An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *J Biol Chem*, **276**, 6689-6694.
- Irie, F., Okuno, M., Pasquale, E.B. & Yamaguchi, Y. (2005) EphrinB-EphB signalling regulates clathrin-mediated endocytosis through tyrosine phosphorylation of synaptotagmin 1. *Nat Cell Biol*, **7**, 501-509.
- Jiao, J.W., Feldheim, D.A. & Chen, D.F. (2008) Ephrins as negative regulators of adult neurogenesis in diverse regions of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 8778-8783.
- Kashles, O., Yarden, Y., Fischer, R., Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1991) A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. *Mol Cell Biol*, **11**, 1454-1463.

- Klein, R. (2001) Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 196-203.
- Klein, R. (2004) Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 580-589.
- Kotter, R. & Stephan, K.E. (1997) Useless or helpful? The "limbic system" concept. *Rev Neurosci*, **8**, 139-145.
- Kullander, K. & Klein, R. (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 475-486.
- Kuriyama, S. & Mayor, R. (2008) Molecular analysis of neural crest migration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **363**, 1349-1362.
- Liebl, D.J., Morris, C.J., Henkemeyer, M. & Parada, L.F. (2003) mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *J Neurosci Res*, **71**, 7-22.
- Lim, Y.S., McLaughlin, T., Sung, T.C., Santiago, A., Lee, K.F. & O'Leary, D.D. (2008) p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron*, **59**, 746-758.
- Lozsadi, D.A., Gonzalez-Soriano, J. & Guillery, R.W. (1996) The course and termination of corticothalamic fibres arising in the visual cortex of the rat. *Eur J Neurosci*, **8**, 2416-2427.
- Lu, Q., Sun, E.E., Klein, R.S. & Flanagan, J.G. (2001) Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell*, **105**, 69-79.
- Martone, M.E., Holash, J.A., Bayardo, A., Pasquale, E.B. & Ellisman, M.H. (1997) Immunolocalization of the receptor tyrosine kinase EphA4 in the adult rat central nervous system. *Brain Res*, **771**, 238-250.
- McLean, I.W. & Nakane, P.K. (1974) Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*, **22**, 1077-1083.
- Mori, T., Wanaka, A., Taguchi, A., Matsumoto, K. & Tohyama, M. (1995) Localization of novel receptor tyrosine kinase genes of the eph family, MDK1 and its splicing variant, in the developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*, **34**, 154-160.

- Mouginot, D., Laforest, S. & Drolet, G. (2007) Challenged sodium balance and expression of angiotensin type 1A receptor mRNA in the hypothalamus of Wistar and Dahl rat strains. *Regul Pept*, **142**, 44-51.
- Murai, K.K., Nguyen, L.N., Irie, F., Yamaguchi, Y. & Pasquale, E.B. (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci*, **6**, 153-160.
- Murai, K.K. & Pasquale, E.B. (2003) 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci*, **116**, 2823-2832.
- Palmer, A. & Klein, R. (2003) Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev*, **17**, 1429-1450.
- Pasquale, E.B. (2005) Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 462-475.
- Pasquale, E.B. (2008) Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*, **133**, 38-52.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney.
- Penzes, P., Beeser, A., Chernoff, J., Schiller, M.R., Eipper, B.A., Mains, R.E. & Huganir, R.L. (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron*, **37**, 263-274.
- Peters, A., Palay, S.L. & Webster, H.d. (1991) *The Fine Structure of the Nervous System*. Oxford University Press, New York.
- Qiao, F. & Bowie, J.U. (2005) The many faces of SAM. *Sci STKE*, **2005**, re7.
- Qiu, R., Wang, X., Davy, A., Wu, C., Murai, K., Zhang, H., Flanagan, J.G., Soriano, P. & Lu, Q. (2008) Regulation of neural progenitor cell state by ephrin-B. *J Cell Biol*, **181**, 973-983.
- Rashid, T., Upton, A.L., Blentic, A., Ciossek, T., Knoll, B., Thompson, I.D. & Drescher, U. (2005) Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, **47**, 57-69.
- Romanelli, R.J. & Wood, T.L. (2008) Directing traffic in neural cells: determinants of receptor tyrosine kinase localization and cellular responses. *J Neurochem*, **105**, 2055-2068.

- Saeger, B.M., Suhm, M. & Neubuser, A. (2011) Ephrin/ephrin receptor expression during early stages of mouse inner ear development. *Dev Dyn*, **240**, 1578-1585.
- Taneja, R., Thisse, B., Rijli, F.M., Thisse, C., Bouillet, P., Dolle, P. & Chambon, P. (1996) The expression pattern of the mouse receptor tyrosine kinase gene MDK1 is conserved through evolution and requires Hoxa-2 for rhombomere-specific expression in mouse embryos. *Dev Biol*, **177**, 397-412.
- Torii, M. & Levitt, P. (2005) Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism. *Neuron*, **48**, 563-575.
- Torres, R., Firestein, B.L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E.N., Huganir, R.L., Bredt, D.S., Gale, N.W. & Yancopoulos, G.D. (1998) PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron*, **21**, 1453-1463.
- Tremblay, M.E., Riad, M., Bouvier, D., Murai, K.K., Pasquale, E.B., Descarries, L. & Doucet, G. (2007) Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *J Comp Neurol*, **501**, 691-702.
- Tremblay, M.E., Riad, M., Chierzi, S., Murai, K.K., Pasquale, E.B. & Doucet, G. (2009) Developmental course of EphA4 cellular and subcellular localization in the postnatal rat hippocampus. *J Comp Neurol*, **512**, 798-813.
- Valenzuela, D.M., Rojas, E., Griffiths, J.A., Compton, D.L., Gisser, M., Ip, N.Y., Goldfarb, M. & Yancopoulos, G.D. (1995) Identification of full-length and truncated forms of Ehk-3, a novel member of the Eph receptor tyrosine kinase family. *Oncogene*, **10**, 1573-1580.
- van der Geer, P., Hunter, T. & Lindberg, R.A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 251-337.
- Yue, Y., Chen, Z.Y., Gale, N.W., Blair-Flynn, J., Hu, T.J., Yue, X., Cooper, M., Crockett, D.P., Yancopoulos, G.D., Tessarollo, L. & Zhou, R. (2002) Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10777-10782.
- Zhou, L., Martinez, S.J., Haber, M., Jones, E.V., Bouvier, D., Doucet, G., Corera, A.T., Fon, E.A., Zisch, A.H. & Murai, K.K. (2007) EphA4 signaling regulates phospholipase C γ 1 activation, cofilin membrane association, and dendritic spine morphology. *J Neurosci*, **27**, 5127-5138.

